

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Helen Simone Chiaranda

**ALTERAÇÕES BIOGEOQUÍMICAS EM ÁGUAS
SUBTERRÂNEAS IMPACTADAS POR BIODIESEL DE SOJA E
MISTURAS DE DIESEL/BIODIESEL (B20)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Henry X. Corseuil

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C532a Chiaranda, Helen Simone

Alterações Biogeoquímicas em Águas Subterrâneas Impactadas por Biodiesel de Soja e Misturas de Diesel/Biodiesel (B20) [tese] / Helen Simone Chiaranda ; orientador, Henry Xavier Corseuil. - Florianópolis, SC, 2011.

221 p.: il., grafs., tabs., mapas, plantas

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Biodiesel. 3. Combustíveis diesel. 4. Biorremediação. 5. Águas subterrâneas. 1. Corseuil, Henry Xavier. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

CDU 628.4

Helen Simone Chiaranda

**ALTERAÇÕES BIOGEOQUÍMICAS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS
IMPACTADAS POR BIODIESEL DE SOJA E MISTURAS DE
DIESEL/BIODIESEL (B20)**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Ambiental” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Florianópolis, 12 de Julho de 2011.

Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Henry Xavier Corseuil,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Dione Mari Morita,
Universidade de São Paulo

Prof., Dr. Carlos Augusto de Lemos Chernicaro,
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof., Dr. Willibaldo Schmidell Netto,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Rejane Helena Ribeiro da Costa,
Universidade de Santa Catarina

Prof., Dr. William Gerson Matias,
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao auxílio de algumas pessoas. Desta forma, agradeço:

Ao Professor Henry, pela orientação e, principalmente, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

A toda equipe REMAS: atuais membros e aos que já integraram nossa equipe. Embora eu prefira não citar nomes (demasiada quantidade!), deixo aqui o meu registro de agradecimento a cada um que passou por esse Laboratório e que colaborou de alguma forma para a conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço a Dra. Marilda Fernandes, responsável pelas análises químicas no Laboratório e àqueles que estiveram envolvidos com as coletas e análises das amostras de campo.

Aos bolsistas de Iniciação Científica que trabalharam diretamente comigo, auxiliando-me na diferentes etapas da realização deste trabalho: Nara Alonso Salles, Cássio Moraes Schambeck e Jean Garcia Junkes. Obrigada a vocês por tudo o que fizeram! Vocês foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Obrigada pela amizade, descontração e responsabilidade com que vocês me ajudaram a enfretar as dificuldades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) e à Universidade Federal de Santa Catarina. Ao CENPES/PETROBRAS pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela concessão da Bolsa de Pesquisa.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço a minha família, em especial ao meu namorado Telles, por seu apoio e compreensão em todos os momentos.

“O que importa não é a perfeição com a qual possamos executar o que há de ser realizado, mas que aquilo que há de vir à vida, por mais imperfeito que venha, que seja feito em algum momento, para que haja um início!”

Rudolf Steiner

“Nicht auf die Vollkommenheit in der wir ausführen können dasjenige, was gewollt werden muss, kommt es an, sondern darauf, dass das, was hier ins Leben treten muss, auch wenn es noch so unvollkommen ins Leben tritt, einmal getan wird, dass ein Anfang gemacht wird!”

Rudolf Steiner

RESUMO

Em caso de acidentes envolvendo a liberação de biodiesel puro ou de misturas diesel/biodiesel no meio ambiente, pouco se sabe sobre os reais impactos da interação destes combustíveis com o solo e a água subterrânea. A fim de se avaliar as alterações biogeoquímicas que ocorrem com a degradação de diferentes volumes de biodiesel na água subterrânea e como estes volumes podem influenciar a degradação dos principais compostos aromáticos em misturas diesel/biodiesel, 100 litros de biodiesel puro de soja (B100) e 100 litros da mistura B20 (20% em volume do biodiesel metílico derivado de óleo de soja e 80% em volume de diesel fóssil) foram liberados na água subterrânea, em dois experimentos de campo controlados independentes, desenvolvidos na Fazenda Experimental da Ressacada, em Florianópolis, SC, Brasil. O monitoramento das plumas de compostos dissolvidos e subprodutos metabólicos foi realizado durante 29 meses. No experimento com o maior volume de biodiesel de soja (100 litros) foram observadas concentrações de acetato na água subterrânea de até 120 mg.L^{-1} e de metano de até 10 mg.L^{-1} durante os dois primeiros anos de monitoramento. No experimento com o menor volume de biodiesel (20 litros), ao contrário, baixas concentrações de acetato (máxima de 9 mg.L^{-1}) e altas concentrações de metano (máxima de 28 mg.L^{-1}) foram detectadas durante o mesmo período. O acúmulo de acetato gerado pelo maior volume de biodiesel limitou, portanto, o desenvolvimento da metanogênese no meio. No experimento com a mistura diesel/biodiesel, altas concentrações dos compostos mono e policíclicos aromáticos constituintes do diesel fóssil foram detectadas durante todo o período de monitoramento do experimento. Os resultados obtidos sugeriram que o biodiesel de soja dificultou a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Isso teria ocorrido tanto pelo esgotamento acelerado dos receptores de elétrons disponíveis no meio, quanto pela degradação preferencial desta fonte de carbono pelos micro-organismos nativos. Na presença de um volume maior de biodiesel, além destes fatores, o excesso de subprodutos da biodegradação do biodiesel acumulados no meio poderia limitar termodinamicamente a degradação dos compostos aromáticos. Com bases nestes resultados, as tecnologias para remediação de ambientes subterrâneos contaminados com misturas de diesel/biodiesel devem priorizar a rápida remoção da matéria mais facilmente biodegradável através da indução de processos metabólicos redutores e da manutenção de concentrações não limitantes de subprodutos metabólicos no meio.

Palavras-chave: Biodiesel. Diesel. Biorremediação. Águas subterrâneas.

ABSTRACT

In case of accidents involving the release of pure soy biodiesel or diesel/biodiesel blends in the environment, little is known about the real impacts of the interaction of these fuels with soil and groundwater. In order to evaluate the biogeochemical changes that occur with the degradation of different volumes of biodiesel in groundwater and how those volumes can influence the degradation of aromatic compounds in diesel/biodiesel mixtures, two independent and controlled field experiments were conducted at the Ressacada Experimental Site, in Florianopolis, Brazil. In one of them, 100 liters of pure soy biodiesel (B100) were released into groundwater, and in the other, 100 liters of the B20 mixture (20% in volume of methylic biodiesel derived from soy oil and 80% in volume of fossil diesel). The monitoring of the dissolved compounds and metabolic byproducts plumes was conducted for 29 months. In the experiment with the largest biodiesel volume (100 liters), acetate concentrations observed in groundwater were up to 120 mg.L^{-1} and methane up to 10 mg.L^{-1} during the first two years of monitoring. In contrast, in the experiment with the smallest amount of biodiesel (20 liters), low acetate concentrations (maximum 9 mg.L^{-1}) and high methane concentrations (maximum 28 mg.L^{-1}) were detected during the same period. Thus, acetate accumulation caused by the largest biodiesel volume limited the development of methanogenesis in groundwater. In the experiment with diesel/biodiesel mixture, high concentrations of mono and polycyclic aromatic compounds of fossil diesel were detected during the entire monitoring period. The results suggested that soy biodiesel hindered aromatic hydrocarbons biodegradation. This would have been caused by both the accelerated depletion of electron acceptors available in the environment and by preferential degradation of biodiesel by indigenous microorganisms. Also, in the presence of a greater volume of biodiesel, the accumulation of biodiesel biodegradation byproducts could thermodynamically limit the degradation of aromatic compounds. On the basis of such results, technologies for remediation of contaminated groundwater with diesel/biodiesel blends should target the rapid removal of the more easily biodegradable material. This can be accomplished by the induction of reductive biodegradation processes and by the maintenance of non-limiting concentrations of metabolic byproducts in the environment.

Keywords: Biodiesel. Diesel. Bioremediation. Groundwater.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – Reação de transesterificação para a formação do biodiesel.....	6
FIGURA 2.2 – Estruturas químicas dos principais ésteres metílicos do óleo de soja.	7
FIGURA 2.3 – Cromatograma típico de B100.	11
FIGURA 2.4 – Estruturas químicas dos compostos BTEX.	14
FIGURA 2.5 – Estruturas químicas dos principais compostos HPA.	14
FIGURA 2.6 – Cromatograma típico de D100.	15
FIGURA 2.7 – Representação da migração do LNAPL na subsuperfície.	19
FIGURA 2.8 – Processos anaeróbios de degradação da matéria orgânica complexa. Adaptado de Gujer e Zehnder (1983).	27
FIGURA 2.9 – Reação de hidrólise do biodiesel, com a formação de AGCL e álcool.	28
FIGURA 2.10 – Ativação e degradação de um AGCL via β -oxidação.	29
FIGURA 2.11 – Possíveis rotas da degradação inicial do benzeno, com a posterior formação de benzoil-CoA.	31
FIGURA 2.12 – Ativação do tolueno para o processo de degradação através da adição de fumarato ao grupo metil com a formação de benzilsuccinato.	32
FIGURA 2.13 – Reações iniciais propostas para a degradação anaeróbia do etilbenzeno.	32
FIGURA 2.14 – Reações iniciais propostas para a degradação anaeróbia do <i>m</i> -xileno.	33
FIGURA 2.15 – Rota metabólica de degradação do benzoil-CoA.	34
FIGURA 2.16 – Rota de biotransformação anaeróbia proposta para o fenantreno.	35
FIGURA 2.17 – Rotas de degradação anaeróbia propostas para o naftaleno e o metilnaftaleno.	35
FIGURA 3.1 – Localização da área.	39
FIGURA 3.2 – Localização dos piezômetros ao redor das áreas dos experimentos.	41
FIGURA 3.3 – Realização de amostragem de solo para a caracterização estratigráfica da área experimental. <i>Kit</i> de coleta (A), remoção da amostra do <i>kit</i> (B), e amostra pronta para análises de estratigrafia (C).	43
FIGURA 3.4 – Amostras de solo nos anéis metálicos dispostas sobre a mesa de tensão para determinação da porosidade efetiva.	45

FIGURA 3.5 – Experimento de campo: orientação e disposição dos poços de monitoramento em cada uma das áreas experimentais.....	48
FIGURA 3.6 – Experimentos de campo: A) Visualização geral das áreas experimentais; B) Detalhe de um poço de monitoramento multinível instalado.	49
FIGURA 3.7 – A) Instalação de um poço de monitoramento em uma das áreas experimentais (as mangueiras de PEBD são suportadas pelo cano de PVC); B) Detalhe do filtro de tela de aço inox em um dos níveis de monitoramento.	50
FIGURA 3.8 – Áreas experimentais e as respectivas regiões das fontes.....	51
FIGURA 3.9 – Abertura para liberação dos produtos, com detalhe do afloramento do lençol freático.	52
FIGURA 3.10 – Verificação das diferentes camadas do solo da área e da presença de regiões com concentrações de ferro.	53
FIGURA 3.11 – Liberação de agente traçador na região da fonte.	54
FIGURA 3.12 – Cobertura da região da fonte com o solo nativo.....	55
FIGURA 4.1 – Mapa potenciométrico, indicando a direção preferencial do fluxo e a localização dos experimentos na área.	63
FIGURA 4.2 – Variação do nível do lençol freático na área dos experimentos (em metros, em relação ao nível do terreno) e da pluviometria total diária (em milímetros) ao longo dos anos de A) 2007 e 2008; B) 2009 e 2010.....	65
FIGURA 4.3 – Detalhe dos poços utilizados para análises de estratigrafia do solo.	66
FIGURA 4.4 – Perfil estratigráfico da área B100.....	67
FIGURA 4.5 – Perfil estratigráfico da área B20.....	68
FIGURA 4.6 – Difratoograma de uma amostra da área experimental.	70
FIGURA 4.7 – Distribuição dos poços nas áreas experimentais. Em destaque estão os poços escolhidos para representação dos resultados, Fonte e PM09.....	78
FIGURA 4.8 – Localização dos poços Fonte e PM09 na área experimental.	79
FIGURA 4.9 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.	81
FIGURA 4.10 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.	82

FIGURA 4.11 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.	83
FIGURA 4.12 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.....	84
FIGURA 4.13 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 2 metros de profundidade.	90
FIGURA 4.14 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 2 metros de profundidade.	90
FIGURA 4.15 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 3 metros de profundidade.	91
FIGURA 4.16 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 3 metros de profundidade.	91
FIGURA 4.17 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 2 metros de profundidade.	92
FIGURA 4.18 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 2 metros de profundidade.	92
FIGURA 4.19 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 3 metros de profundidade.	93
FIGURA 4.20 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 3 metros de profundidade.	93
FIGURA 4.21 – Ácidos graxos voláteis detectados no experimento com B100: A) na Fonte; B) no PM09.	94
FIGURA 4.22 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.	97
FIGURA 4.23 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.....	98

FIGURA 4.24 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Benzeno; B) Tolueno; C) BTEX totais; D) Etilbenzeno; E) Xilenos totais; F) HPA totais.	99
FIGURA 4.25 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxidação-redução; C) Nitrito; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.	100
FIGURA 4.26 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.....	101
FIGURA 4.27 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Benzeno; B) Tolueno; C) BTEX totais; D) Etilbenzeno; E) Xilenos totais; F) HPA totais.	102
FIGURA 4.28 – Ácidos graxos voláteis no experimento com B20: A) na Fonte; B) no PM09.	104
FIGURA 4.29 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 2 metros de profundidade.	106
FIGURA 4.30 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 2 metros de profundidade.	106
FIGURA 4.31 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 3 metros de profundidade.	107
FIGURA 4.32 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 3 metros de profundidade.	107
FIGURA 4.33 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 2 metros de profundidade.	108
FIGURA 4.34 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 2 metros de profundidade.	108
FIGURA 4.35 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 3 metros de profundidade.	109
FIGURA 4.36 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 3 metros de profundidade.	109

FIGURA 4.37 – Concentrações remanescentes de acetato nos experimentos com B100 e B20, no nível 2 metros dos poços Fonte e PM09.115	
FIGURA 4.38 – Concentrações de metano detectadas nos experimentos com B100 e B20, no nível 2 metros dos poços Fonte e PM09.115	
FIGURA 4.39 – Ácidos graxos voláteis nos poços Fonte dos experimentos com A) B100 e B) B20.....	117
FIGURA 4.40 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido linoleico (18:2) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.1), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.	121
FIGURA 4.41 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido oleico (18:1) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.2), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.....	121
FIGURA 4.42 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido esteárico (18:0) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.3), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.	122
FIGURA 4.43 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido palmítico (16:0) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.4), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.	122
FIGURA 4.44 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de benzeno no B20 (1 mg.L ⁻¹) a acetato e hidrogênio (Reações 4.21 e 4.29), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.	128
FIGURA 4.45 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de naftaleno no B20 (0,12 mg.L ⁻¹) a acetato e hidrogênio (Reações 4.25 e 4.33), para uma faixa de pressões de H ₂ de 10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁶ atm.	128
FIGURA 4.46 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de benzeno no B20 (1 mg.L ⁻¹) a acetato apenas (Reações 4.37 e 4.45).	129
FIGURA 4.47 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de naftaleno no B20 (0,12 mg.L ⁻¹) a acetato apenas (Reações 4.41 e 4.48).	129
FIGURA 4.48 – Comportamentos dos diferentes biocombustíveis na água subterrânea, em relação ao tempo (t): A) Etanol (altamente solúvel) - fonte móvel de contaminação; B) Biodiesel (pouco solúvel) - fonte fixa de contaminação.	131

FIGURA A 1 – Variação vertical das concentrações de oxigênio detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	160
FIGURA A 2 – Variação vertical do potencial de oxidação-redução medido no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	160
FIGURA A 3 – Variação vertical das concentrações de nitrato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	161
FIGURA A 4 – Variação vertical das concentrações de ferro II detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	161
FIGURA A 5 – Variação vertical das concentrações de sulfato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	162
FIGURA A 6 – Variação vertical das concentrações de sulfeto detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	162
FIGURA A 7 – Variação vertical das concentrações de metano detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	163
FIGURA A 8 – Variação vertical das concentrações de acetato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	163
FIGURA A 9 – Variação vertical das concentrações representativas de acidez detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	164
FIGURA A 10 – Variação vertical das concentrações representativas de alcalinidade detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	164
FIGURA A 11 – Variação vertical do pH detectado no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	165
FIGURA A 12 – Variação vertical das concentrações de brometo detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	165

FIGURA B 1 – Variação vertical das concentrações de oxigênio detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	166
FIGURA B 2 – Variação vertical do potencial de oxidação-redução medido no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	166
FIGURA B 3 – Variação vertical das concentrações de nitrato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	167
FIGURA B 4 – Variação vertical das concentrações de ferro II detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	167
FIGURA B 5 – Variação vertical das concentrações de sulfato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	168
FIGURA B 6 – Variação vertical das concentrações de sulfeto detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	168
FIGURA B 7 – Variação vertical das concentrações de metano detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	169
FIGURA B 8 – Variação vertical das concentrações de acetato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	169
FIGURA B 9 – Variação vertical das concentrações representativas de acidez detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	170
FIGURA B 10 – Variação vertical das concentrações representativas de alcalinidade detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	170
FIGURA B 11 – Variação vertical do pH detectado no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	171
FIGURA B 12 – Variação vertical das concentrações de brometo detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	171
FIGURA B 13 – Variação vertical das concentrações de benzeno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	172
FIGURA B 14 – Variação vertical das concentrações de tolueno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.....	172

FIGURA B 15 – Variação vertical das concentrações de etilbenzeno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	173
FIGURA B 16 – Variação vertical das concentrações de xilenos detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	173
FIGURA B 17 – Variação vertical das concentrações de BTEX totais detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	174
FIGURA B 18 – Variação vertical das concentrações de HPA totais detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.	174

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Composição química de um óleo de soja.	7
TABELA 2.2 – Principais propriedades físico-químicas dos ésteres metílicos constituintes do biodiesel de soja.	10
TABELA 2.3 – Proporções em massa dos diferentes compostos do diesel.	13
TABELA 2.4 – Principais propriedades físico-químicas dos compostos BTEX e HPA.	17
TABELA 2.5 – Degradação de um AGCL via β -oxidação.	29
TABELA 2.6 – Reações de conversão do acetato e do hidrogênio a metano. ...	30
TABELA 3.1 – Nível da água ao redor da área de liberação dos produtos.	52
TABELA 4.1 – Resultado das análises granulométricas realizadas nas diferentes camadas de solo encontradas na área experimental.	68
TABELA 4.2 – Argilominerais detectados nas diferentes camadas de solo da área experimental.	71
TABELA 4.3 – Resultado da análise da porosidade efetiva (η_e).	73
TABELA 4.4 – Caracterização da água subterrânea antes da liberação dos produtos.	74
TABELA 4.5 – Resultado da determinação de matéria orgânica e macronutrientes no solo.	75
TABELA 4.6 – Resultado da determinação de micronutrientes no solo.	75
TABELA 4.7 – Períodos em que foram realizados os monitoramentos nas áreas B100 e B20.	77
TABELA 4.8 – Reações de transformação dos principais AGCL presentes no biodiesel.	87
TABELA 4.9 – Reações de oxidação-redução para consumo de acetato, segundo o modelo energético de biodegradação de McCarty. .	88
TABELA 4.10 – Relações estequiométricas para o consumo de acetato.	89
TABELA 4.11 – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do ácido linoleico (biodiesel). Possíveis rotas A e B.	113
TABELA 4.12 – Reações para consumo de propionato e butirato.	116
TABELA 4.13 – Grandezas utilizadas no cálculo da solubilidade efetiva ($S_{ef,w}$) dos principais compostos hidrolisados do biodiesel (AGCL).	119

TABELA 4.14 – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do benzeno e do naftaleno (diesel fóssil). Possíveis rotas A, B, C e D.....	125
TABELA 4.15 (<i>Cont.</i>) – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do benzeno e do naftaleno (diesel fóssil). Possíveis rotas A, B, C e D.....	126
TABELA C.1 – Meias-reações de síntese celular (<i>Rc</i>), dos receptores de elétrons (<i>Rr</i>) e dos doadores de elétrons (<i>Rd</i>).	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGCL	Ácidos graxos de cadeias longas
AGV	Ácidos graxos voláteis
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APHA	<i>American Public Health Association</i>
APOH	Bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
B100	Biodiesel - combustível composto de 100% em volume de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais
B20	Mistura óleo diesel/biodiesel – BX – combustível comercial composto de (100-X)% em volume de óleo diesel e X% em volume de biodiesel
BTEX	Hidrocarbonetos monoaromáticos B - benzeno, T - tolueno, E - etilbenzeno e X - xilenos totais
C.O.	Carbono orgânico
CENPES	Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello
CG	Cromatografia gasosa ou Cromatógrafo a gás
CIDASC	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
CoA	Coenzima A
D100	Combustível composto de 100% em volume de óleo diesel
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxigênio de 5 dias
DECEA	Departamento de Controle do Espaço Aéreo
DNA	Ácido desoxirribonucléico (sigla do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DQO	Demanda química de oxigênio
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos (sigla do inglês <i>fatty acid methyl esters</i>)

FID	Detector por ionização em chama (sigla do inglês <i>flame ionization detector</i>)
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
LCFA	Ácidos graxos de cadeias longas (sigla do inglês <i>long chain fatty acids</i>)
LNAPL	Fase livre leve não aquosa (sigla do inglês <i>light nonaqueous-phase liquid</i>)
M.O.	Matéria orgânica
N.T.	Nitrogênio total
NADH	Forma reduzida da Nicotinamida adenina dinucleotídeo (sigla do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NAPL	Fase livre não aquosa (sigla do inglês <i>nonaqueous-phase liquid</i>)
NBR	Norma Brasileira
PE	Ponto de ebulição
PE	Poço estratigráfico
PEBD	Poliétileno de baixa densidade
PF	Ponto de fusão
PM	Poço de monitoramento
PMF	Poço de monitoramento da Fonte
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PVC	Policloreto de vinila
PZ	Piezômetro
qPCR	Reação em cadeia da polimerase, quantitativo, em tempo real (sigla do inglês <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
R	Radical correspondente à cadeia carbônica composta somente por carbono e hidrogênio
Redox	Oxidação-redução
REMAS	Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas
RNA	Ácido ribonucleico (sigla do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
s/d	Sem data
SST	Sólidos suspensos totais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (sigla do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
v/v	Relação volume/volume
VDA	Associação da Indústria Automotiva Alemã (do alemão <i>Verband der Automobilindustrie</i>)
w/w	Relação massa/massa (sigla do inglês, <i>weight/weight</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

16:0	Representação da cadeia carbônica de um ácido graxo. O primeiro número indica o número total de átomos de carbono na cadeia e o segundo, a quantia de insaturações presentes na molécula
C18	Representação do número total de átomos de carbono presentes numa molécula
dH/dL	Gradiente hidráulico
ΔG	Energia livre de Gibb's em condições ambiente
ΔG°	Energia livre de Gibb's em condições padrão
Eh^0	Potencial de oxidação-redução
K_{sat}	Condutividade hidráulica saturada
K_H	Constante da Lei de Henry
K_{oc}	Coefficiente de partição carbono orgânico/água
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
η_e	Porosidade efetiva
pH	Potencial hidrogeniônico
P^o	Pressão de vapor exercida por um composto
v	Velocidade intersticial da água subterrânea através dos poros do solo

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1.HIPÓTESE	4
1.2.OBJETIVOS.....	4
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1.CARACTERIZAÇÃO DOS CONTAMINANTES	5
2.1.1. Biodiesel.....	5
2.1.2. Diesel.....	12
2.2.DISTRIBUIÇÃO DOS CONTAMINANTES NA SUBSUPERFÍCIE	18
2.3.INFLUÊNCIA DO BIODIESEL NA DEGRADAÇÃO E NO TRANSPORTE DO DIESEL	19
2.4.BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA.....	23
2.4.1. Biodegradação anaeróbia do biodiesel	28
2.4.2. Biodegradação anaeróbia dos compostos aromáticos do diesel.....	30
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	38
3.1.1. Caracterização hidrogeológica da área	40
3.1.2. Caracterização hidrogeoquímica da área	46
3.2.EXPERIMENTOS DE CAMPO	47
3.2.1. Fontes de contaminação	51
3.2.2. Amostragem da água subterrânea e determinações analíticas	56
3.3.ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	60
3.3.1. Extração de DNA	60
3.3.2. PCR quantitativo (<i>qPCR</i>).....	61
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1.CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA ÁREA EXPERIMENTAL	62
4.1.1. Caracterização hidrogeológica	62
4.1.2. Caracterização hidrogeoquímica	73
4.1.3. Análises microbiológicas.....	76
4.2.MONITORAMENTO DOS EXPERIMENTOS DE CAMPO.....	76
4.2.1. Experimento com 100 litros de biodiesel puro de soja (B100).....	80

4.2.2. Experimento com 100 litros da mistura diesel/biodiesel (B20)	96
4.2.3. Implicações biogeoquímicas das diferentes cargas orgânicas liberadas de biodiesel	111
4.2.4. Influência do biodiesel no processo de degradação dos combustíveis fósseis	123
5.CONCLUSÕES.....	133
RECOMENDAÇÕES.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
APÊNDICE A – Variação das concentrações detectadas no experimento com B100, por profundidade e ao longo do tempo.	160
APÊNDICE B – Variação das concentrações detectadas no experimento com B20, por profundidade e ao longo do tempo.....	166
APÊNDICE C – Reações de oxidação-redução para consumo de acetato segundo o modelo energético de biodegradação de McCarty.	175
APÊNDICE D – Determinação das concentrações de acetato transformadas nos diferentes processos redox.	184
ANEXO A – Laudo analítico do biodiesel puro de soja utilizado nos experimentos.	189
ANEXO B – Laudo técnico das análises qualitativas feitas pelo cenpes para as amostras de combustíveis B100 e B20.	190

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial de energia, a crise no fornecimento de óleo mineral e a vigência do Protocolo de Kyoto, reascenderam a necessidade por fontes alternativas de energia. A implementação do uso de biocombustíveis, como o biodiesel, no setor de transportes foi uma das soluções encontradas para diminuir a dependência do uso do óleo fóssil e a poluição atmosférica gerada pelos gases formados durante a queima do combustível mineral. No Brasil, desde janeiro de 2005, o Governo passou a autorizar a adição de biodiesel ao diesel comercial brasileiro numa fração de 2% em volume. A obrigatoriedade de se cumprir, no mínimo, esse percentual teve início a partir de janeiro de 2008 (BRASIL, 2005). Em julho de 2008, o percentual obrigatório passou a ser de 3%, segundo decisão do Conselho Nacional de Política Energética (BRASIL, 2008) e, desde janeiro de 2010, um máximo de 5% tem sido obrigatório (BRASIL, 2009). Além do Brasil, os países da União Européia têm discutido um plano para elevar em 10%, até 2020, a cota obrigatória de biocombustível que a gasolina e o diesel devem conter (UNIÃO EUROPEIA, 2007). Na Alemanha, a Associação da Indústria Automotiva Alemã (VDA) instituiu, em fevereiro de 2006, a mistura voluntária de 10% de biocombustíveis para motores a diesel e gasolina (BIODIESEL BR, 2008).

O biodiesel é definido, segundo a Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, como um *“biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”* (BRASIL, 2005). Dentre as espécies de plantas oleaginosas estudadas para a produção nacional de biodiesel estão a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão-manso, o caroço de algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim, além de outras potencialmente viáveis (PARENTE, 2003; RAMOS et al., 2003). Uma análise do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) revelou que a cultura da soja tem sido, até o momento, o sustentáculo de boa parte da produção nacional de biodiesel. Dada a grandeza do agronegócio da soja no mercado brasileiro, essa oleaginosa apresenta a escala necessária para atender as metas do PNPB (CÂMARA, 2006). Estima-se que a soja responda por 90% da base de produção de biodiesel. A mamona, ao contrário, defendida pelo governo como alternativa ideal para a inserção da agricultura familiar na cadeia

de produção de biodiesel, tem sido descartada pela maioria dos fabricantes deste biocombustível, uma vez que a Agência Nacional do Petróleo (ANP) considera a viscosidade desta oleaginosa imprópria para a produção de combustível sem a adição do óleo de outras matérias-primas (ANP, 2008).

Uma vez que é obtido a partir de óleos vegetais, ou até mesmo de gorduras animais, o biodiesel apresenta as vantagens de ser renovável e mais biodegradável em relação aos combustíveis de origem fóssil (ZHANG et al., 1998; LEUNG et al., 2005; DEMELLO et al., 2007; PRINCE et al., 2008). Desta forma, a produção de biodiesel tem crescido no Brasil e no mundo. A produção em larga escala, no entanto, traz consigo riscos de acidentes envolvendo a liberação deste produto no meio ambiente. Atualmente, não há disponibilidade de pesquisas científicas em escala real sobre os impactos decorrentes da interação do biodiesel com o solo e a água subterrânea no caso de eventuais derramamentos no ambiente. Além disso, há uma grande tendência de que estes combustíveis alternativos estejam armazenados próximos aos combustíveis fósseis, ou misturados a eles no caso de sistemas de distribuição (ex. postos de abastecimento), e, em caso de acidentes, os impactos devido à inter-relação destas misturas no ambiente subsuperficial ainda são desconhecidos.

Estudos desenvolvidos em escala de laboratório mostraram que o biodiesel puro (B100) degrada aerobiamente muito mais rápido do que o diesel fóssil em ambiente marinho. E que, sob estas mesmas condições, em misturas diesel/biodiesel, os micro-organismos usam o biodiesel como fonte de energia para promover a biodegradação do diesel, metabolizando os ésteres do biodiesel e os hidrocarbonetos alifáticos do diesel ao mesmo tempo e, aproximadamente, nas mesmas razões (ZHANG et al., 1998; DEMELLO et al., 2007; PRINCE et al., 2008). No entanto, em relação aos hidrocarbonetos monoaromáticos constituintes dos produtos derivados de petróleo, estudos desenvolvidos em microcosmos anaeróbios, com microorganismos não adaptados, revelaram que a presença do biodiesel de soja influencia negativamente a biodegradação destes compostos. Para concentrações iniciais de 2,9 mg.L⁻¹ de benzeno, 0,8 mg.L⁻¹ de tolueno, 0,25 mg.L⁻¹ de etilbenzeno e 0,12 mg.L⁻¹ de xilenos, durante um período de incubação de 34 dias, na ausência do biodiesel, houve uma remoção de 90%, 100%, 80% e 70% destes compostos, respectivamente. Já na presença de 54,8 mg.L⁻¹ de biodiesel de soja, essa remoção foi de 35% para o benzeno, 100% para o tolueno e 60% para o etilbenzeno e para os xilenos, durante o mesmo período de incubação. No caso específico do tolueno, a sua completa

degradação foi mais rápida na ausência do biodiesel de soja (25 dias) do que na presença do mesmo (34 dias) (GOMES, 2008; CORSEUIL et al., 2011b).

Outros experimentos de laboratório mostraram que a estrutura molecular dos ésteres que compõem o biodiesel é muito semelhante à de compostos surfactantes. E, para as misturas com diesel em que o biodiesel esteja presente em frações acima de 20% em volume, os ésteres podem reduzir a tensão superficial óleo-água (DEMELLO et al., 2007). Este efeito tornaria os compostos do diesel mais solúveis em água, o que poderia facilitar o transporte e intensificar os impactos de uma contaminação. Por outro lado, o aumento na taxa de dissolução dos hidrocarbonetos do diesel, poderia torná-los mais biodisponíveis, o que promoveria a degradação deste combustível (TAYLOR e JONES, 2001).

Experimentos em escala de campo desenvolvidos para avaliação da influência da utilização de outros biocombustíveis, como o etanol, na biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos contidos na gasolina mostraram que o etanol retarda a degradação natural dos compostos aromáticos enquanto estiver presente na água subterrânea (CORSEUIL et al., 2004; CORSEUIL et al., 2005; NUNES e CORSEUIL, 2007; CORSEUIL et al., 2011a). A sua maior biodisponibilidade e mais fácil degradação o torna preferencialmente degradável em relação aos compostos aromáticos da gasolina. Da mesma forma, para o caso de misturas diesel/biodiesel liberadas no ambiente subterrâneo, acredita-se que o biodiesel também será prioritariamente degradado em relação aos aromáticos do diesel. No entanto, derramamentos de misturas de hidrocarbonetos de petróleo com etanol ou biodiesel podem ter comportamentos distintos devido à grande diferença de solubilidade destes biocombustíveis. O etanol é completamente solúvel em água e, por esse motivo, transfere-se rapidamente para a fase dissolvida, podendo se espalhar por uma área maior e para mais longe da fonte de contaminação, juntamente com o fluxo da água subterrânea. Já o biodiesel, por sua baixa solubilidade, tende a permanecer na fonte, transferindo-se lentamente para a água subterrânea e influenciando uma área menor. O efeito do biodiesel na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode, portanto, ser completamente diferente do observado para o etanol e estas diferenças podem indicar soluções de remediação completamente diferentes para áreas impactadas por misturas com esses biocombustíveis.

1.1. HIPÓTESE

A insuficiência de informações relativas à interação do biodiesel no meio ambiente e a exigência em se adicionar este biocombustível ao diesel comercialmente distribuído no Brasil, motivaram a realização deste estudo e a formulação da seguinte *hipótese*:

Em derramamentos subsuperficiais de misturas de diesel e biodiesel, a lenta mobilidade e biodegradação do biodiesel na região da fonte tornam o ambiente anaeróbio por longos períodos, o que pode influenciar negativamente a biodegradação dos compostos aromáticos presentes nestas misturas.

1.2. OBJETIVOS

Levando esses fatos em consideração, 100 litros de biodiesel puro de soja (B100) e 100 litros da mistura B20 (20% em volume do biodiesel metílico derivado de óleo de soja e 80% em volume de diesel fóssil) foram liberados na água subterrânea de dois experimentos controlados e independentes, com o *objetivo geral* de avaliar como as alterações biogeoquímicas que ocorrem com a degradação de diferentes cargas orgânicas de biodiesel na água subterrânea podem influenciar a degradação dos principais compostos aromáticos em misturas diesel/biodiesel. E como *objetivos específicos*:

- ✓ Avaliar as principais alterações biogeoquímicas provocadas pela liberação de diferentes volumes de biodiesel de soja que influenciam a biodegradação deste biocombustível na água subterrânea;
- ✓ Avaliar a influência da presença de biodiesel na biodegradação dos compostos aromáticos do diesel para a mistura B20;
- ✓ Avaliar a influência do acúmulo de subprodutos na biodegradação do biodiesel puro e dos compostos aromáticos do diesel fóssil, no caso de uma mistura;
- ✓ Investigar se o acúmulo dos produtos da degradação do biodiesel no meio pode inibir termodinamicamente a degradação dos compostos aromáticos do diesel fóssil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS CONTAMINANTES

2.1.1. Biodiesel

O biodiesel é considerado um combustível composto de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (ANP, 2004; ANP, 2008). Os óleos vegetais são predominantemente compostos por triglicerídeos, ou seja, triésteres resultantes da combinação de glicerol (um álcool trivalente) com ácidos graxos. Estes últimos são ácidos orgânicos lineares que diferem entre si pelo número de carbonos e pela presença de insaturações em sua cadeia. A configuração básica de um ácido graxo corresponde a uma cadeia hidrocarbônica alifática (hidrofóbica) e um grupamento carboxila terminal ($-\text{COOH}$). Para a obtenção do biodiesel, o processo comumente utilizado é a transesterificação. Esse processo ocorre na presença de álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol) e de catalisadores (ácidos ou básicos): as moléculas de álcool rompem as ligações covalentes dos triglicerídeos através da transferência de hidrogênios, formando ésteres alquílicos de ácidos graxos (o biodiesel, propriamente dito) e glicerol (FREEDMAN, 1984; LEHNINGER et al., 1993). A FIGURA 2.1 a seguir mostra esta transformação. Os radicais R_n correspondem à cadeia carbônica dos ácidos graxos constituintes do óleo vegetal, em que R_n varia de 16 a 20 átomos de carbonos (VIANI, 1996); os radicais R' referem-se à cadeia carbônica do álcool utilizado na reação, em que $R' = 1$ para o metanol ou $R' = 2$ se for utilizado o etanol como reagente.

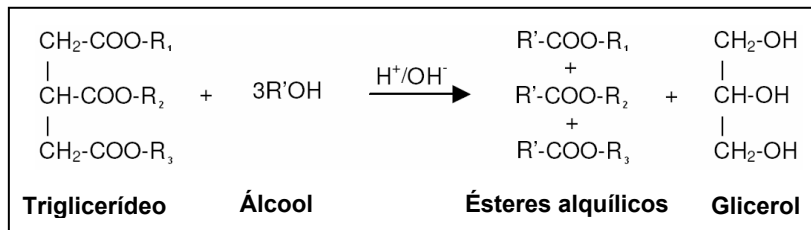


FIGURA 2.1 – Reação de transesterificação para a formação do biodiesel.

Dentre as várias alternativas de oleaginosas para a produção de biodiesel no Brasil, a soja continua sendo a matéria-prima mais utilizada, principalmente devido às características agrônomicas favoráveis, à ampla estrutura e experiência de produção e comercialização e ao maior domínio tecnológico em relação às demais oleaginosas (SERUYA, 1991; CÂMARA, 2006; CÂMARA, et al., s/d). Os principais constituintes do óleo de soja são os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3)¹, cuja proporção relativa é mantida aproximadamente constante após a reação de transesterificação. Um exemplo de constituição típica de um óleo de soja pode ser visualizado na TABELA 2.1 (SERUYA, 1991; NDIAYE et al., 2006). Quanto ao agente transesterificante (álcool primário), apesar da produção brasileira em larga escala favorecer a aplicação de etanol anidro, a preferência ainda é pelo metanol. Isto ocorre porque a alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que aquela realizada com etanol, pois oferece menor consumo de reagente, menor custo, menor tempo de reação, além do fato de o metanol apresentar menor afinidade à glicerina, o que favorece o processo posterior de separação (BRASIL, 1985; FREEDMAN et al., 1986). Desta forma, os principais compostos constituintes do biodiesel de soja, obtido a partir da reação de transesterificação com metanol, são os ésteres metílicos dos ácidos graxos anteriormente citados, cujas estruturas moleculares podem ser visualizadas na FIGURA 2.2.

¹ Os ácidos graxos são representados por dois números: o primeiro indica o número total de átomos de carbono na cadeia e o segundo, a quantia de insaturações presentes na molécula.

TABELA 2.1 – Composição química de um óleo de soja.

Ácido Graxo	Percentual no óleo de soja
Palmítico	11,3 ± 0,1
Estearico	3,5 ± 0,1
Oleico	23,6 ± 0,1
Linoleico	54,7 ± 0,1
Linolênico	6,9 ± 0,1

FONTE: NDIAYE et al., 2006.

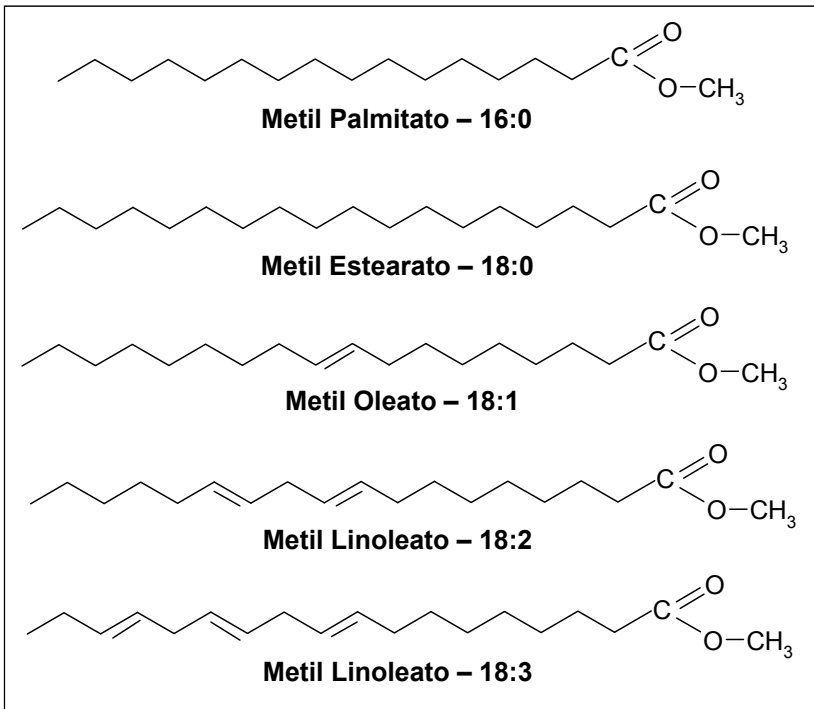


FIGURA 2.2 – Estruturas químicas dos principais ésteres metílicos do óleo de soja.

A importância de se conhecer a estrutura química de um composto está no fato de que é ela que vai determinar as propriedades físico-químicas do composto e, desta forma, seu comportamento e distribuição no ambiente. A TABELA 2.2 mostra algumas propriedades importantes dos ésteres metílicos que constituem o biodiesel de soja. Destas propriedades, as que mais exercem influência sobre a mobilidade dos compostos orgânicos são a massa molecular, a solubilidade em água, a pressão de vapor e os coeficientes de partição entre os meios, como a constante da Lei de Henry e os coeficientes de partição octanol/água e carbono orgânico/água (SCHWARZENBACH et al., 2003). A massa molecular se relaciona à densidade e à solubilidade dos compostos orgânicos em água: em geral, quanto maior a massa molecular, maior será a densidade relativa do composto (relação entre a densidade do composto e a densidade da água) e, quanto maior o comprimento das cadeias de carbono, menor a solubilidade do composto orgânico na água. No caso dos ésteres metílicos, no entanto, apesar da longa cadeia carbônica, as densidades relativas permanecem menores que a densidade da água e, desta forma, quando liberados no ambiente subterrâneo, estes compostos tendem a flotar no topo da franja capilar do lençol freático. Quanto à solubilidade, uma vez que ela representa a máxima concentração de um composto dissolvido na água, moléculas altamente solúveis são rapidamente distribuídas na água subterrânea. No caso dos ésteres metílicos, a hidrofobicidade da longa cadeia carbônica torna a molécula praticamente insolúvel em água. Entretanto, com a diminuição do peso molecular, a solubilidade da molécula aumenta, como resultado da ligação de hidrogênio entre a água e o oxigênio carboxílico. No caso de misturas líquidas, como o biodiesel, por exemplo, a máxima concentração aquosa de um constituinte i (a solubilidade efetiva) pode ser definida através da Lei de Raoult, em função da fração molar do constituinte na mistura e da solubilidade aquosa do composto puro.

A pressão de vapor e a constante da Lei de Henry são duas medidas da tendência de um sólido ou líquido se volatilizarem e são importantes para estimar a liberação do composto para a fase de vapor. A pressão de vapor, P^o , de um composto é a pressão que o vapor exerce quando em equilíbrio com suas formas puras, líquida ou sólida. De maneira geral, quanto maior a pressão de vapor de um composto, mais rapidamente ele particionará para a fase de vapor (SCHWARZENBACH et al., 2003). Da mesma forma como para a solubilidade de um composto na água, a pressão parcial de um constituinte i numa mistura líquida também pode ser definida através da

Lei de Raoult, como resultado do produto da fração molar de i na mistura e a pressão de vapor do constituinte i em equilíbrio com sua forma líquida pura.

Já a constante da Lei de Henry, K_H , mede a tendência de partição de um composto dissolvido em água para a fase de vapor e, desta forma, pode ser usada para estimar a probabilidade de um constituinte dissolvido na umidade do solo ou na água subterrânea em particionar para o ar presente nos poros do solo (USEPA, 1997). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (a *USEPA – United States Environmental Protection Agency*), um composto orgânico é considerado volátil quando apresenta constante da Lei de Henry maior que 10^{-5} atm.m³.mol⁻¹ (ou $K_H > 4,1 \times 10^{-4}$ a 25°C), pressão de vapor maior ou igual a 10^{-7} mm Hg (ou $\geq 1,32 \times 10^{-10}$ atm) e cuja massa molecular é menor que 200 g.mol⁻¹ (USEPA, 1996b). Desta forma, pela observação da TABELA 2.2, percebe-se que os ésteres metílicos de interesse apresentam baixa tendência à volatilização, principalmente devido a suas elevadas massas moleculares.

Os coeficientes de partição octanol/água e carbono orgânico/água são indicativos do potencial de um contaminante orgânico estar associado/sorvido ao solo. O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é definido como a razão entre as solubilidades de um composto orgânico no n-octanol e na água, em equilíbrio. Desta forma, o K_{ow} descreve a tendência de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa. Quanto maior esta relação, maior a hidrofobicidade do composto. O K_{oc} (coeficiente de partição carbono orgânico/água) estabelece a relação entre a quantidade de composto sorvida no carbono natural presente no solo (em mg/kg) e a quantidade deste mesmo composto diluída na água, quando ambas as fases estão em equilíbrio. Estes coeficientes são importantes no conhecimento da mobilidade de um composto orgânico na matriz sólida de um aquífero, pois quanto menores seus valores, maior é o potencial de lixiviação do contaminante do solo para a água (BEDIENT et al., 1994). Os altos valores de K_{ow} e K_{oc} dos ésteres metílicos apresentados na TABELA 2.2 indicam, respectivamente, que se tratam de compostos com baixa capacidade de dissolução em água e alta capacidade adsorção a fases orgânicas que possam estar presentes no ambiente subterrâneo, características que lhes conferem baixa mobilidade.

TABELA 2.2 – Principais propriedades físico-químicas dos ésteres metílicos constituintes do biodiesel de soja.

Compostos	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	Densidade relativa	Solubilidade em água (25°C) (mg.L ⁻¹)	Pressão de Vapor (atm)	Constante da Lei de Henry (adimensional)	Log Kow (25°C)	Log Koc
Metil Palmitato	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,46	30,5 ⁽²⁾	415-418 ^(74/72)	0,852 ⁽⁵⁾	Insolúvel ⁽⁶⁾	4,99×10 ⁻⁸	1,37×10 ⁻¹	7,38	4,26
Metil Estereato	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,51	39,0 ⁽²⁾	442-443 ^(74/72)	0,850 ⁽⁵⁾	Insolúvel	5,85×10 ⁻⁹	2,34×10 ⁻¹	8,35	4,79
Metil Oleato	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,49	-20,0 ⁽²⁾	218,5 ^(20/2)	0,874	Insolúvel	9,72×10 ⁻⁹	3,23×10 ⁻²	7,45	4,79
Metil Linoleato	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,47 ⁽¹⁾	-35,0 ⁽²⁾	215,0 ^(20/2)	0,889	Insolúvel ⁽⁶⁾	1,15×10 ⁻⁸⁽⁷⁾	6,54×10 ⁻³⁽⁷⁾	6,82 ⁽⁷⁾	–
Metil Linolenato	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,46	-52,0 ⁽³⁾	182,0 ⁽³⁴⁾	0,895 ⁽⁵⁾	Insolúvel ⁽⁶⁾	1,14×10 ⁻⁸⁽⁷⁾	1,39×10 ⁻³⁽⁷⁾	6,29 ⁽⁷⁾	–

Notas: PF: Ponto de fusão; PE: Ponto de ebulição.

FONTE: TOXNET, 2008; ⁽¹⁾ NIST, 2008; ⁽²⁾ KNOTHE, 2005; ⁽³⁾ FOON et al., 2006; ⁽⁴⁾ SCIENCE LAB.COM, 2008; ⁽⁵⁾ SIGMA-ALDRICH, 2008; ⁽⁶⁾ TGSC, 2008; ⁽⁷⁾ KROP et al., 1997.

Em geral, o biodiesel apresenta número de cetano e viscosidade ligeiramente mais altos que o diesel e basicamente não possui enxofre. Pode ser usado diretamente nos motores a diesel, ou misturado ao diesel em qualquer proporção (B2, B5, B20, etc.). As propriedades do biodiesel são muito próximas àsquelas do diesel, favorecendo a homogeneidade da mistura e por isso não são necessárias proporções fixas e bem definidas como numa mistura de diesel e etanol, em que o conteúdo de água no álcool pode provocar a separação das fases (DE CARO et al., 2001). O biodiesel tende a ser mais suscetível a biodeterioração do que o óleo diesel convencional, devido à presença de cadeias C₁₆-C₁₈ (ácidos graxos) que são facilmente degradadas pelos micro-organismos, ausência de moléculas aromáticas, algumas propriedades higroscópicas e a disponibilidade de ligações éster de alta energia.

Para que as concentrações dos ésteres possam ser monitoradas ao longo do estudo é importante que se faça uma caracterização prévia do produto a ser liberado para experimentação. Um cromatograma típico de uma amostra de B100 de soja foi obtido por DeMello et al. (2007) e pode ser visualizado na FIGURA 2.3.

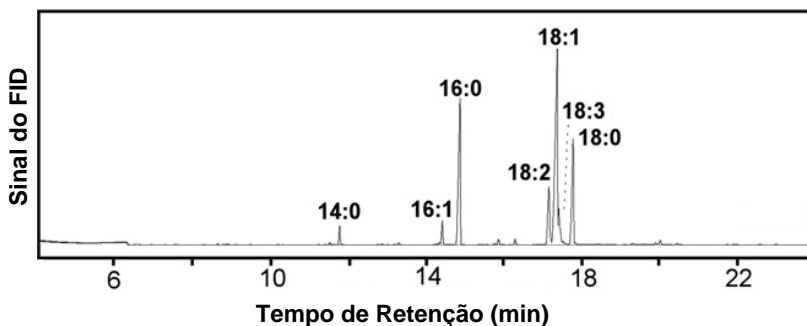


FIGURA 2.3 – Cromatograma típico de B100.

FONTE: DEMELLO et al., 2007.

2.1.2. Diesel

O óleo diesel é um dos tipos de óleos combustíveis produzidos a partir do petróleo cru. Os óleos combustíveis são refinados até atenderem especificações definidas para um determinado uso. No caso do óleo diesel, suas especificações são definidas para que ele seja usado para o transporte, nos veículos providos de motor diesel (ATSDR, 1995) (nome dado ao motor de ignição por compressão, desenvolvido por Rudolf Diesel no século XIX).

Em geral, os óleos combustíveis são misturas complexas de hidrocarbonetos alifáticos (parafinas, naftenos e olefinas) e aromáticos. Também podem conter pequenas quantidades de impurezas como o nitrogênio e o enxofre, além de aditivos. A exata composição química (i.e., o percentual preciso de cada constituinte) de cada óleo pode variar dependendo da fonte de petróleo e de fatores como o método de produção e os processos de destilação. Todos os óleos combustíveis são líquidos a temperatura ambiente, embora alguns de seus compostos possam evaporar. A maioria apresenta coloração amarelada, são inflamáveis e queimam a temperaturas entre 177°C e 329°C (ATSDR, 1995).

O óleo diesel é constituído, predominantemente, por hidrocarbonetos com cadeias de 10 a 19 átomos de carbono (ATSDR, 1995). Uma amostra de óleo diesel comercial brasileiro foi caracterizada no trabalho de Kaipper (2003). O resultado dessa caracterização pode ser observado na TABELA 2.3. No caso dessa amostra, 75,2% em massa dos hidrocarbonetos presentes eram alifáticos, dentre eles, somente 0,4% possuíam duplas ligações em suas cadeias (compostos olefínicos). Os 24,8% restantes correspondiam a hidrocarbonetos aromáticos: 17,7% monoaromáticos e 7,1% policíclicos aromáticos (os denominados HPA). Dos HPA detectados, 79% correspondiam a naftalenos (compostos com 2 anéis aromáticos), 19% a poliaromáticos de 3 anéis e o restante (2%), eram policíclicos de maior peso molecular (4 a 6 anéis).

TABELA 2.3 – Proporções em massa dos diferentes compostos do diesel.

Hidrocarbonetos		% em massa
Alifáticos	Saturados	74,8
	Olefinas	0,4
Aromáticos	Monoaromáticos	17,7
	Diaromáticos	5,0
	Poliaromáticos	2,1

FONTE: KAIPPER, 2003.

Da grande quantidade de compostos presentes nos derivados de petróleo, os hidrocarbonetos aromáticos (BTEX e HPA) são considerados os compostos de maior interesse nas investigações ambientais, pois, além da toxicidade, são compostos de difícil degradação, o que os tornam persistentes do meio ambiente. Os hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros *orto*, *para* e *meta* xilenos) podem ser rapidamente transportados através do solo e da água subterrânea devido a suas elevadas volatilidades e solubilidades, respectivamente, em relação aos demais compostos dos derivados do petróleo (AFCEE, 1998). Dentre os mais de 100 HPA existentes, 16 são considerados importantes pela ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e pela USEPA nas avaliações de risco toxicológico, pois são os mais frequentemente identificados em locais contaminados e com as maiores concentrações, além de serem os mais prejudiciais à saúde e os que possuem maior potencial para exposição ao ser humano. São eles: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, ideno(1,2,3-c,d)pireno e pireno (ATSDR, 2008). A FIGURA 2.4 e a FIGURA 2.5 representam as estruturas químicas destes compostos.

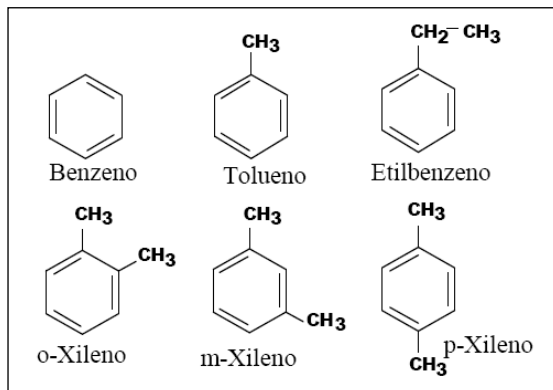


FIGURA 2.4 – Estruturas químicas dos compostos BTEX.

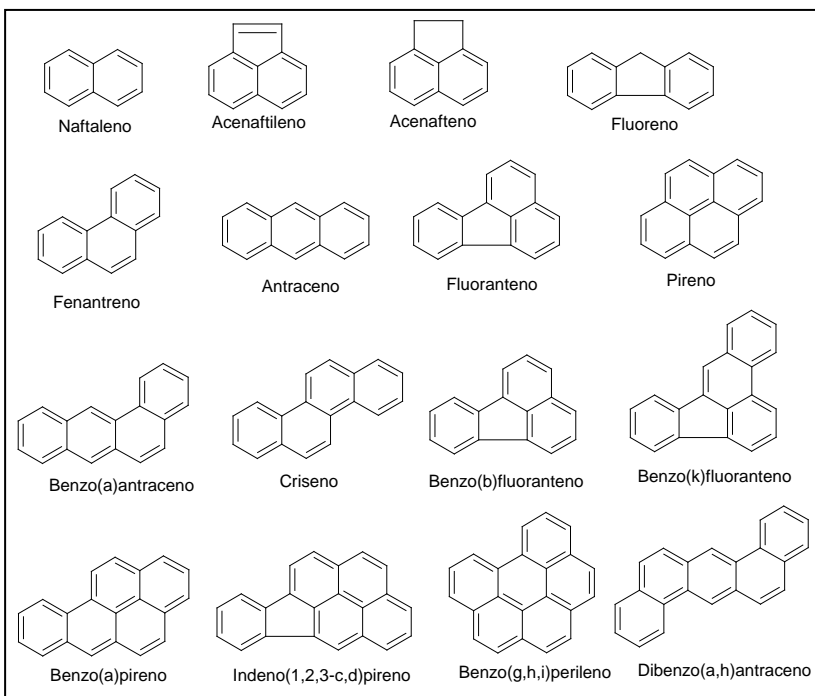


FIGURA 2.5 – Estruturas químicas dos principais compostos HPA.

Um cromatograma típico de uma amostra de diesel (D100) foi obtido por DeMello et al. (2007) e pode ser visualizado na FIGURA 2.6. Os picos numerados representam os n-alcenos com 12 a 24 átomos de carbono em suas cadeias lineares, enquanto que as letras F, Np, Pr, e Ph representam os isoprenóides farnesano, norpristano, pristano e fitano, respectivamente.

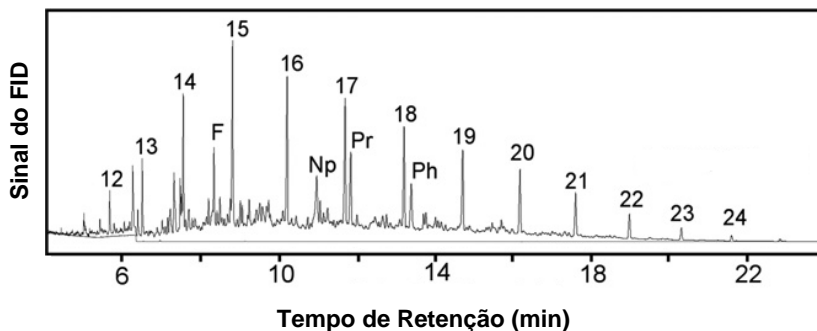


FIGURA 2.6 – Cromatograma típico de D100.
FONTE: DEMELLO et al., 2007.

Da mesma forma como citado no item 2.1.1, o comportamento dos hidrocarbonetos no ambiente subterrâneo será determinado por suas propriedades físico-químicas. A TABELA 2.4 mostra as principais propriedades dos hidrocarbonetos BTEX e HPA presentes no óleo diesel. Como pode ser observado, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos possuem maior número de carbonos que os hidrocarbonetos monoaromáticos. Em geral, quanto maior o número de átomos de carbono, maior é o peso molecular, maior a densidade relativa, menor a solubilidade em água e menor a pressão de vapor do hidrocarboneto (ASTM, 1995). Além do tamanho da cadeia carbônica, a solubilidade dos compostos aromáticos também diminui com o aumento do número de anéis, o que torna os HPA ainda mais insolúveis em água se comparados aos BTEX. Essa maior hidrofobicidade dos HPA, além de limitar sua mobilidade no ambiente subterrâneo, acaba por torná-los menos disponíveis para a degradação microbológica. No caso de misturas líquidas, como já citado, a máxima concentração aquosa de um constituinte *i* será definida através da Lei de Raoult. Kaipper (2003) determinou as frações molares dos principais constituintes de uma amostra de óleo diesel comercial brasileiro, bem como suas

concentrações aquosas de equilíbrio, as quais podem ser visualizadas na TABELA 2.4.

Quanto ao transporte vertical dos compostos na água subterrânea, este está associado à densidade relativa dos mesmos. Uma vez que os compostos constituintes dos óleos combustíveis são menos densos que a água, eles tendem a flotar no topo da franja capilar do lençol freático, assim como observado no item 2.1.1 para os ésteres metílicos.

Da mesma forma como a solubilidade do composto diminui com o aumento do peso molecular e com o número de anéis benzênicos, a volatilidade também decresce com o acréscimo desses fatores. Observando a TABELA 2.4, percebe-se que, dos compostos apresentados, aqueles com maior tendência a volatilizarem são os hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX, pois são os que apresentam menores massas moleculares, maiores pressões de vapor e constantes da Lei de Henry. Dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o naftaleno talvez merecesse atenção por apresentar propriedades parecidas com as dos BTEX, capazes de favorecer seu particionamento para a fase gasosa.

Ainda dentre os fatores que influenciam a mobilidade dos compostos no ambiente, estão os coeficientes octanol/água e carbono orgânico/água já definidos no item 2.1.1. Dos compostos aromáticos selecionados para esse estudo, percebe-se, pela observação da TABELA 2.4, que os monoaromáticos são os compostos que possuem menor afinidade lipofílica e sortiva, se comparados aos compostos policíclicos aromáticos, pois são os compostos que apresentam os menores valores para os coeficientes K_{ow} e K_{oc} .

Espera-se, portanto, que, em caso de derramamentos, os compostos monoaromáticos apresentem maior mobilidade no ambiente subterrâneo do que os compostos policíclicos aromáticos. Essa maior disponibilidade dos compostos BTEX pode promover uma competição na degradação dos constituintes da mistura, tornando os BTEX compostos preferencialmente degradáveis em relação aos HPA, o que favoreceria uma persistência ainda maior destes últimos no ambiente.

TABELA 2.4 – Principais propriedades físico-químicas dos compostos BTEX e HPA

Hydrocarbonetos	Fórmula	PE (°C)	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Densidade relativa	Solubilidade em água (25°C) (mg.L ⁻¹)	Solub. efetiva em água (1) (25°C) (mg.L ⁻¹)	Fração Molar (1)	Pressão de Vapor (atm)	Constante da Lei de Henry (adimensional)	Log Kow (25°C)	Koc
Benzeno	C ₆ H ₆	80,1	78,1	0,877	1780,0	8,58 (a)	5,50×10 ⁻³	1,25×10 ⁻¹	2,25×10 ⁻¹	2,13	8,12×10 ⁺¹
Tolueno	C ₇ H ₈	110,6	92,1	0,867	515,0	18,23 (a)	3,93×10 ⁻²	3,75×10 ⁻²	2,74×10 ⁻¹	2,69	2,34×10 ⁺²
Etilbenzeno	C ₈ H ₁₀	136,2	106,2	0,867	152,0	4,64 (a)	4,54×10 ⁻²	1,25×10 ⁻²	3,58×10 ⁻¹	3,13	5,37×10 ⁺²
p-Xileno	C ₈ H ₁₀	138,0	106,2	0,861	215,0			1,15×10 ⁻²	2,33×10 ⁻¹	3,18	5,90×10 ⁺²
m-Xileno	C ₈ H ₁₀	139,0	106,2	0,884	160,0	13,11 (a)	4,14×10 ⁻²	1,09×10 ⁻²	2,95×10 ⁻¹	3,20	6,12×10 ⁺²
o-Xileno	C ₈ H ₁₀	144,0	106,2	0,880	220,0	3,62 (a)	2,80×10 ⁻²	1,15×10 ⁻²	2,28×10 ⁻¹	3,15	5,57×10 ⁺²
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	218,0	128,2	1,030	31,0	1,45×10 ¹ (a)	1,26×10 ⁻³	3,63×10 ⁻⁴	1,74×10 ⁻²	3,37	8,44×10 ⁺²
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	270,0	152,2	0,890	16,1	4,00×10 ² (b)	2,37×10 ⁻⁶	4,09×10 ⁻⁵	3,39×10 ⁻³	4,00	2,77×10 ⁺³
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	277,5	154,2	1,190	3,8	1,09×10 ³ (b)	3,14×10 ⁻⁵	1,50×10 ⁻⁵	4,91×10 ⁻³	3,92	2,38×10 ⁺³
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	295,0	166,2	1,202	1,9	3,89×10 ³ (a)	1,52×10 ⁻⁴	7,06×10 ⁻⁶	3,19×10 ⁻³	4,18	3,90×10 ⁺³
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	339,0	178,2	1,030	1,1	5,37×10 ³ (a)	4,05×10 ⁻⁴	1,12×10 ⁻⁶	1,31×10 ⁻³	4,57	8,14×10 ⁺³
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	340,0	178,2	1,283	4,5×10 ⁻²	5,00×10 ⁵ (b)	1,22×10 ⁻⁵	7,68×10 ⁻⁷	1,60×10 ⁻³	4,54	7,69×10 ⁺³
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	375,0	202,3	1,252	2,6×10 ⁻¹	3,00×10 ⁵ (b)	1,32×10 ⁻⁵	8,61×10 ⁻⁸	4,17×10 ⁻⁴	5,22	2,78×10 ⁺⁴
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	360,0	202,3	1,271	1,3×10 ⁻¹	7,00×10 ⁵ (b)	2,37×10 ⁻⁵	1,17×10 ⁻⁷	3,71×10 ⁻⁴	5,18	2,57×10 ⁺⁴
Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂	435,0	228,3	1,254	1,1×10 ⁻²	4,00×10 ⁶ (b)	2,07×10 ⁻⁵	5,98×10 ⁻⁹	2,34×10 ⁻⁴	5,91	1,02×10 ⁺⁵
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	448,0	228,3	1,274	1,5×10 ⁻³	6,00×10 ⁶ (b)	1,52×10 ⁻⁵	1,06×10 ⁻⁹	1,80×10 ⁻⁴	5,79	8,14×10 ⁺⁴
Benzo(b)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	481,0	252,3	-	1,5×10 ⁻³	-	2,30×10 ⁻⁶	6,67×10 ⁻⁸	-	5,80	8,30×10 ⁺⁴
Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	481,0	252,3	-	8,0×10 ⁻⁴	-	-	4,07×10 ⁻¹¹	6,46×10 ⁻⁶	6,00	1,21×10 ⁺⁵
Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	495,0	252,3	-	3,8×10 ⁻³	-	-	2,10×10 ⁻¹⁰	1,86×10 ⁻⁵	6,04	1,31×10 ⁺⁵
Indeno(1,2,3-cd)pireno	C ₂₂ H ₁₂	536,0	276,3	-	6,2×10 ⁻²	-	-	1,00×10 ⁻⁹	2,07×10 ⁻¹¹	7,00	8,00×10 ⁺⁵
Benzo(ghi)perileno	C ₂₂ H ₁₂	525,0	268,4	-	3,0×10 ⁻⁴	-	-	2,22×10 ⁻¹⁰	3,03×10 ⁻⁵	6,50	3,11×10 ⁺⁵
Dibenzo(ab)antraceno	C ₂₂ H ₁₄	524,0	278,4	1,280	5,0×10 ⁻⁴	-	-	1,33×10 ⁻⁸	3,07×10 ⁻⁶	6,75	4,99×10 ⁺⁵

Notas: PE: Ponto de ebulição; (a) obtidas experimentalmente; (b) estimadas pela Lei de Raoult.

FONTE: TPHCWG, 1997; (1) KAIPPER, 2003.

2.2. DISTRIBUIÇÃO DOS CONTAMINANTES NA SUBSUPERFÍCIE

Uma vez no ambiente subterrâneo, os produtos derivados do petróleo tendem a se propagar através das zonas vadosa (que compreende a zona não saturada e a região da franja capilar) e saturada do solo, podendo se apresentar em quatro estados distintos: como fase livre não aquosa ou produto puro (LNAPL, do inglês *nonaqueous-phase liquid*), sorvidos na matriz do solo, volatilizados na fração gasosa do solo ou dissolvidos na água (WIEDEMEIER et al., 1999). Produtos do petróleo como a gasolina e o óleo diesel são tipicamente classificados como LNAPL (*light nonaqueous-phase liquid*), pois, além da baixa solubilidade da maioria dos seus constituintes, têm suas densidades menores que a densidade da água. Desta forma, num primeiro momento em contato com o ambiente, o LNAPL migrará através da zona não saturada como uma fase separada, imiscível, sob a influência dominante da gravidade, preenchendo espaços intersticiais do solo e deixando massas residuais por onde for passando. Uma vez que o LNAPL alcance a região da franja capilar, começará a se espalhar lateralmente e a se mover na direção em que o gradiente hidráulico é decrescente, formando uma mancha flutuante de produto livre. Durante todo esse movimento, o LNAPL está tanto em contato com a água subterrânea quanto com o ar que preenche os poros do solo, favorecendo a ocorrência de dois outros processos que contribuem para o transporte dos contaminantes através da subsuperfície, respectivamente: a dissolução e a volatilização (NEWELL et al., 1995; KIM e CORAPCIOGLU, 2003). A infiltração da precipitação e o fluxo da água subterrânea ocasionarão a dissolução dos compostos solúveis do LNAPL (residual ou móvel) e a consequente formação de uma pluma de contaminantes dissolvidos. Por esse motivo, LNAPLs representam fontes potenciais e contínuas de contaminação da água subterrânea, podendo perdurar por vários anos após o derramamento (NEWELL et al., 1995).

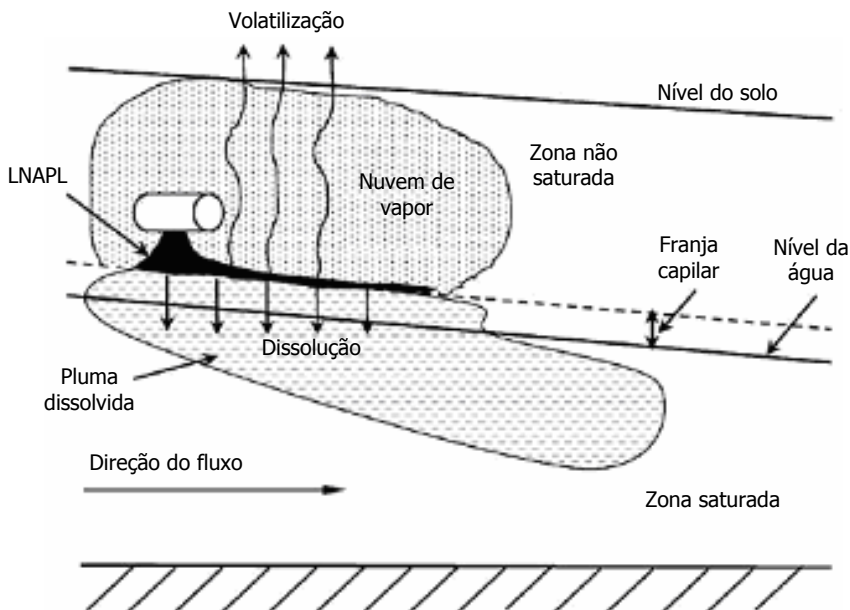


FIGURA 2.7 – Representação da migração do LNAPL na subsuperfície.
 FONTE: Adaptado de Kim e Corapcioglu (2003).

A distribuição dos ésteres alquílicos de ácidos graxos na subsuperfície é ainda desconhecida, uma vez que não existem estudos em escala de campo com esse objetivo. Por se tratarem de compostos orgânicos, espera-se que o comportamento destes no ambiente subterrâneo seja parecido com o apresentado pelos hidrocarbonetos.

2.3. INFLUÊNCIA DO BIODIESEL NA DEGRADAÇÃO E NO TRANSPORTE DO DIESEL

Muitos estudos têm sido conduzidos a respeito da degradação microbiológica do biodiesel, os quais têm mostrado que o biodiesel realmente degrada. Experimentos de laboratório foram conduzidos por DeMello et al. (2007) a fim de avaliar o comportamento do biodiesel e das misturas diesel/biodiesel em ambiente marinho. Foram criados diferentes microcosmos a partir da mistura de água do mar com diesel fôssil (D100), B8, B25 e B100. Os resultados destes experimentos de laboratório revelaram que os FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos)

foram degradados a uma taxa, aproximadamente, igual a dos n-alcenos e mais rapidamente que os outros hidrocarbonetos do combustível fóssil. Isso significa que os alcanos e os ésteres foram degradados ao mesmo tempo e que, desta forma; houve uma disputa pela degradação de ambos os compostos, evidenciada pela maior quantidade de alcanos nas misturas diesel/biodiesel em relação às amostras de diesel puro, durante o mesmo período. Segundo estes experimentos, a presença dos FAME até poderia reduzir a biodegradação inicial dos n-alcenos do diesel fóssil, mas esta diferença só foi observada na primeira semana de experimentação. Desta forma, acredita-se que, após um curto período de tempo, amostras de uma área contaminada com a mistura diesel/biodiesel se tornariam indistinguíveis das amostras de uma área contaminada com diesel fóssil.

DeMello et al. (2007) também constataram que os FAME C16 degradaram mais rapidamente que qualquer FAME C18 e que a taxa de degradação entre os FAME C18 não correspondia ao grau de saturação, diferentemente do proposto por Miller e Mudge (1997) de que os FAMES C18 insaturados eram degradados mais rapidamente que os FAMES C16. A alta meia vida observada para os FAME e a não alteração da massa avaliada na amostra controle, sugeriram que uma hidrólise abiótica não tenha influenciado as perdas observadas durante o experimento.

Prince et al. (2008) realizaram experimentos de laboratório com o intuito de avaliar a biodegradação aeróbia de B20 de soja em meio aquoso e, assim como DeMello et al. (2007), observaram que os FAMES foram degradados, aproximadamente, à mesma taxa que os n-alcenos do petróleo. A biodegradação de 100 ppm de B20 em água de chuva sem adaptação prévia da microbiota foi rápida e completa, com uma meia-vida de 6,8 dias (34 microcosmos foram avaliados em tempos que variaram de 2 a 30 dias após o início dos experimentos). Os resultados mostraram que os hidrocarbonetos do diesel e os ésteres do biodiesel são rapidamente degradados em sistemas aquáticos quando o diesel está presente em relativamente baixos níveis (de 100 a 400 ppm) e na presença de baixos níveis de nitrogênio e fósforo biologicamente disponíveis.

Zhang et al. (1998) estudaram a biodegradabilidade de vários tipos de biodiesel em um sistema aquático através do método da evolução do CO₂ e de análises de DBO₅, DQO e cromatografia gasosa (CG). Misturas de diesel/biodiesel (B20, B50 e B80) também foram avaliadas. Os resultados demonstraram que todos os tipos de biodiesel puro avaliados são prontamente biodegradáveis. O termo “prontamente

biodegradável”, segundo a USEPA (1992), é aplicado a compostos que, em certos testes de biodegradação, produzem resultados positivos que são inequívocos e levam a uma suposição razoável que a substância irá sofrer uma biodegradação rápida e completa em ambientes aquáticos aeróbios.

Para as misturas de biodiesel com diesel, percebeu-se que quanto maior o volume do éster na mistura, maior a porcentagem da evolução do CO₂. Na análise com CG para a mistura B50, observou-se que o diesel fóssil na mistura degradou duas vezes mais rápido que sozinho. Esta observação sugere que, na presença de ésteres, os micro-organismos utilizam os ácidos graxos como fonte de energia para promover a degradação do diesel fóssil. Segundo Zhang et al. (1998), a comparação da degradação de cada composto da mistura separadamente mostrou que os micro-organismos aparentemente atacam os ácidos graxos do biodiesel e as cadeias alifáticas do diesel fóssil ao mesmo tempo e às mesmas taxas ao invés de favorecer somente os ácidos graxos.

Em relação ao biodiesel puro (B100), Zhang et al. (1998) concluíram que a biodegradação deste é mais fácil e mais rápida do que a biodegradação do diesel fóssil (B0) (segundo o método da evolução do CO₂). Algumas possíveis razões para isso seriam: i) pelo fato de o biodiesel ser constituído de ácidos graxos puros, as enzimas responsáveis por suas quebras naturalmente já existem; ii) todos os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos com dois átomos de oxigênio, até mesmo na forma de éster, o que os torna muito ativos biologicamente, ao contrário dos alcanos e alcenos que não têm oxigênio em suas cadeias e, portanto, não são prontamente biodegradados; iii) a composição do diesel de petróleo é quimicamente mais complexa que a do biodiesel: além dos alcanos e alcenos, cerca de 30% do diesel fóssil é composto por aromáticos, o que lhe confere uma maior toxicidade e maior resistência à degradação do que as cadeias alifáticas de hidrocarbonetos.

Lapinskiene et al. (2006) compararam o diesel fóssil ao biodiesel através da determinação da toxicidade dos materiais analisados e da avaliação quantitativa da transformação microbiana destes materiais em solos aerados. Os níveis de toxicidade foram medidos através da respiração e da atividade das dehidrogenases dos micro-organismos não adaptados existentes na amostra de solo utilizada, enquanto a avaliação da biotransformação foi realizada pelo balanço de carbono dos produtos finais. Os resultados dos testes de toxicidade indicaram que o diesel fóssil tem propriedades tóxicas a concentrações no solo acima de 3%

(w/w) enquanto o biodiesel não as apresenta até uma concentração de 12% (w/w) (concentração de saturação do óleo no solo). A avaliação quantitativa dos processos microbiológicos de transformação indicou que, no diesel, existem mais compostos que são resistentes à oxidação microbiológica e estes compostos são utilizados para a síntese de materiais húmicos, enquanto que os compostos orgânicos presentes no biodiesel são facilmente acessíveis como fonte de energia e são melhor biotransformados. Também foi possível assumir que a quantidade de micro-organismos era significativamente maior nas amostras de solo contendo biodiesel.

Taylor e Jones (2001) realizaram experimentos em laboratório e em campo para avaliar a biorremediação dos compostos policíclicos aromáticos presentes no piche de carvão através da adição de biodiesel e de diesel fóssil. Os resultados indicaram que as restritas transferência de massa e biodisponibilidade dos HPA são os principais fatores que limitam a degradação destes compostos do piche. A adição tanto do biodiesel quanto do diesel fóssil, juntamente com nutrientes inorgânicos, resultou no aumento da degradação de alguns HPA em relação às amostras sem tratamento algum ou somente com a adição de nutrientes, e as maiores diminuições ocorreram nos componentes de dois e três anéis. Esse aumento na degradação da maioria dos HPA de dois e três anéis provavelmente foi resultado do aumento da transferência de massa dos HPA do piche sólido para a solução devido a processos de solubilização e dispersão causados pela adição do biodiesel e do diesel fóssil (efeito surfactante). A adição do biodiesel e do diesel pode também ter induzido o aumento da atividade microbiana, uma vez que estes compostos passaram a atuar como uma fonte biodisponível de carbono.

A comparação entre os tratamentos com biodiesel e diesel motor na degradação dos HPA permitiu concluir que a maior solubilidade do piche no biodiesel (95%), em relação ao diesel motor (87%), pode ser, inicialmente, prejudicial aos micro-organismos, uma vez que pode aumentar a disponibilidade de substâncias tóxicas. Além disso, os micro-organismos podem ter a capacidade de hidrolisar os ésteres metílicos do biodiesel a metanol, o qual, em altas concentrações, pode ser inibidor do crescimento microbiano. Apesar disso, os resultados indicaram que o biodiesel é capaz de solubilizar e aumentar a biodisponibilidade dos HPA do piche nos solos.

De fato, conforme os experimentos conduzidos por DeMello et al. (2007), os FAME parecem aumentar a estabilidade de pequenas gotas de óleo na água, devido ao fato de suas estruturas serem muito semelhantes

a de compostos surfactantes. Isso favorece a formação de associações na interface óleo-água, reduzindo a tensão superficial interfacial entre essas duas fases. Essa estabilização das gotas de óleo pelos ésteres pode aumentar as taxas de dissolução dos hidrocarbonetos do petróleo na água, devido ao aumento da área superficial das gotas, e facilitar o transporte do óleo na água, aumentando os impactos da contaminação, uma vez que o movimento das águas pode distribuir esse óleo disperso e dissolvido ao longo de uma área maior.

Estudos de campo relacionados à influência da utilização de biocombustíveis, como o etanol, na degradação de compostos derivados de petróleo, como a gasolina, indicaram que, no caso de um derramamento subsuperficial, o etanol é o principal substrato orgânico a ser inicialmente lixiviado para a água subterrânea e, devido à sua alta solubilidade, permanece presente na fase aquosa em concentrações com ordens de magnitude muito maiores que os compostos aromáticos do grupo BTEX. A maior biodisponibilidade do etanol e sua maior facilidade de degradação fazem com que este composto seja degradado preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos da gasolina, levando a um aumento na atividade da biomassa na água subterrânea. O rápido decaimento das concentrações de BTEX próximas à fonte, após a exaustão do etanol, poderia ser atribuído a esse aumento da biomassa estimulado durante a biodegradação do etanol (NUNES e CORSEUIL, 2007; CORSEUIL et al., 2011a). Da mesma forma, a maior biodegradabilidade do biodiesel poderia estimular a atividade dos microorganismos de forma a aumentar a degradação dos compostos do diesel fóssil presentes na mistura diesel/biodiesel.

2.4. BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA

A biodegradação é considerada o processo mais significativo na atenuação natural de contaminantes, pois reduz a massa dos mesmos, transformando-os em moléculas mais simples (como o dióxido de carbono e a água), ou, em alguns casos, simplesmente convertendo-os a subprodutos não-tóxicos (biotransformação) (BEDIENT, 1997; WIEDEMEIER et al., 1999).

Embora quase todos os tipos de hidrocarbonetos de petróleo possam ser biodegradados sob condições aeróbias (BORDEN et al., 1997), a liberação destes compostos no ambiente subterrâneo causa a rápida exaustão do oxigênio dissolvido, (devido à intensa atividade

microbiana aeróbia nativa) e a conseqüente formação de regiões anaeróbias dentro da pluma de contaminação. Desta forma, em áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo, a degradação anaeróbia é, geralmente, predominante (CHRISTENSEN et al., 1994; ANDERSON e LOVLEY, 1997; LOVLEY, 1997; COATES e ACHENBACH, 2001; FERNANDES, 2002; CHEN et al., 2007). Apesar das recargas de água que ocorrem no ambiente subterrâneo, a pequena quantidade de oxigênio que de fato entra na zona anaeróbia é rapidamente consumida por uma nova respiração aeróbia e pela oxidação química dos produtos reduzidos da respiração anaeróbica, tais como ferro (II) e sulfeto (ANDERSON e LOVLEY, 1997; COATES e ACHENBACH, 2001).

A adição de biocombustíveis, como o etanol ou o biodiesel, aos combustíveis derivados de petróleo favorece ainda mais a predominância de condições anaeróbias durante o processo de biodegradação destas misturas em ambientes subterrâneos, uma vez que a demanda bioquímica de oxigênio exercida por esses combustíveis alternativos é ainda maior se comparada àquela exercida pelos compostos solúveis presentes nos derivados de petróleo. Utilizando o modelo energético de biodegradação de McCarty (McCarty, 1969), GOMES (2008) calculou o consumo de oxigênio para o caso de uma contaminação na água subterrânea com 1 litro de biodiesel, 1 litro de etanol e 1 litro de gasolina (com 10% v/v de BTEX) e verificou que a demanda teórica calculada de oxigênio, em massa, necessária para degradar o biodiesel é duas vezes maior do que a necessária para degradar o etanol e oito vezes maior do que a necessária para degradar os compostos BTEX presentes na gasolina. Portanto, em derramamentos subsuperficiais com misturas de biodiesel e diesel, condições anaeróbias irão prevalecer para a degradação dos contaminantes presentes.

A biodegradação anaeróbia dos compostos orgânicos pelos micro-organismos ocorre através de reações de oxidação-redução, em que os contaminantes (doadores de elétrons) são parcialmente oxidados na presença de receptores de elétrons, produzindo espécies reduzidas, denominadas subprodutos metabólicos (CHAPELLE, 2001). Estas reações fazem parte de processos metabólicos complexos, que ocorrem em etapas paralelas e sequenciais, com os produtos de um estágio atuando como substrato para o próximo, até que a completa mineralização seja alcançada. Para que isso ocorra de maneira satisfatória, é necessário o envolvimento cooperativo e sintrófico de diversos grupos de micro-organismos (GUJER e ZEHNDER, 1993; SCHINK, 1997) e o rumo tomado por esses processos depende,

principalmente, da natureza dos receptores de elétrons disponíveis e da pressão parcial de hidrogênio (WIDDEL, 1988; GIBSON, 1990; ZINDER, 1993; LENGELER, 1999; STAMS et al., 2006; HEIMANN et al., 2010).

Na presença de receptores de elétrons inorgânicos, como nitrato, sulfato, enxofre ou íons metálicos oxidados (como Fe (III)), a matéria orgânica será degradada com a produção de dióxido de carbono, nitrogênio, sulfeto ou Fe (II). O uso dos receptores acontece de acordo com o rendimento de energia e, portanto, os oxidantes disponíveis em maiores concentrações e com o potencial redox mais positivo são os que têm prioridade (LENGELER, 1999). O rendimento da energia produzida por estas reações de transferência de elétrons é quantificado pela energia livre de Gibb's (ΔG°) e, desta forma, a ordem de consumo dos receptores de elétrons inorgânicos mais comumente disponíveis no meio ambiente seguirá a tendência mais favorável termodinamicamente: nitrato² > Fe III > sulfato (WIEDEMEIER et al., 1999). Na ausência de receptores de elétrons inorgânicos, bicarbonato (dióxido de carbono) e prótons são os receptores finais de elétrons durante as reações de oxidação-redução. Essa propriedade é o que caracteriza o ambiente como metanogênico (STAMS et al., 2006).

Todos esses processos são respirativos, em que os elétrons são doados para um receptor exógeno (externo), através de uma cadeia de transporte de elétrons. Quando não são utilizados receptores de elétrons externos, tem-se então a fermentação. A fermentação também é um processo redox anaeróbio, no entanto, o receptor de elétrons utilizado é endógeno (interno) e, desta forma, tanto o doador quanto o receptor de elétrons são derivados da molécula orgânica a ser degradada. Para isso, o composto orgânico deve estar em estado redox médio. Compostos altamente oxidados (como o dióxido de carbono) ou altamente reduzidos (como hidrocarbonetos ou ácidos graxos) não são apropriados para fermentação. Nestes casos, as transformações anaeróbias envolvem respirações que requerem doadores (ex: hidrogênio molecular) ou receptores (ex: nitrato, sulfato ou dióxido de carbono) externos de elétrons (LENGELER, 1999).

² Apesar de a nitrato-redução produzir mais energia do que a respiração aeróbia, o oxigênio é tóxico para as bactérias anaeróbias obrigatórias em concentração superior a 0,5 mg/L e, por este motivo, a redução do nitrato só ocorre após o esgotamento do oxigênio (WIEDEMEIER et al., 1999a).

De maneira geral, quando receptores inorgânicos de elétrons não estão envolvidos (condições metanogênicas), os processos metabólicos de degradação de um composto orgânico podem ser divididos em: hidrólise, acidogênese (ou fermentação), acetogênese e metanogênese (GUJER e ZEHNDER, 1983; FENCHEL et al., 1998).

A hidrólise é o primeiro passo da sequência de reações. Nesta etapa, a matéria orgânica complexa (polímero) é convertida em compostos mais simples (monômeros) através de enzimas extracelulares liberadas pelas bactérias acidogênicas (ou fermentativas): proteínas são degradadas a aminoácidos através de proteases, carboidratos são convertidos em açúcares utilizando-se celulases, e os lipídios são transformados em ácidos graxos de cadeias longas (AGCL) e glicerol através do uso de lipases. A hidrólise atua quando as moléculas não conseguem passar pela membrana externa da bactéria, devido ao seu alto peso molecular. Esse passo é importante para tornar os substratos complexos acessíveis às bactérias anaeróbias e, assim, otimizar o processo de degradação (GUJER e ZEHNDER, 1983; FENCHEL et al., 1998).

Os produtos formados durante a hidrólise serão, então, convertidos dentro das células bacterianas, num processo denominado acidogênese (ou fermentação). A acidogênese consiste na degradação de substratos solúveis sem a presença de receptores de elétrons externos e é a primeira etapa do processo de digestão anaeróbia em que há rendimento de energia. De maneira geral, nesta etapa, a conversão dos monômeros formados durante a hidrólise resulta na formação de acetato, propionato, butirato (ácidos orgânicos voláteis ou ácidos graxos voláteis - AGV), dióxido de carbono e hidrogênio, além de outros produtos orgânicos intermediários, como alcoóis e cetonas, que variam conforme a matéria complexa degradada (GUJER e ZEHNDER, 1983; FENCHEL et al., 1998).

A próxima etapa é a acetogênese, na qual os produtos orgânicos intermediários formados durante a acidogênese serão convertidos a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias acetogênicas (sintróficas). As reações acetogênicas são desfavoráveis do ponto de vista termodinâmico e, portanto, os produtos destas reações devem ser mantidos em baixas concentrações. Para isso, é necessária a associação sintrófica da bactéria acetogênica com outra espécie. Em ambientes metanogênicos, em que os únicos receptores externos de elétrons são prótons e dióxido de carbono, essa associação pode ocorrer com as arqueas metanogênicas consumidoras de hidrogênio (ou metanogênicas

hidrogenotróficas), que reduzem dióxido de carbono a metano. Na ausência de receptores de elétrons externos, as metanogênicas acetoclásticas convertem o acetato produzido a metano e dióxido de carbono (GUJER e ZEHNDER, 1983; SCHINK, 1997).

Desta forma, a última etapa do processo é a metanogênese: a conversão dos substratos orgânicos produzidos tanto na acidogênese quanto na acetogênese a metano pelas bactérias produtoras de metano: as metanogênicas hidrogenotróficas e as metanogênicas acetoclásticas. Em reatores anaeróbios, aproximadamente, 70% do metano produzido é derivado da descarboxilação do acetato pelas metanogênicas acetoclásticas. A redução do dióxido de carbono pelas metanogênicas hidrogenotróficas produz a maioria do metano restante. O metano também é produzido a partir de outros substratos como o ácido fórmico e o metanol (JERIS e MCCARTY, 1965; SMITH e MAH, 1966; MAH et al., 1977; BOONE, 1982; GUJER e ZEHNDER, 1983).

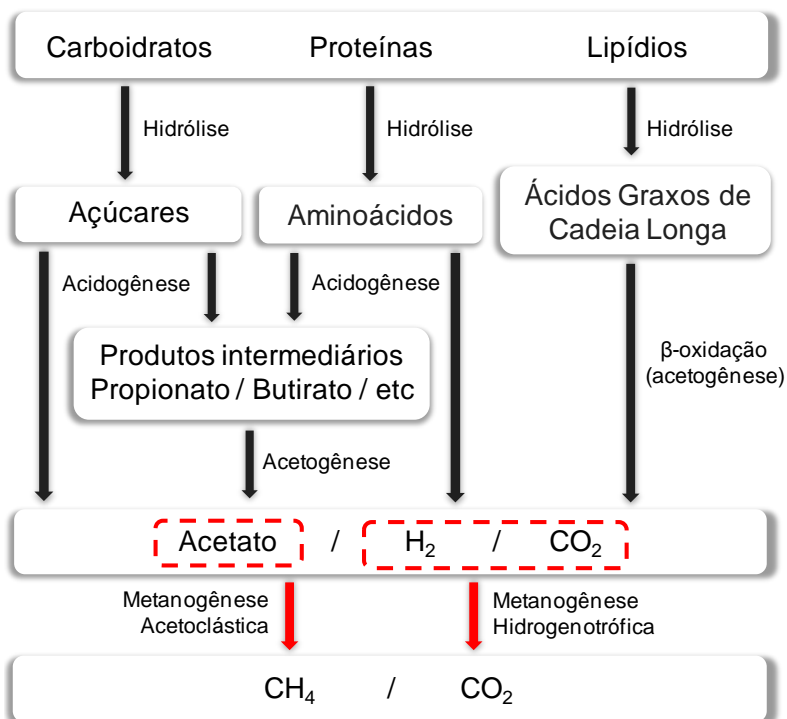


FIGURA 2.8 – Processos anaeróbios de degradação da matéria orgânica complexa. Adaptado de Gujer e Zehnder (1983).

2.4.1. Biodegradação anaeróbia do biodiesel

Em ambientes anaeróbios, os ésteres que compõem o biodiesel são hidrolisados via estearases a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL em português ou LCFA, do inglês *long chain fatty acids*) e álcool (metanol, no caso de o biodiesel ter sido transesterificado via rota metílica e etanol, se a rota utilizada for etílica).

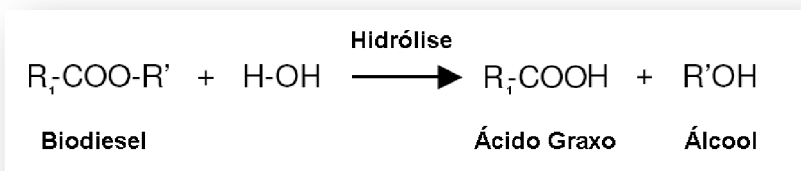


FIGURA 2.9 – Reação de hidrólise do biodiesel, com a formação de AGCL e álcool.

Uma vez que os AGCL requerem um receptor de elétrons externo para oxidação, sua degradação ocorre durante a acetogênese (FIGURA 2.8) (BATSTONE, 2000). O processo de degradação começa com a adsorção do composto (o AGCL) na superfície da célula bacteriana. Em seguida, ocorre o movimento do AGCL através da célula bacteriana, em direção ao espaço periplásmico (NUNN, 1986). Dentro da célula, os ácidos graxos se tornam ativos pela proteína acil-CoA sintetase, formando complexos de cadeia longa acil-CoA (AGCL-CoA), numa reação que requer energia em forma de ATP. Uma vez ativos, a principal rota utilizada para a degradação anaeróbia dos AGCL é a β -oxidação (NOVAK e CARLSON, 1970; WENG e JERIS, 1976; HANAKI et al., 1981; ANGELIDAKI e AHRING, 1992; NUCK e FEDERLE, 1996; MENES et al., 2001; GRABOWSKI et al., 2005; SOUSA et al., 2007). A β -oxidação atua de uma maneira cíclica: em cada volta do ciclo, o carbono na posição β do ácido graxo ativo (AGCL-CoA) é oxidado e os dois átomos de carbono no final da molécula são clivados produzindo um acetil-CoA e, conseqüentemente, um acil-CoA graxo com dois carbonos a menos (TABELA 2.5, Equação 2.1). O acetil-CoA é então convertido a acetato e o restante da molécula de cadeia longa, que agora é reduzida de dois átomos de carbono, é

oxidado na sequência até que todos os carbonos sejam convertidos a acetil-CoA (RATLEDGE, 1994; DIRUSSO et al., 1999) (FIGURA 2.10).

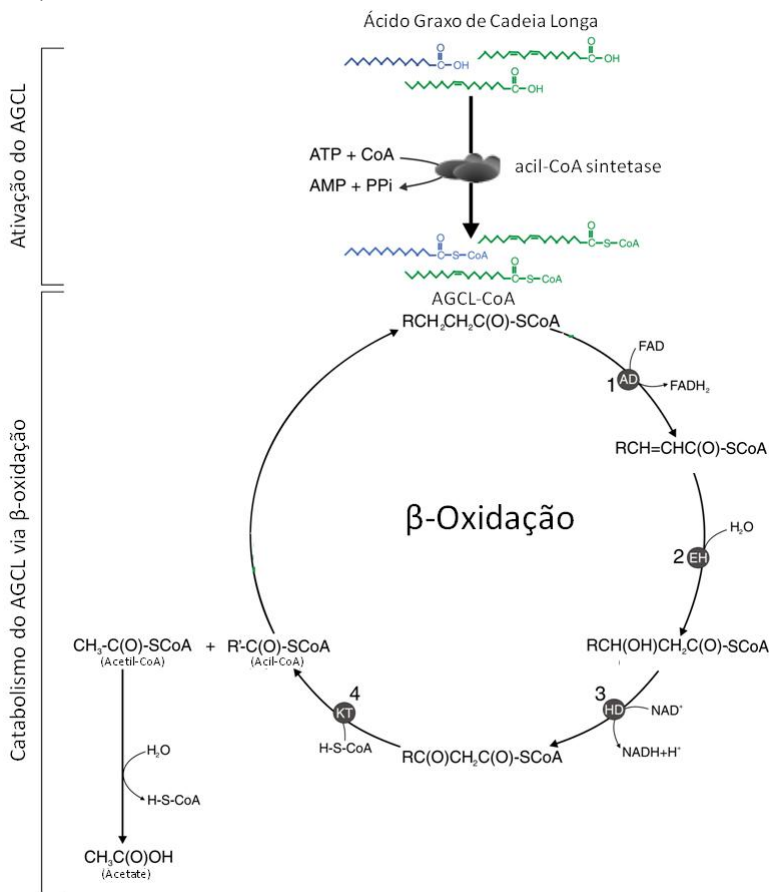


FIGURA 2.10 – Ativação e degradação de um AGCL via β-oxidação.
FONTE: Adaptado de Souza et al. (2009b).

TABELA 2.5 – Degradação de um AGCL via β-oxidação.

β-oxidação	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n-2}\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$	(2.1)

As comunidades acetogênicas que convertem os AGCL com a produção de acetato são consideradas sintróficas produtoras obrigatórias de hidrogênio (APOH). E, desta forma, o acetato e o hidrogênio produzidos durante a quebra dos AGCL precisam ser consumidos. Em ambientes sob condições metanogênicas, as arqueas metanogênicas são as principais responsáveis pela conversão final destes produtos a metano (SCHINK, 1997; SCHINK e STAMS, 2002).

TABELA 2.6 – Reações de conversão do acetato e do hidrogênio a metano.

Reações metanogênicas		
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (metanogênese acetoclástica)	$\Delta G^\circ - 35,8 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(2.2)
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$ (metanogênese hidrogenotrófica)	$\Delta G^\circ - 130,7 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(2.3)

Nota: os valores de ΔG° foram calculados a partir dos dados de Thauer et al. (1977) para pH =7.

2.4.2. Biodegradação anaeróbia dos compostos aromáticos do diesel

A maioria dos compostos aromáticos de baixo peso molecular têm se mostrado suscetíveis à degradação microbiana sob condições anaeróbias. O principal problema a ser superado durante a degradação destes compostos é a estabilidade química do anel aromático. Diferentemente do processo de degradação aeróbia, em que o oxigênio molecular, altamente reativo, é utilizado para o ataque ao núcleo aromático e para a quebra do anel (desaromatização), no caso da degradação anaeróbia, a ausência de um cossustrato reativo exige diferentes mecanismos de degradação e, portanto, as reações envolvidas são de redução do substrato (HEIDER e FUCHS, 1997b).

De maneira geral, durante a degradação anaeróbia, os substratos monoaromáticos são primeiramente transformados em compostos intermediários centrais antes de o anel aromático ser redutivamente desaromatizado. O composto intermediário central ativo mais comum do

metabolismo anaeróbico aromático é o benzoil-CoA (um tioéster de coenzima A com ácido benzóico) (HEIDER e FUCHS, 1997b; ZENGLER et al., 1999; GIBSON e HARWOOD, 2002).

A rota bioquímica para que o composto seja transformado em benzoil-CoA pode variar. O benzeno, por exemplo, pode sofrer carboxilação (transformando-se em benzoato) ou metilação (com a geração de tolueno) ou, ainda, hidroxilação (formando uma molécula de fenol) (COATES et al., 2002). A maioria dos estudos indicou que o fenol e o benzoato são os intermediários mais importantes da degradação do benzeno (GRBIĆ-GALIĆ e VOGEL, 1987; CALDWELL e SUFLITA, 2000; PHELPS et al., 2001). O composto aromático intermediário formado é, em seguida, transformado em benzoil-CoA (COATES et al. 2002).

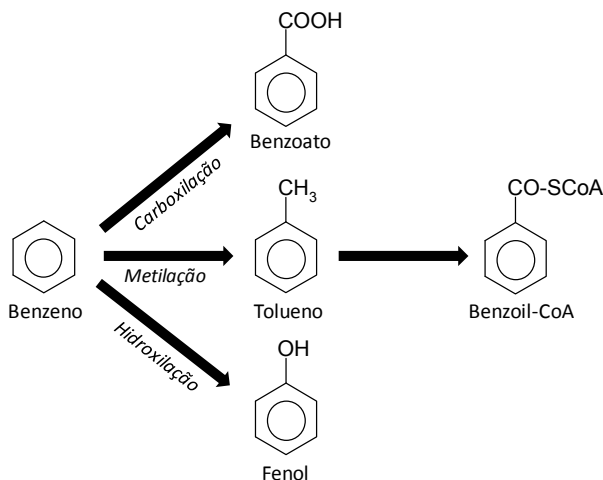


FIGURA 2.11 – Possíveis rotas da degradação inicial do benzeno, com a posterior formação de benzoil-CoA.

FONTE: Adaptado de Coates et al. (2002).

Os estudos da degradação do tolueno revelaram que a primeira etapa do catabolismo deste composto é a adição de uma molécula de fumarato ao seu grupo metil para a formação de benzilsuccinato como primeiro composto intermediário (BELLER e SPORMANN, 1997a). Esta reação é mediada pela enzima benzilsuccinato sintetase (BSS) (BELLER e SPORMANN, 1997b; LEUTHNER et al., 1998). Este mecanismo de ativação do tolueno é comum e é utilizado por diversos

microorganismos que crescem sob condições anaérobias alternativas, como a nitrato-redução (EVANS et al., 1991a; 1991b; FRIES et al., 1994), a ferro (III)-redução (LOVLEY e LONERGAN, 1990; COATES et al., 1996c; KANE et al., 2002), a sulfato-redução (EDWARDS et al., 1992; RABUS et al., 1993) e a metanogênese (GRBIĆ-GALIĆ e VOGEL, 1987). O benzilsuccinato é posteriormente oxidado a benzoil-CoA (HEIDER e FUCHS, 1997b).

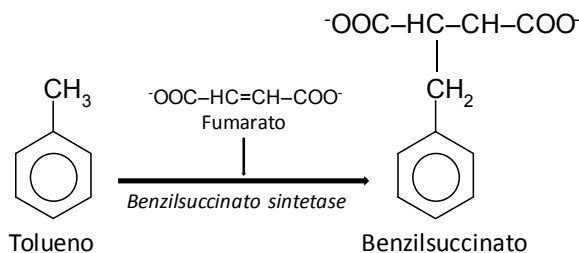


FIGURA 2.12 – Ativação do tolueno para o processo de degradação através da adição de fumarato ao grupo metil com a formação de benzilsuccinato.

FONTE: Adaptado de Leuthner et al. (1998).

O etilbenzeno é inicialmente ativado para degradação através de uma reação de desidrogenação do grupo metileno para formar uma molécula de 1-feniletanol, que será posteriormente oxidada ao composto aromático acetofenona e esta, em benzoil-CoA (BALL et al., 1996; RABUS e HEIDER, 1998).

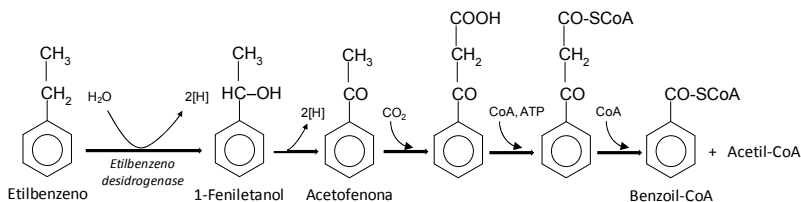


FIGURA 2.13 – Reações iniciais propostas para a degradação anaeróbia do etilbenzeno

FONTE: Adaptado de Ball et al. (1996).

Já as reações iniciais envolvidas na oxidação anaeróbia dos isômeros do xileno (ou dimetilbenzeno) são similares àquelas da degradação do tolueno e envolvem a adição inicial de fumarato a um dos grupos metil do composto xileno para formar o metilbenzilsuccinato. Este será posteriormente oxidado a metilbenzoato. A formação do metilbenzilsuccinato é mediada pela enzima metilbenzilsuccinato sintetase, que retém o átomo de hidrogênio do grupo metil durante a reação (KRIEGER, 1999).

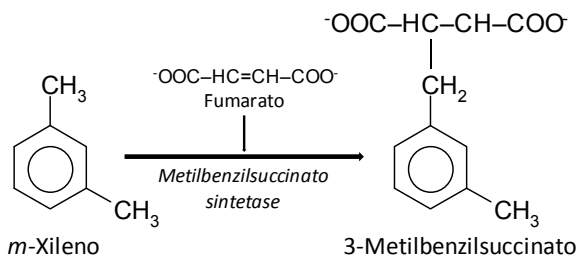


FIGURA 2.14 – Reações iniciais propostas para a degradação anaeróbia do *m*-xileno.

FONTE: Adaptado de Krieger (1999).

Uma vez transformados em benzoil-CoA, a reação típica de desaromatização anaeróbia do benzoil-CoA é a redução do seu anel a ciclohexa-1,5-dieno-carboxi-CoA, catalisada pela benzoil-CoA redutase. A benzoil-CoA redutase é altamente específica para ATP, competitivamente inibida por ADP. O produto da redução do benzoil-CoA, o ciclohexa-1,5-dieno-carboxi-CoA, é, então, degradado em etapas posteriores de hidratação e desidrogenação a 2-oxo-6-hidroxiciclohexano-1-carboxi-CoA. Este composto sofre abertura hidrolítica do anel transformando-se em 3-hidroxiipimelil-CoA. O 3-hidroxiipimelil-CoA é então β -oxidado a acetil-CoA e glutaril-CoA. A glutaril-CoA desidrogenase catalisa a oxidação e descarboxilação da glutaril-CoA a CO_2 e a crotonil-CoA, que será posteriormente oxidada a 2 moléculas de acetil-CoA. Para cada molécula do produto da redução do benzoil-CoA, portanto, 3 moléculas de acetil-CoA e uma de CO_2 são produzidas numa sequência de reações semelhantes à β -oxidação (KOCH et al., 1993; HEIDER e FUCHS, 1997a; 1997b; PELLETIER e HARWOOD, 1998)

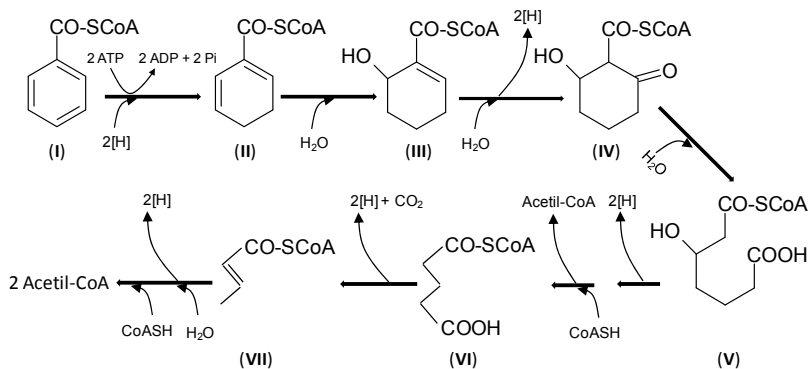


FIGURA 2.15 – Rota metabólica de degradação do benzoil-CoA.

Nota: (I) Benzoil-CoA; (II) Ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxi-CoA; (III) 6-Hidroxi-ciclohex-1-eno-1-carboxi-CoA; (IV) 2-Oxo-6-hidroxi-ciclohexano-1-carboxi-CoA; (V) 3-Hidroxi-pimelil-CoA; (VI) Glutaril-CoA (VII) Crotonil-CoA.

FONTE: Adaptado de Heider e Fuchs (1997b).

Assim como para os compostos monoaromáticos, a degradação anaeróbica dos compostos com mais de um anel aromático (policíclicos aromáticos) também tem sido demonstrada em ambientes sob condições nitrato redutoras, ferro redutoras, sulfato redutoras e metanogênicas (COATES et al., 1996a; 1996b; 1997; ANDERSON e LOVELY, 1999; ANNWEILER et al., 2000; MECKENSTOCK et al., 2000; ANNWEILER et al., 2002; TSAI et al., 2009). A biodegradação anaeróbica dos HPA, no entanto, é um processo lento e as possíveis rotas bioquímicas de transformação destes compostos ainda são pouco elucidadas.

Algumas rotas de biotransformação anaeróbica foram propostas para o fluoreno e o fenantreno via bactérias sulfato redutoras. Estes compostos sofreram uma sequência de reações de hidratação e hidrólise, seguidas de descarboxilação, até a formação de fenol e posterior mineralização destes compostos. O fenantreno passou a *p*-cresol antes de se transformar em fenol (Figura 6) (TSAI et al., 2009).

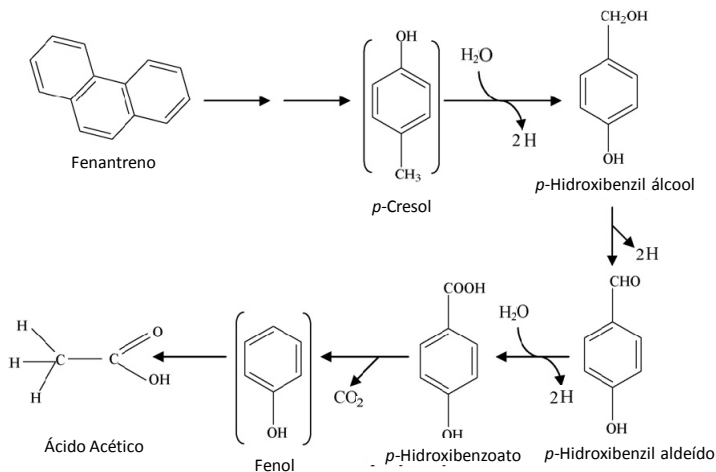


FIGURA 2.16 – Rota de biotransformação anaeróbia proposta para o fenantreno.

FONTE: Adaptado de Tsai et al. (2009).

As rotas de degradação bioquímica do naftaleno e do metilnaftaleno também foram estudadas sob condições sulfato redutoras e revelaram que o ácido 2-naftóico é o metabólito central destes compostos. O naftaleno é ativado pela adição de um CO_2 à molécula para a geração do ácido 2-naftóico enquanto que o metilnaftaleno é ativado pela adição de um fumarato ao grupamento metila e ele é então degradado ao ácido 2-naftóico. Este metabólito central é então reduzido previamente à clivagem do anel. A clivagem do anel produz metabólitos derivados do ciclohexano (ANNWEILER et al., 2000; MECKENSTOCK et al., 2000; ANNWEILER et al., 2002).

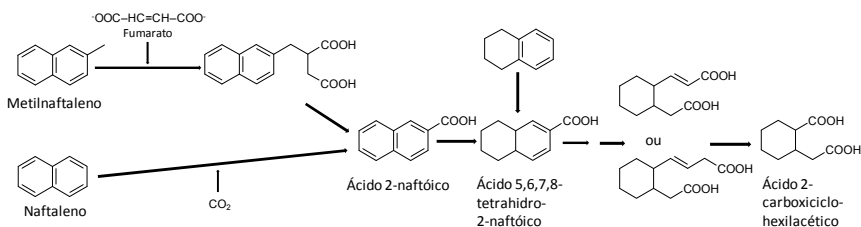


FIGURA 2.17 – Rotas de degradação anaeróbia propostas para o naftaleno e o metilnaftaleno.

FONTE: Adaptado de Annweiler et al. (2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas liberações controladas, diretamente na zona saturada do aquífero, de 100 L de biodiesel puro de soja (B100) e de 100 L da mistura contendo 80% em volume de óleo diesel e 20% em volume de biodiesel de soja (B20). Os compostos dissolvidos provenientes da liberação e da biodegradação destes produtos na água subterrânea foram monitorados durante 29 meses. Previamente à liberação dos produtos, foram caracterizadas a hidrogeologia e a hidrogeoquímica do ambiente de estudo para que se pudesse conhecer e prever e/ou justificar o comportamento dos contaminantes nesse meio.

De modo a avaliar a influência do biodiesel na degradação dos compostos aromáticos do diesel de petróleo, um dos objetivos propostos neste trabalho, optou-se pela mistura com uma proporção de 20% em volume de biodiesel, pois, até o momento, a grande maioria dos artigos científicos não apontou mudanças de comportamento significativas para as misturas com frações abaixo deste percentual. DeMelo et al (2007), por exemplo, não observaram influência significativa dos ésteres metílicos do biodiesel na redução da tensão superficial óleo-água para as misturas inferiores a B20. Essa redução tornaria os compostos do diesel mais solúveis e mais biodisponíveis (Taylor e Jones, 2001). A literatura também indicou que o biodiesel degrada muito rapidamente e se a quantidade deste na mistura for muito pequena, espera-se que seja facilmente degradada e, então, toda uma estrutura de campo e laboratório voltada ao estudo do comportamento da mistura biodiesel/diesel, passaria a monitorar somente o diesel na subsuperfície, o que não seria interessante para esse experimento. Dentro do caráter legal, ressaltam-se ainda os constantes aumentos nas frações de biodiesel adicionadas ao diesel comercialmente distribuído no país e a comparação com a fração de etanol anidro que é atualmente adicionada à gasolina (25% em volume) (BRASIL, 2007).

3.1. IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área em que este estudo foi desenvolvido situa-se na Fazenda Experimental da Ressacada, de propriedade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada ao sudoeste da cidade de Florianópolis/SC, próxima ao Aeroporto Internacional Hercílio Luz (FIGURA 3.1). A área em que estão localizados os experimentos, em destaque vermelho na FIGURA 3.1, trata-se de uma região com, aproximadamente, 2.500 m^2 , relativamente plana (com declividades que variam de 0 a 3%), situada a 5,5 m de altitude em relação ao nível do mar e próxima a regiões de mangue.

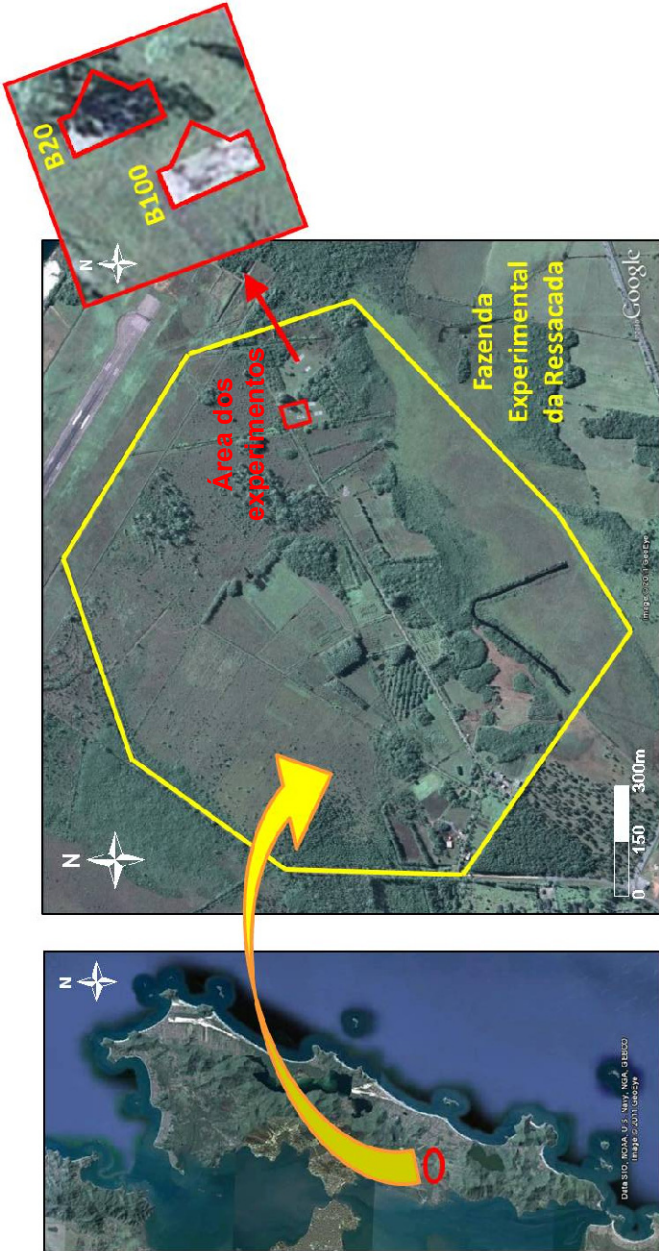


FIGURA 3.1 – Localização da área

3.1.1. Caracterização hidrogeológica da área

Para a determinação da disposição dos experimentos na área de estudo, bem como o acompanhamento da tendência de migração das plumas de compostos dissolvidos durante o transcorrer do estudo, foi necessário avaliar a direção preferencial do fluxo da água subterrânea no local. Para isso, foram monitorados 17 piezômetros (FIGURA 3.2) ao redor das áreas experimentais a fim de se determinar a variação da carga potenciométrica do lençol freático naquela região. A partir dos valores medidos de carga potenciométrica em cada piezômetro, e utilizando-se o software *Surfer 8.0* para interpolar a superfície potenciométrica no local, definiu-se a direção preferencial do fluxo da água subterrânea. O método utilizado para a interpolação das cargas potenciométricas medidas nos piezômetros foi a Krigagem.

Previamente à instalação dos experimentos, a direção do fluxo foi determinada de maneira local, ou seja, utilizando-se apenas os piezômetros mais próximos às áreas dos experimentos. A utilização de todos os piezômetros para a interpolação de um mapa potenciométrico mais regional revelou a definição de uma direção preferencial do fluxo mais coerente com as concentrações de compostos dissolvidos detectadas ao longo do experimento. Por este motivo, foi necessária a readequação das áreas experimentais através da alocação de novos poços de monitoramento.

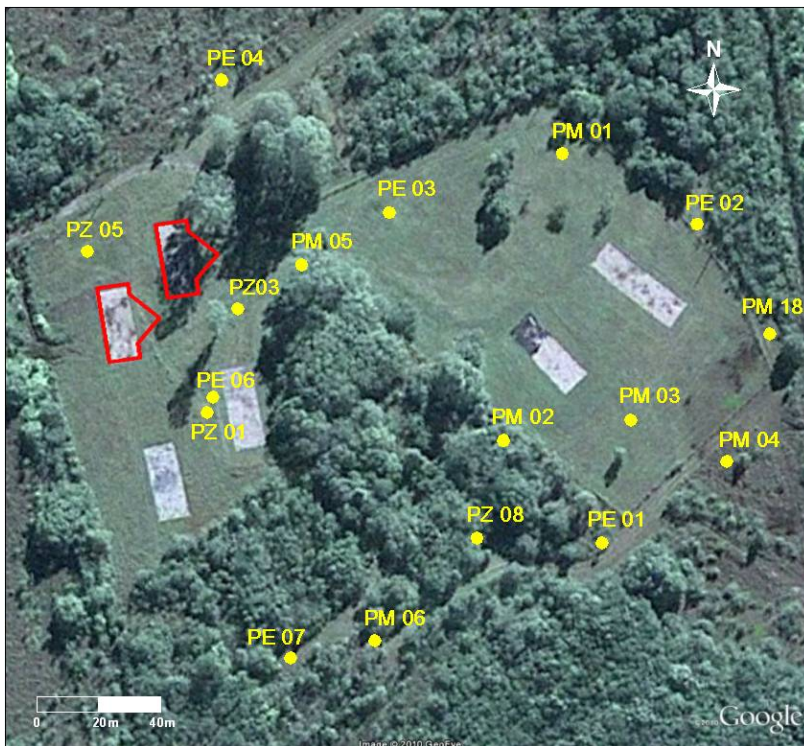


FIGURA 3.2 – Localização dos piezômetros ao redor das áreas dos experimentos. Nota: Apesar das diferentes denominações (PE – poço estratigráfico, PM – poço de monitoramento e PZ – piezômetro), todos os poços foram utilizados para o monitoramento da variação do nível do lençol freático.

A velocidade de deslocamento da água subterrânea também foi uma grandeza importante no processo de instalação dos experimentos. A partir dos dados medidos de carga potenciométrica e de condutividade hidráulica na porção saturada, estimou-se a velocidade intersticial da água subterrânea através dos poros do solo no local dos experimentos. Para isso, foram utilizados o software *AutoCad 2007* e a equação descrita pela Lei de Darcy (Equação 3.1). O valor de condutividade hidráulica saturada utilizado ($3,32 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$) foi determinado por Lage (2005) através do *Método de Hvorslev* (1951) e de testes de *slug* realizados em campo para o poço PM05 (FIGURA 3.2).

$$v = \frac{K_{sat}}{n_e} \frac{dH}{dL}, \quad (3.1)$$

em que:

$$\begin{aligned} v &= \text{velocidade intersticial [cm.s}^{-1}\text{]}; \\ K_{sat} &= \text{condutividade hidráulica saturada [cm.s}^{-1}\text{]}; \\ dH/dL &= \text{gradiente hidráulico [m.m}^{-1}\text{]}; \\ n_e &= \text{porosidade efetiva [adimensional]}. \end{aligned}$$

Além da direção do fluxo e da velocidade da água subterrânea, outra importante grandeza considerada foi a pluviometria. Este fator é o principal responsável pela recarga do aquífero, contribuindo com variações hidrogeoquímicas na água subterrânea, além de variações horizontais e verticais (*diving plume*) no sentido preferencial do fluxo. Os dados de precipitação da área experimental foram fornecidos pelo Departamento de Controle do Espaço Aéreo (DECEA) que monitora o Ajudado Meteorológico localizado no Aeroporto Internacional Hercílio Luz.

As características físicas do solo também influenciam o movimento da água subterrânea e, conseqüentemente, das plumas de compostos dissolvidos. Desta forma, foram realizados estudos para a determinação do perfil estratigráfico, da granulometria, da porosidade efetiva e dos tipos de argilominerais presentes nas principais camadas de solo que constituem o ambiente subterrâneo da região.

Para o conhecimento da coluna estratigráfica, sondagens foram realizadas até 6 metros de profundidade, em relação ao nível do terreno, durante a instalação dos poços de monitoramento nas áreas experimentais, utilizando-se o “*Prospecting Kit for Soils*” da *Mastrad Ltd*. Trata-se de um conjunto de equipamentos para exploração e amostragem de solos. A FIGURA 3.3 A mostra o *kit* de sondagem sendo utilizado durante uma amostragem de solo. Após a coleta, o solo foi removido do amostrador (FIGURA 3.3 B) e foi realizada análise visual de sua geologia. Em seguida, a amostra (FIGURA 3.3 C) foi enviada para ensaios complementares a fim de se confirmar o que foi observado.

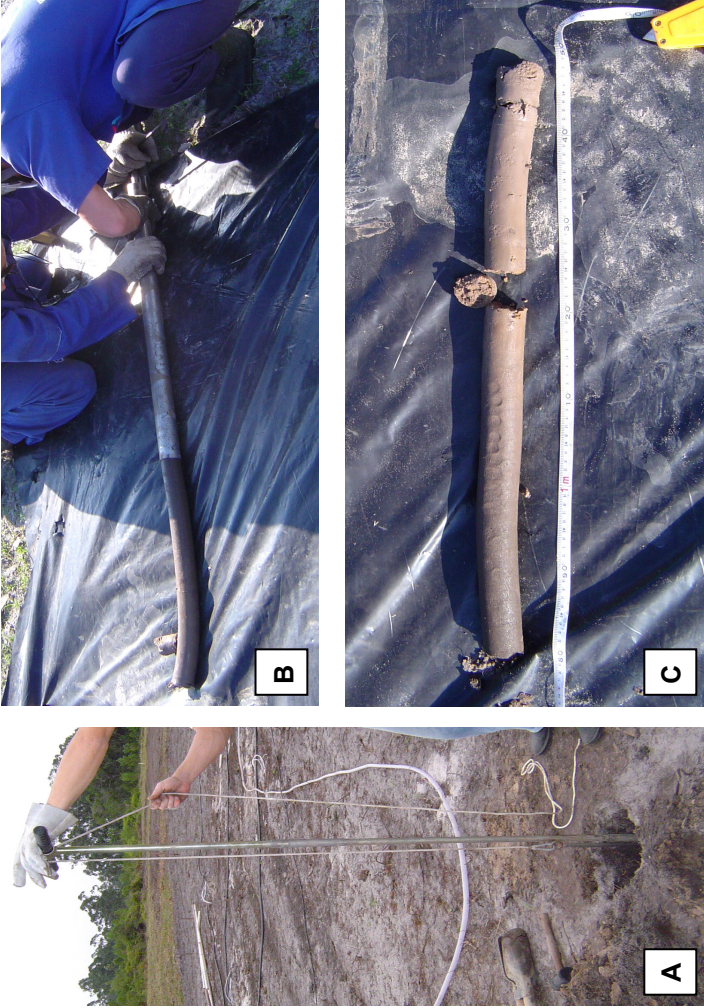


FIGURA 3.3 – Realização de amostragem de solo para a caracterização estratigráfica da área experimental. *Kit* de coleta (A), remoção da amostra do *kit* (B), e amostra pronta para análises de estratigrafia (C).

Após a observação do perfil estratigráfico das áreas experimentais, foram selecionadas as diferentes camadas de solo do local para a realização de análises granulométricas e de difratometria de raios-x.

As análises granulométricas permitem caracterizar o diâmetro dos grãos e as proporções relativas em que estes se encontram distribuídos no solo. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Mecânica dos Solos, do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina, através de ensaios de peneiramento e sedimentação, segundo a norma proposta pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), NBR 7181/84 (ABNT, 1984).

As análises de difratometria de raios-x foram utilizadas para determinação das propriedades mineralógicas das argilas presentes nas diferentes camadas do solo. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Difração de Raios X, do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todas as amostras foram analisadas via difração de raios-x sob a forma de *amostra orientada*. As amostras foram analisadas na sua forma natural, expandida por saturação com etilenoglicol (glicolada) e calcinada a 550°C durante 2 h. A saturação com etilenoglicol foi realizada para verificação da existência ou não de argilominerais expansivos. O aquecimento da amostra visa uma identificação mais precisa, avaliando a existência de argilominerais cujas estruturas entram em colapso nestas condições (como é o caso dos argilominerais do Grupo das Caulinitas).

Algumas camadas de solo também foram selecionadas para determinação da porosidade efetiva (η_e), grandeza que representa o volume de água drenável. Os ensaios com essa finalidade foram realizados no Laboratório de Irrigação e Drenagem, do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, através do emprego do método da *Mesa de Tensão* (LEAMER e SHAW, 1941) (FIGURA 3.4). Este método se baseia na extração da água contida nos macroporos de uma amostra previamente saturada, através da aplicação de uma tensão correspondente a uma coluna de água de 60 cm. Para tanto, amostras indeformadas de solo foram coletadas em anéis metálicos de 3 cm de diâmetro por 2 cm de altura, confeccionados com um bisel em uma das extremidades, e colocadas sobre a mesa. O procedimento de drenagem foi realizado durante 24 horas. Após esse período, os anéis, contendo as amostras, foram pesados e transferidos para uma estufa (110°C) para a posterior determinação do peso seco. As amostras foram coletadas em triplicatas.



FIGURA 3.4 – Amostras de solo nos anéis metálicos dispostas sobre a mesa de tensão para determinação da porosidade efetiva.

A porosidade efetiva (%) foi determinada pela diferença entre a porosidade total (Equação 3.2) e a umidade retida (%) (Equação 3.3).

$$\text{Porosidade Total (\%)} = \frac{(a-b)}{a} \times 100 \quad (3.2)$$

em que:

- a = densidade da partícula [$a = 2,65 \text{g.cm}^{-3}$ para solo mineral];
- b = densidade aparente [g.cm^{-3}], obtida pela relação entre a massa de solo seca e o volume da amostra.

$$\text{Umidade Retida (\%)} = \frac{(m_d - m_s)}{m_s} \times 100, \quad (3.3)$$

em que:

m_d = massa de solo drenada [g];

m_s = massa de solo seca [g].

O estudo da hidrogeologia local possibilitou um conhecimento prévio do comportamento da água subterrânea e, juntamente com o acompanhamento da variação de algumas grandezas, auxiliou na interpretação dos resultados obtidos durante o processo de monitoramento das plumas de compostos dissolvidos.

3.1.2. Caracterização hidrogeológica da área

Antes da liberação do biodiesel na área de estudo, foram coletadas amostras de água subterrânea para a determinação dos parâmetros físico-químicos de referência do local (*background*), cujas mudanças são importantes para a avaliação da biodegradação ao longo do tempo. Estas amostras foram coletadas nas duas áreas experimentais, em todos os poços³, em cinco diferentes profundidades (níveis) de monitoramento (conforme será descrito no item 3.2). Foram analisados diretamente no campo a temperatura, o pH, a condutividade específica, o oxigênio dissolvido, o potencial de oxidação-redução (Eh^0) e a salinidade. Ânions acetato (CH_3COO^-), cloreto (Cl^-), nitrito (NO_2^-), brometo (Br^-), nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}) e sulfato (SO_4^{2-}) foram analisados por cromatografia iônica no Laboratório REMAS (UFSC). Além desses parâmetros, também foram analisados ferro (II), sulfeto, metano, alcalinidade e acidez. Os métodos utilizados para essas análises estão descritos no item 3.2.2.

³ Poços instalados previamente à readequação da configuração das áreas experimentais.

Além da água subterrânea, foi realizada uma caracterização geoquímica do aquífero para a determinação das concentrações de carbono orgânico e de nutrientes no solo. O teor de carbono orgânico no solo é uma grandeza importante para a avaliação da sorção e do retardo dos contaminantes no aquífero; já o conhecimento das concentrações de nutrientes é importante, pois estes são indispensáveis ao crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos necessários à biodegradação dos contaminantes. As amostras de solo foram coletadas ao redor da área, em diferentes profundidades, e analisadas pelo Laboratório Físico-Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). A determinação do teor de matéria orgânica contida no solo foi feita pelo método colorimétrico. Em seguida, pôde-se fazer uma conversão do teor de matéria orgânica a carbono orgânico, dividindo-se o percentual da matéria orgânica por 1,72 (JARAMILLO, 1996). As concentrações de nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, manganês, alumínio, sódio, boro e cobre) foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica.

3.2. EXPERIMENTOS DE CAMPO

Para o monitoramento das plumas de compostos dissolvidos nas áreas experimentais foram instalados poços multiníveis na direção preferencial de deslocamento da água subterrânea. Cada experimento abrange uma área de, aproximadamente, 330 m². A orientação e a disposição dos poços de monitoramento podem ser visualizadas na FIGURA 3.5. Para cada produto foram instalados 47 poços⁴, cada um com 5 níveis de monitoramento (localizados a 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 m de profundidade em relação ao nível do terreno). Cada um dos níveis foi identificado através de fitas com diferentes cores, como pode ser visto na FIGURA 3.6.

⁴ 36 poços previamente à liberação dos produtos e 11 poços em junho de 2010 para readequação das áreas experimentais conforme a direção preferencial do fluxo da água subterrânea.

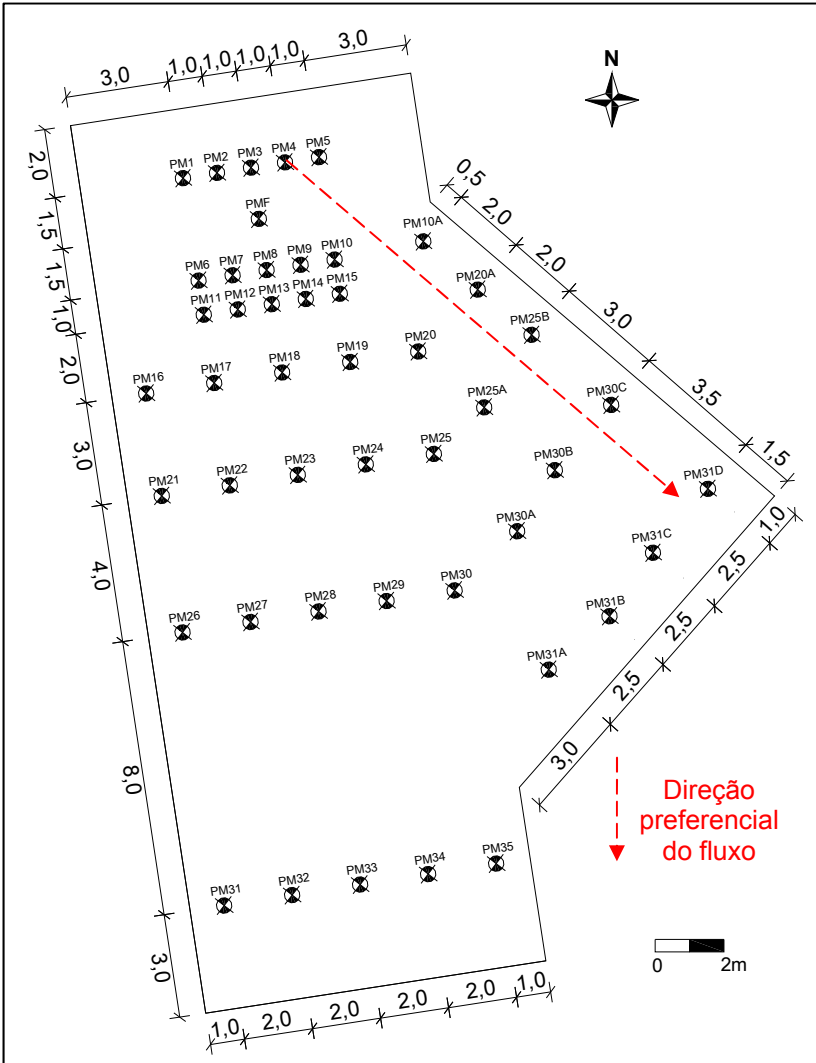


FIGURA 3.5 – Experimento de campo: orientação e disposição dos poços de monitoramento em cada uma das áreas experimentais.

Nota: PM – poço de monitoramento; PMF – poço de monitoramento da Fonte.

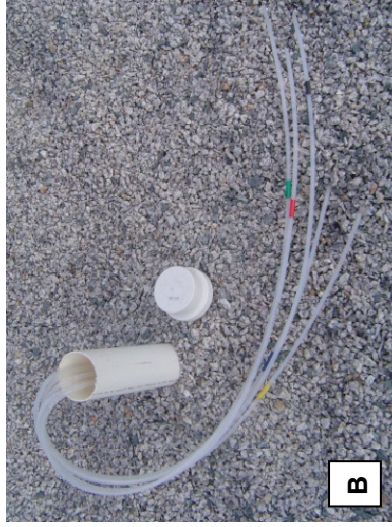


FIGURA 3.6 – Experimentos de campo: A) Visualização geral das áreas experimentais; B) Detalhe de um poço de monitoramento multinível instalado.

Para a confecção dos poços de monitoramento foram utilizados canos de PVC, mangueiras de PEBD (polietileno de baixa densidade) e telas de aço inox. Os canos de PVC, de 6,0 m de comprimento e 20 mm de diâmetro externo, tiveram a função de suporte, mantendo cada uma das mangueiras de PEBD no nível pré-determinado. Essas, por sua vez, possuíam diâmetro externo de $\frac{3}{16}$ " e foram utilizadas para o bombeamento das amostras de água subterrânea a serem analisadas. As telas de aço inox possuíam malha 100 e funcionaram como filtros, evitando a passagem das partículas do solo e dos produtos em fase livre. O desenvolvimento da instalação dos poços e alguns detalhes construtivos são mostrados na FIGURA 3.7.



FIGURA 3.7 – A) Instalação de um poço de monitoramento em uma das áreas experimentais (as mangueiras de PEBD são suportadas pelo cano de PVC); B) Detalhe do filtro de tela de aço inox em um dos níveis de monitoramento.

3.2.1. Fontes de contaminação

No dia 12 de junho de 2008 foram liberados 100 litros de biodiesel puro de soja na área denominada B100 e 100 litros da mistura contendo 20% em volume de biodiesel de soja e 80% em volume de óleo diesel na área denominada B20. A liberação dos produtos ocorreu na parte da tarde, o céu estava encoberto e houve chuva (6 mm) na madrugada que antecedeu a liberação. Foram cavados dois buracos, um em cada área, nas regiões caracterizadas como *fontes de contaminação* (FIGURA 3.8). Ambos possuíam 1,0 m largura \times 1,0 m comprimento \times 1,5 m profundidade. Esta foi a profundidade em que foram encontrados os níveis da água nas regiões das fontes (FIGURA 3.9). Os níveis da água nos piezômetros ao redor da área estão listados na TABELA 3.1 e suas medidas estão relacionadas à cota do terreno.

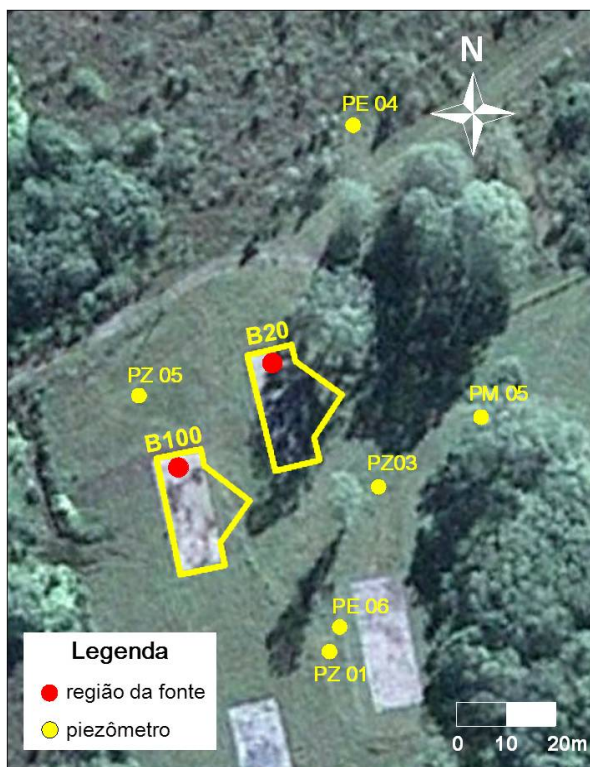


FIGURA 3.8 – Áreas experimentais e as respectivas regiões das fontes.

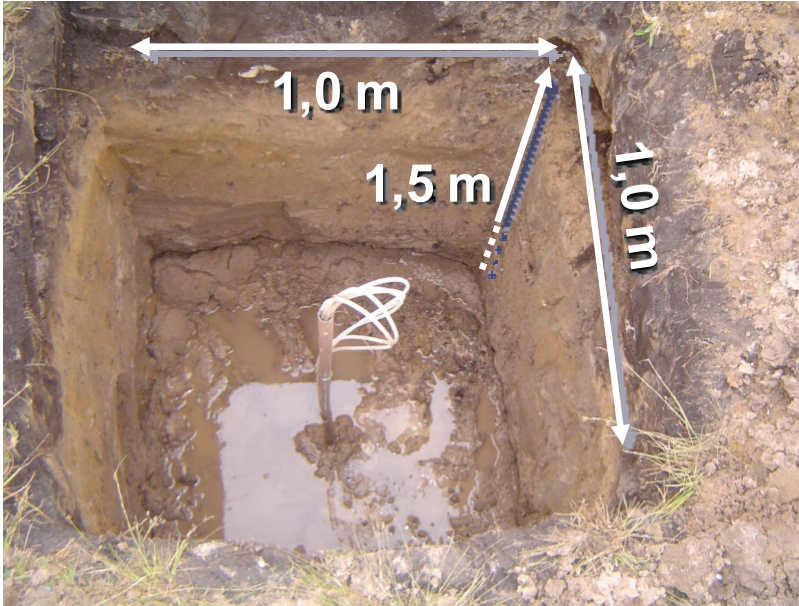


FIGURA 3.9 – Abertura para liberação dos produtos, com detalhe do afloramento do lençol freático.

TABELA 3.1 – Nível da água ao redor da área de liberação dos produtos.

Piezômetro	Nível d'água	Piezômetro	Nível d'água
PZ05	-0,389 m	PZ07	-1,325 m
PZ02	-1,294 m	PZ03	-1,288 m
PE06	-1,336 m	PM05	-1,519 m
PZ01	-1,358 m	PE04	-1,067 m

A partir dos buracos abertos, pôde-se verificar a existência de diferentes camadas no solo, inclusive a concentração de ferro em alguns pontos (FIGURA 3.10). Antes da liberação foram coletadas, em cada uma das fontes, amostras de solo saturado para análises de biologia molecular (extração de DNA) (a 1,5 m de profundidade).

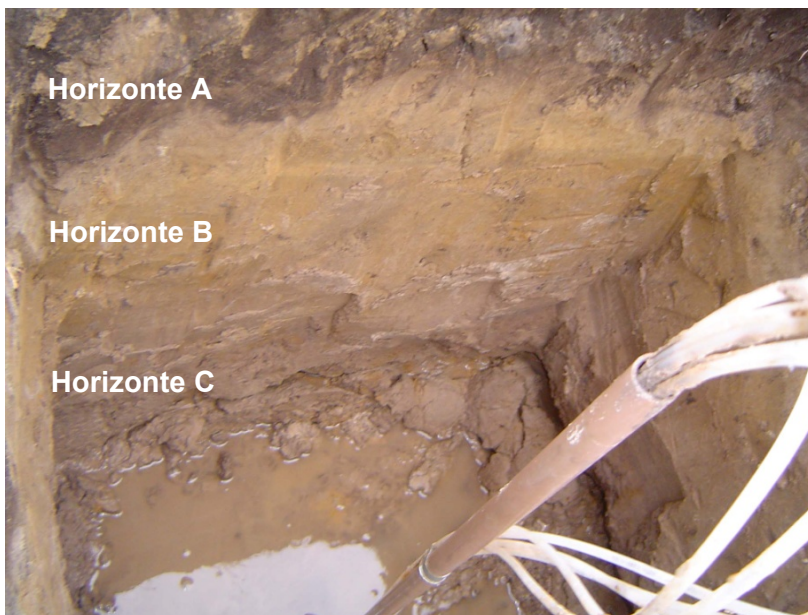


FIGURA 3.10 – Verificação das diferentes camadas do solo da área e da presença de regiões com concentrações de ferro.

Previamente à liberação dos produtos, um traçador com característica conservativa foi derramado nas regiões das fontes, a fim de se monitorar o transporte das plumas de compostos dissolvidos (SCHREIBER e BARH, 2002). Neste estudo, o traçador utilizado foi o brometo de potássio (KBr). Foram retirados 10 L de água de cada um dos poços escavados para a dissolução de 2,0 kg do agente traçador. Em seguida, esse volume de água contendo brometo de potássio foi devolvido a seus respectivos poços (FIGURA 3.11).



FIGURA 3.11 – Liberação de agente traçador na região da fonte.

Após a adição do traçador, 100 L de cada produto foram liberados em suas respectivas áreas (FIGURA 3.9). O biodiesel puro de soja apresentava uma coloração amarelo-alaranjada. Já a mistura B20 teve de ser preparada antes da liberação. Para isso foram misturados 80 L de diesel fóssil e 20 L do biodiesel puro de soja. Depois de pronta, esta mistura apresentou coloração amarelo-clara, muito provavelmente decorrente da predominância do diesel de petróleo. Diferentemente do que se observou durante o lançamento do produto puro, a mistura B20 apresentou a formação de espuma durante seu preparo e liberação. A formação de espuma provavelmente foi facilitada pela diminuição da tensão superficial quando houve o contato do biodiesel com o diesel (efeito surfactante).

Após a liberação dos biocombustíveis, as fontes foram cobertas com solo nativo, respeitando-se ao máximo a ordem das camadas, e as áreas dos experimentos foram, então, cobertas com lona plástica especial de 200 micra de espessura e pedriscos de 5 mm de diâmetro. Essa proteção com lona e pedriscos, cuja extensão está representada no contorno da área da FIGURA 3.5, teve como finalidade a minimização da volatilização dos produtos, do crescimento de vegetação e da influência direta da infiltração da água da chuva nas áreas, simulando, assim, o que acontece em um posto de abastecimento automotivo quando há um derrame proveniente de um tanque de armazenamento subterrâneo.



FIGURA 3.12 – Cobertura da região da fonte com o solo nativo.

3.2.2. Amostragem da água subterrânea e determinações analíticas

As amostras de água subterrânea foram coletadas utilizando-se bomba peristáltica da marca *Millipore*, modelo *Easy-Load* e, para cada poço, foi utilizada uma mangueira *Masterflex® Tygon* (que não reage com os componentes do óleo diesel e do biodiesel de origem vegetal), evitando, assim, contaminação de um poço para outro. Temperatura, pH, condutividade específica, oxigênio dissolvido, potencial de oxidação-redução (Eh^0) e salinidade foram analisados diretamente no campo através de um analisador *Micropurge® Flow Cell*, modelo MP20. Para as análises de laboratório, foram coletadas quatro amostras em cada nível, sendo uma para a determinação de BTEX, outra para HPA, outra para os ânions e demais variáveis físico-químicas, e uma quarta para ácidos graxos voláteis provenientes da degradação do biodiesel.

As amostras destinadas às análises de BTEX e metano foram armazenadas em frascos de vidro de 40 mL, com tampa plástica e septo de teflon, contendo o conservante HCl (1 mol.L^{-1}) para manter o pH abaixo de 2,0, a fim de inibir a atividade microbiana (USEPA, 2001). As demais amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar, com tampa plástica e tampulho plástico recoberto com teflon, com diferentes volumes e conservantes: para as análises de HPA, os frascos eram de 100 mL, contendo o conservante tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,008%; para as análises de ácidos graxos voláteis, as amostras foram coletadas em frascos de 30 mL, contendo ácido oxálico diidratado ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ para manter o pH menor que 2,0 e, consequentemente, os compostos em suas formas não dissociadas, facilitando a saturação dos sítios básicos na coluna analítica; para as demais análises, foram utilizados frascos de 300 mL. As amostras de água foram succionadas de forma a evitar aeração e os frascos foram totalmente preenchidos (sem *headspace*) a fim de evitar perdas por volatilização. Imediatamente após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e analisadas em até 7 dias.

Para as análises dos compostos BTEX e metano, foi utilizado um cromatógrafo a gás da marca *Agilent*, modelo 6890, com *Headspace Auto Sampler* estático, modelo 7694, equipado com detector por ionização em chama (FID) e conectado a um computador com o Software *ChemStation A.10.02*. O gás de arraste empregado foi o hélio, com velocidade de $7,0 \text{ mL.min}^{-1}$. A coluna capilar era de sílica fundida

HP 1 (metilsiloxano) n° 19095z-123 (HP, USA), com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e espessura do filme de 2,65 µm. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 260°C e 280°C, para os BTEX, e a 190°C e 280°C, para o metano. A temperatura foi programada da seguinte maneira para os BTEX: 70°C por 2 min com taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ até 120°C e 30°C.min⁻¹ até 210°C. Para o metano as análises foram realizadas em isoterma, à temperatura de 40°C. O método empregado foi o EPA/5021A combinado com o método EPA/8015D (USEPA, 1996a). Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da medida de linearidade com os dados de área. Para os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m,p*-xileno, *o*-xileno e metano, os limites de detecção foram, respectivamente: 1 µg.L⁻¹, 1 µg.L⁻¹, 1 µg.L⁻¹, 2 µg.L⁻¹, 2 µg.L⁻¹ e 3 µg.L⁻¹. Os limites de quantificação foram de 3 µg.L⁻¹, 2 µg.L⁻¹, 3 µg.L⁻¹, 6 µg.L⁻¹, 5 µg.L⁻¹ e 10 µg.L⁻¹, respectivamente. As soluções padrão para BTEX foram preparadas com o padrão *UST Modified Gasoline Range Organics*, da *Supelco*, segundo a norma EPA/8015A – *Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatography* (USEPA, 1996a). Para o metano, a solução padrão foi preparada a partir do gás metano padrão com 99,5% de pureza, da empresa *White Martins*: o gás-padrão foi borbulhado durante 5 minutos num recipiente contendo água ultrapura, garantindo a obtenção do equilíbrio entre as duas fases (gasosa e aquosa). Com base na Lei de Henry, foi possível calcular a concentração de metano na fase aquosa (STUMM e MORGAN, 1981). Para tanto, foram consideradas a pressão parcial do gás igual a 1 atm e a constante da Lei de Henry para o metano ($K_H = 6,58 \times 10^{-1} \text{ atm.m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) (TOXNET, 2008).

As amostras de HPA foram extraídas pelo método de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) (Método EPA 525.2). Foram utilizados cartuchos de SPE (Spe-edTM, 0,2 a 0,5 g / 3 mL, marca *Applied Separations*) de Octadecyl (C₁₈/18%C), acoplado a um sistema de vácuo tipo “*manifold*” (USEPA, 1996a). Primeiramente, foi feito o acondicionamento do cartucho com 3 mL de metanol e em seguida 3 mL de água. As amostras foram percoladas através do cartucho em um fluxo de 4 a 10 mL.min⁻¹. A eluição foi realizada através da passagem do solvente (diclorometano), volume de aproximadamente 6 mL em fluxo de 1 a 2 mL.min⁻¹. O extrato final foi concentrado em 1 mL com fluxo de nitrogênio. As análises foram realizadas segundo o método 8100 da USEPA em cromatógrafo a gás, da marca *Agilent*, modelo 6890N, equipado com detector por ionização em chama (FID), a 320°C. As injeções (2 µL) foram realizadas através do auxílio de um *Autosampler*

da marca *Agilent*, modelo 7683B. O injetor utilizado foi o split/splitless a 260°C, com fluxo do gás carreador constante a 3 mL.min⁻¹. Modo de injeção: splitless. As separações ocorreram em uma coluna capilar HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e espessura do filme de 0,25 mm. O forno teve a seguinte programação de temperatura: 40°C por 3 min com taxa de aquecimento de 30°C.min⁻¹ até 120°C, na sequência, 6°C.min⁻¹ até 300°C e isoterma de 6 minutos. Gases: fluxo de H₂: 30 mL.min⁻¹, fluxo de ar: 300 mL.min⁻¹, fluxo *make-up* (He): 30 mL.min⁻¹. A quantificação dos HPA foi realizada pelo método da padronização externa com o auxílio do Software *ChemStation A.10.02*. O padrão utilizado foi *PAH-Mix 9* da empresa *Dr. Ehrenstorfer GmbH*. Os limites de detecção e quantificação para os HPAs foram determinados através do método baseado nos parâmetros da curva de calibração: naftaleno (7 e 22 µg.L⁻¹), metil naftaleno (5 e 16 µg.L⁻¹), dimetil naftaleno (7 e 21 µg.L⁻¹), acenafetileno (8 e 24 µg.L⁻¹), acenafteno (8 e 24 µg.L⁻¹), fluoreno (8 e 26 µg.L⁻¹), fenantreno (9 e 30 µg.L⁻¹), antraceno (9 e 3 2µg.L⁻¹), fluoranteno (10 e 35 µg.L⁻¹), pireno (9 e 32 µg.L⁻¹), benzo(a)antraceno (9 e 32 µg.L⁻¹), criseno (10 e 33 µg.L⁻¹), dibenzo(A,H)antraceno (12 e 42 µg.L⁻¹), benzo(b)fluoranteno (12 e 37 µg.L⁻¹), benzo(k)fluoranteno (31 e 94 µg.L⁻¹), benzo(a)pireno (36 e 110 µg.L⁻¹), indeno(1,2,3-CD)pireno (28 e 86 µg.L⁻¹), benzo(G,H,I)pirileno (11 e 34 µg.L⁻¹). Na prática, foi utilizado um limite de quantificação 100 vezes menor, devido o fator de pré-concentração que foi de 100:1.

Os ânions brometo (Br⁻), cloreto (Cl⁻), nitrato (NO₃⁻), fosfato (PO₄⁻³) sulfato (SO₄⁻²) e acetato (CH₃COO⁻) foram analisados por cromatografia iônica, em cromatógrafo de íons da *Dionex* (modelo ICS-1000), equipado com detector de condutividade iônica, em regime isocrático, utilizando 4,5 mmol.L⁻¹ de carbonato de sódio e 1,4 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de sódio como eluentes, a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A coluna utilizada foi AS22 (4 x 250 mm), a supressora foi ASRS – ULTRA II (4 mm), o volume de injeção foi de 25 µL e a condutividade, de 19 – 20 µS (Método USEPA 300.0 – *Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography*). Para a quantificação dos compostos de interesse, utilizou-se a padronização externa, com curvas de calibração cujas concentrações variaram entre 0,1 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹. Os sais utilizados para a preparação das soluções padrões foram todos da marca *J.T. Baker* e a concentração das soluções individuais, de 1000 mg.L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram realizados através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área: acetato (0,13 e

0,41 mg.L⁻¹), nitrito (0,03 e 0,08 mg.L⁻¹), nitrato (0,05 e 0,16 mg.L⁻¹), fosfato (0,12 e 0,35 mg.L⁻¹) e sulfato (0,01 e 0,05 mg.L⁻¹).

As análises de ferro (II) e sulfeto foram conduzidas em espectrofotômetro HACH – DR/2500. Para o ferro (II), o método seguido foi o 3500–Fe D – método 1,10 fenantrolina, e para sulfeto, o método 4500–S² D – método colorimétrico azul de metileno, ambos do *Standard Methods* (APHA, 1992). Os reagentes utilizados foram da HACH: para o ferro (II), foram utilizados 1,10-fenantrolina e bicarbonato de sódio, na proporção para analisar 25 mL de amostra, e para o sulfeto, reagente 1, que contém ácido sulfúrico, oxalato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina e o reagente 2, uma solução de azul de metileno, também na proporção exata para análise de 25 mL da amostra.

A determinação da acidez e da alcalinidade teve como base o método titrimétrico de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 1992) - Métodos 2310B e 2320B. Foram utilizadas soluções padronizadas de hidróxido de sódio 0,02 M e ácido sulfúrico 0,01 M. O ponto de viragem foi obtido através do monitoramento do pH da amostra durante a titulação, utilizando-se uma bureta digital (*Brinkmann*) e um pHmetro marca *ORION* (modelo – 9107BN). O ponto de viragem na determinação da acidez carbônica é em pH 8,3 e para a alcalinidade (bicarbonato) é em pH 4,3. Os resultados foram expressos em mg CaCO₃.L⁻¹.

As análises de ácidos graxos voláteis foram realizadas conforme metodologia proposta por Moraes et al. (2001), em um cromatógrafo a gás da marca *Agilent*, modelo 6890N, com *Autosampler* modelo 7683B, equipado com detector por ionização em chama (FID) e conectado a um computador com o Software *ChemStation A.10.02*. A coluna capilar era de polietilenoglicol (HP-INNOWax), de 30m x 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm e o gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1,9 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 220°C e 250°C. A temperatura inicial de forno foi mantida a 100°C durante 3 minutos, depois foi elevada de 100°C até 185°C a 10°C.min⁻¹ (durante 3 minutos) e até 240°C a 30°C.min⁻¹ (durante 2 minutos). A quantificação dos compostos foi realizada pelo método de padronização externa. Para o preparo da curva de calibração foi utilizado uma mistura padrão da marca *Supelco* (*Volatile Acid Standard Mix*) contendo os seguintes compostos: ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocapróico, ácido capróico e ácido heptanóico. O limite de detecção foi de 1 mg.L⁻¹ para cada ácido.

3.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Além da utilização dos indicadores geoquímicos, a avaliação da biodegradação natural dos produtos liberados nas áreas experimentais foi complementada com técnicas de biologia molecular, que detectam e quantificam as bactérias associadas à biodegradação do contaminante de interesse. Para esse estudo foi utilizado o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*), que pode oferecer evidências diretas dos tipos de processos microbiológicos atuantes na remoção dos contaminantes. *qPCR* tem sido utilizado como ferramenta para investigação do potencial de biodegradação dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (DA SILVA e ALVAREZ, 2004; CAPIRO et al., 2008). No Laboratório REMAS, essas análises tem sido realizadas por uma equipe especializada.

3.3.1. Extração de DNA

Para a caracterização da população microbiana nativa, antes da liberação dos produtos nas áreas experimentais, aproximadamente, 500 g de solo foram coletados em cada uma das regiões das fontes de contaminação, a uma profundidade de 1,5 m. Após homogeneização de cada amostra de solo, 0,25 g foi utilizado para extração de DNA. Nesta etapa, foi utilizado o *DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA)* e o DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 µL de solução contendo DNA foram obtidos e armazenados em frascos de 2 mL (*Eppendorf*), livres de DNA e RNA, e estocados em freezer (-30°C, *MidSci*) para análises em PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*).

Durante as campanhas de monitoramento, novas análises de microbiologia foram realizadas, no entanto, a partir de amostras de água. Foi coletado 1 litro de água subterrânea de cada ponto de amostragem. Este volume de água foi filtrado em *Kitasato* e bomba a vácuo, utilizando-se filtro *Millipore* de 0,22 µm. Após filtração, os filtros foram submetidos à extração do DNA seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

3.3.2. PCR quantitativo (*qPCR*).

As análises de biologia molecular foram realizadas utilizando o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*). *qPCR* foi utilizado para quantificar bactérias totais, redutoras de nitrito, redutoras de ferro (III) (gênero *Geobacter*), redutoras de sulfato (*δ-Proteobacteria*, como *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfuromosa*, e *Desulfuromonas*), e arqueas (incluindo as metanogênicas). As análises foram realizadas no equipamento *Mastercycler ep realplex (Eppendorf)*. A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando-se os iniciadores (*primers*) BACT1369F e PROK1492R e a sonda (*probe*) TM1389F (BELLER et al., 2002). A concentração das arqueas foi estimada utilizando-se os iniciadores ARCH1-1369F e PROK1541R e sonda TM1389F. Para a quantificação desses micro-organismos, a reação de *qPCR* foi feita com o kit *Taqman (Applied Biosystems, EUA)*. A concentração das bactérias redutoras de nitrito foi estimada utilizando-se os iniciadores nirK1F/nirK5R e nirS1F/nirS6R. A quantificação das bactérias redutoras de ferro (III) foi obtida utilizando-se os iniciadores 561F e 825R. Bactérias redutoras de sulfato foram quantificadas utilizando os iniciadores 361F e 685R. O kit para reação de *qPCR* utilizado para a quantificação dessas bactérias foi o *Sybr-Green (Applied Biosystems, EUA)*. Todos os iniciadores e sondas foram obtidos da empresa *Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA)*. A concentração de bactérias por amostra foi determinada de acordo com Da Silva e Alvarez (2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados indicam as principais características do solo e da água subterrânea nas áreas experimentais antes da liberação dos produtos e a variação das grandezas biogeoquímicas na água subterrânea após as liberações controladas de B100 e B20.

4.1. CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA ÁREA EXPERIMENTAL

4.1.1. Caracterização hidrogeológica

O monitoramento da variação das cargas potenciométricas do lençol freático na área experimental permitiu a definição da direção preferencial do fluxo da água subterrânea na região dos experimentos. Um mapa potenciométrico típico é mostrado na FIGURA 4.1. A partir de então, foi possível alocar as fontes de contaminação e determinar a orientação dos poços de monitoramento das plumas de compostos dissolvidos. A localização dos experimentos na área também pode ser observada nesta figura.

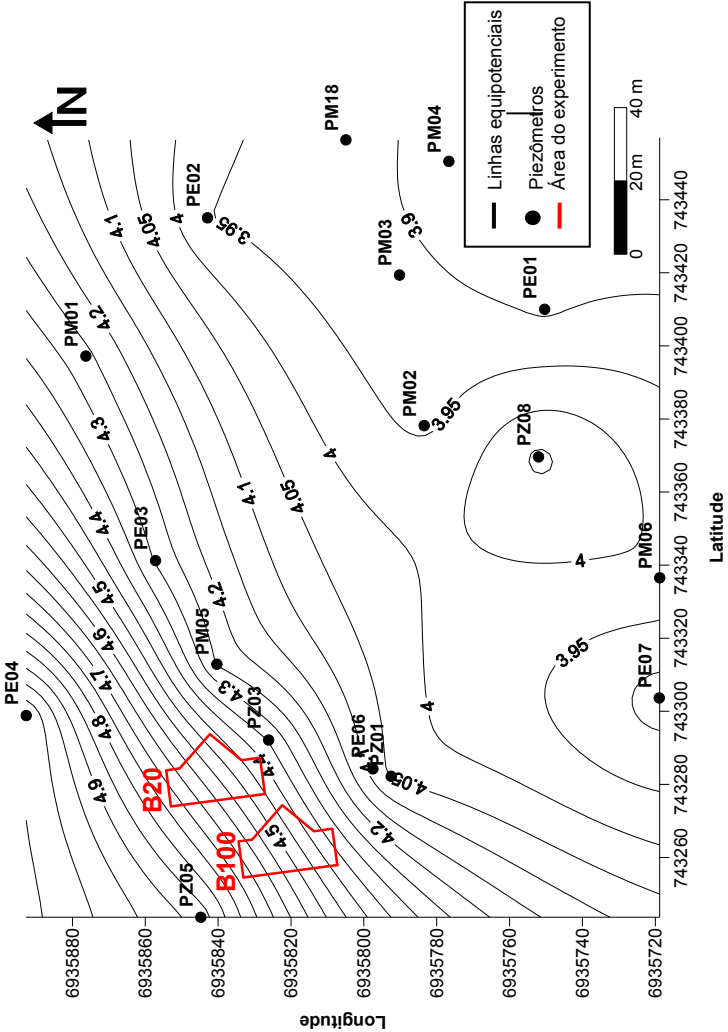


FIGURA 4.1 – Mapa potenciométrico, indicando a direção preferencial do fluxo e a localização dos experimentos na área.

A partir dos dados de carga potenciométrica, medidos nos piezômetros localizados próximos aos experimentos, e da condutividade hidráulica na porção saturada determinada por Lage (2005), estimou-se a velocidade intersticial da água subterrânea no local dos experimentos (ver item 3.1.1 para maiores detalhes). Esta velocidade foi estimada em $6,5 \text{ m.ano}^{-1}$, valor este muito próximo ao relatado em Chiaranda (2006), de $6,0 \text{ m.ano}^{-1}$, para um experimento próximo a estes.

O monitoramento das flutuações do lençol freático na área indicou que este varia, em média, de 1,0 a 2,0 metros de profundidade em relação ao nível do terreno. Esta variação é mostrada na FIGURA 4.2. Nesta mesma figura também é possível observar a variação pluviométrica próxima à área onde se localizam os experimentos e como ela influencia a variação do lençol. A precipitação total anual média para os anos de 2007, 2009 e 2010 foi de 1360 mm. O ano de 2008 não foi considerado nesta média uma vez que não foi possível determinar o total anual devido a falhas no pluviógrafo durante os meses de agosto a dezembro deste ano.

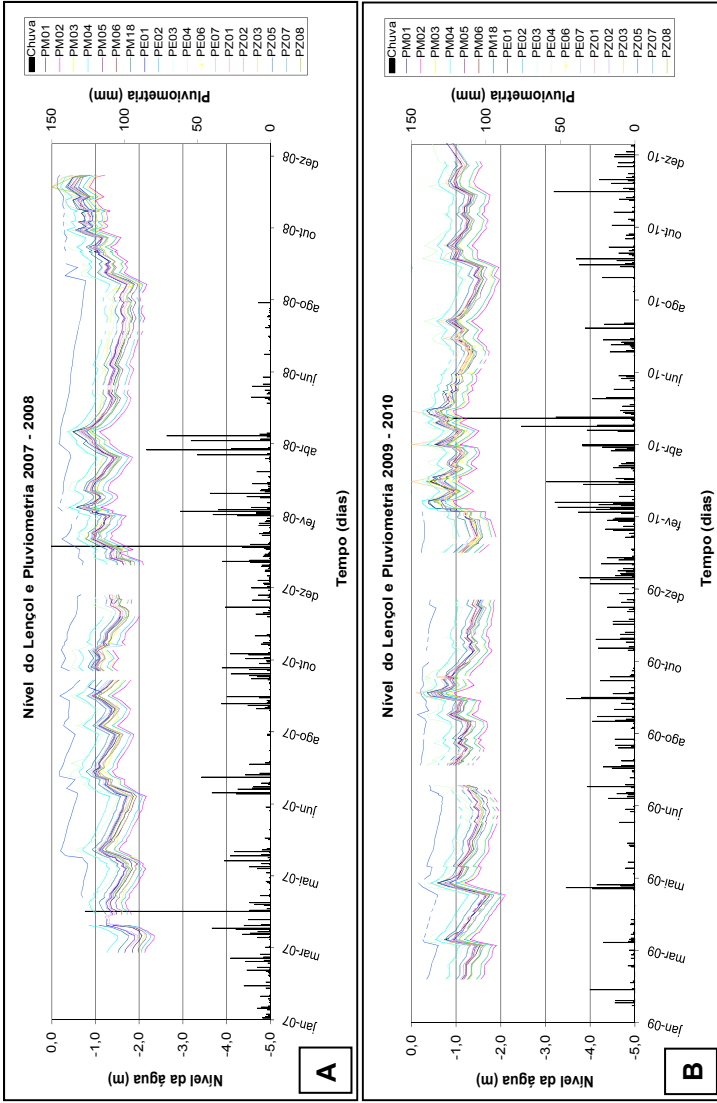


FIGURA 4.2 – Variação do nível do lençol freático na área dos experimentos (em metros, em relação ao nível do terreno) e da pluviometria total diária (em milímetros) ao longo dos anos de A) 2007 e 2008; B) 2009 e 2010.

As características físicas do solo também foram avaliadas. Sondagens foram executadas durante a instalação dos poços de monitoramento nas áreas experimentais, em regiões próximas às fontes de contaminação e aos poços de monitoramento denominados PM 28 (FIGURA 4.3). Estes pontos foram escolhidos a fim de se obter uma melhor caracterização do solo na região da fonte e a, aproximadamente, 11,5 metros de distância desta (PM 28), por onde se esperava que a pluma de contaminação fosse se estender (anteriormente à readequação das áreas experimentais com a alocação de novos poços de monitoramento).

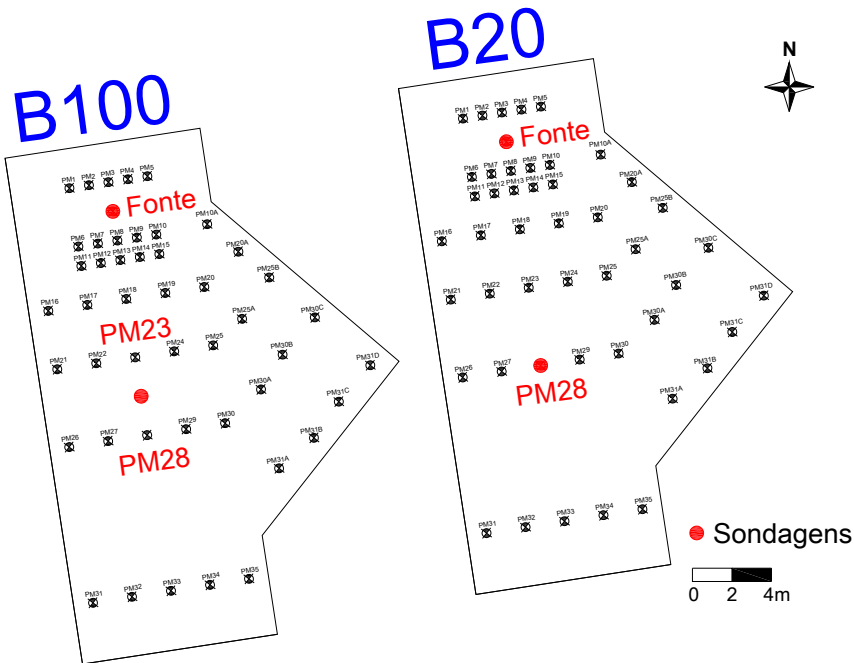


FIGURA 4.3 – Detalhe dos poços utilizados para análises de estratigrafia do solo.

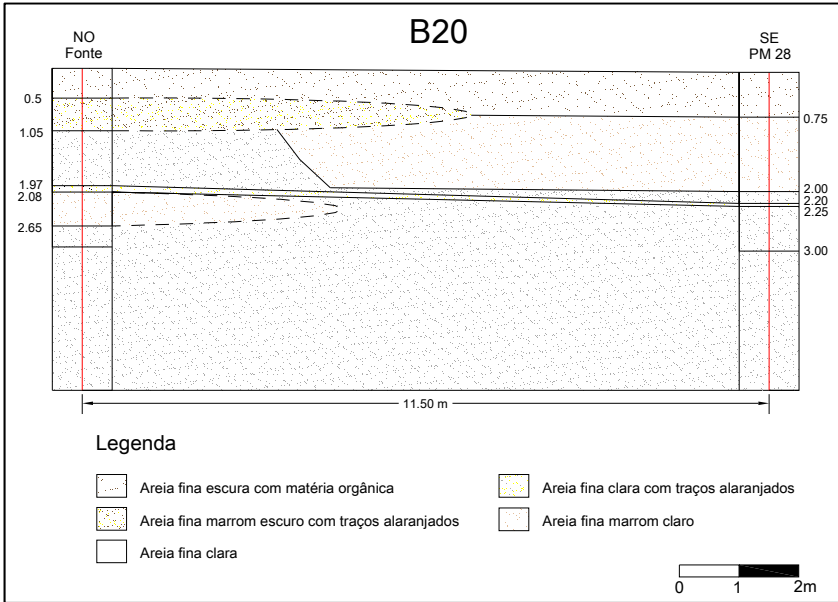


FIGURA 4.5 – Perfil estratigráfico da área B20.

Como descrito no item 3.1.1, após a avaliação dos perfis estratigráficos obtidos, algumas camadas foram selecionadas para a realização de análises granulométricas. Os resultados destas análises confirmaram que as áreas são constituídas, em sua grande maioria, por areia fina (TABELA 4.1).

TABELA 4.1 – Resultado das análises granulométricas realizadas nas diferentes camadas de solo encontradas na área experimental.

Camada	Quantidade de grãos, em %				
	Argila	Silte	Areia Fina	Areia Média	Areia Grossa
Areia fina, marrom escuro c/ traços ala.	6,53%	4,28%	73,10%	16,10%	0,00%
Areia fina, argilosa, marrom claro	15,10%	3,14%	68,97%	12,59%	0,20%
Areia fina, pouco argilosa, clara	7,36%	2,06%	88,61%	1,97%	0,00%
Areia fina, clara	4,86%	3,64%	82,70%	8,80%	0,00%
Areia fina, marrom claro	3,38%	1,03%	85,90%	9,69%	0,00%

Os resultados granulométricos confirmaram a presença de um teor de argila maior na área com B100, em relação à área com B20. A caracterização visual da camada em torno de 1,0 e 1,5 metro de profundidade como mais argilosa foi dada como certa uma vez que se constatou a presença de 15% de argila (franco-argilosa). O mesmo ocorreu para a camada com profundidade entre 2,0 e 3,0 metros. Já na área experimental com B20, as amostras escolhidas para análise apresentaram menor teor de argila e silte e maior teor de areias (fina e média), assim como era esperado.

Para a caracterização dos argilominerais presentes na fração argilosa das camadas de solo, foram realizados ensaios de difratometria de raios-x. Os resultados destas análises são representados através de difratogramas. A FIGURA 4.6 mostra um exemplo de difratograma obtido. Em todas as amostras foi encontrado quartzo. Em 4 delas, illita e caulinita. Em 3 das 5 amostras, detectou-se a presença de gibbsita. Em 2 amostras foram encontrados esmectita e vermiculita e, somente em uma, clorita. Estes resultados podem ser observados na TABELA 4.2.

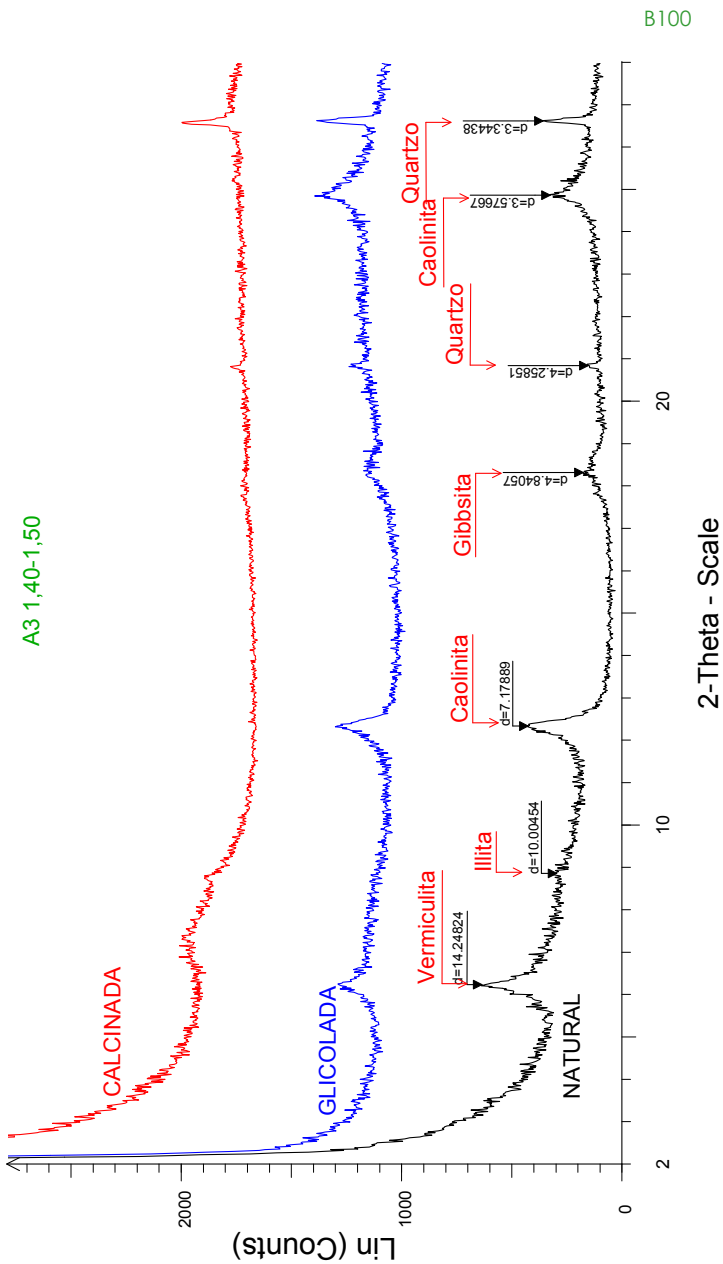


FIGURA 4.6 – Difractograma de uma amostra da área experimental.

TABELA 4.2 – Argilominerais detectados nas diferentes camadas de solo da área experimental.

Camada	Argilominerais							
	Esmectita	Vermiculita	Clorita	Ilita	Caulinita	Gibbsita	Quartzo	
Areia fina, escura, c/ matéria orgânica		X			X		X	
Areia fina, argilosa, marrom claro		X		X	X	X	X	
Areia fina, clara			X	X	X	X	X	
Areia fina, marrom claro	X			X			X	

O quartzo caracteriza-se por ser uma areia muito fina e sua principal influência no escoamento da água subterrânea será mecânica, uma vez que preencherá os espaços vazios entre os grãos que compõem o solo. Com exceção do quartzo, todos os argilominerais detectados apresentam propriedades eletrostáticas, que propiciam troca iônica e adsorção de água. A forma estrutural e a composição mineralógica são as características que diferenciarão o comportamento de cada um deles no solo.

A gibbsita, por exemplo, é um óxido de alumínio que apresenta forma equidimensional e atua como agente desorganizador do solo, diminuindo as forças de coesão e adesão, a plasticidade, a pegajosidade e a dureza do solo, aumentando a capacidade de drenagem. Os demais argilominerais detectados são silicatados (formados basicamente por camadas de sílica (SiO_2) e hidróxido de alumínio ($\text{Al}_2(\text{OH})_3$). Destes, a caulinita e a clorita, apesar de apresentarem diferentes arranjos estruturais, são considerados pouco expansivos em contato com a água e de baixa capacidade de troca catiônica, o que confere ao solo baixa plasticidade, boa agregação, aeração e permeabilidade. Ao contrário destes, a illita, a vermiculita e a esmectita apresentam estruturas que permitem um grau maior de expansibilidade quando em contato com líquidos polares (GRIM, 1962).

A illita é considerada uma argila parcialmente expansiva e com baixa capacidade de troca catiônica, propriedades que lhe conferem baixa adsorção de água e plasticidade. A vermiculita já apresenta um grau de expansibilidade maior e alta capacidade de troca catiônica, o que a torna mais plástica e pegajosa. A esmectita, no entanto, é de grande importância por ter o maior grau de expansão quando em contato com a água, dificultando a drenagem nos locais em que estiver presente (GRIM, 1962).

A expansão das argilas em contato com a água deve-se principalmente à característica polar desse líquido, que favorece sua sorção no espaço interplanar basal dos argilominerais. Isso significa que outros líquidos também podem ser adsorvidos pelas argilas, apresentando, porém, comportamentos distintos em função do grau de polaridade dos mesmos. A presença da esmectita no solo, por exemplo, faz com que o coeficiente de condutividade hidráulica saturada relativo à água apresente resultados discrepantes quando comparados com os resultados medidos para o petróleo e seus derivados, diferença esta que pode ser de até 10^3 vezes mais para as amostras percoladas por hidrocarbonetos de petróleo (OLIVEIRA, 2001).

É bom ressaltar, no entanto, que é muito importante avaliar o teor de argila presente no solo. Oliveira (2001) constatou que, acima de um percentual de 40%, as argilas passam a ser predominantes e influenciam a hidrodinâmica dos fluidos significativamente.

Os resultados dos ensaios utilizando a Mesa de Tensão revelaram que a porosidade efetiva (η_e) no local varia de 18% a 20%, valores característicos para solos arenosos. As amostras foram coletadas em triplicatas e os resultados obtidos são mostrados na TABELA 4.3.

TABELA 4.3 – Resultado da análise da porosidade efetiva (η_e).

Camada	Porosidade Efetiva Média (%)
Areia fina, marrom claro	18,27
Areia fina, marrom escuro, c/ traços alaranj.	18,55
Areia fina, clara	19,82

4.1.2. Caracterização hidrogeoquímica

O resultado da caracterização da água subterrânea, realizada previamente à liberação dos contaminantes nas áreas, pode ser visualizado na TABELA 4.4. Os valores referem-se às medianas de cada uma das grandezas determinadas. A coluna *Total* refere-se à área total de cada experimento e considera todos os poços e níveis de monitoramento para o cálculo da mediana; a coluna *PMF* considera somente o poço de monitoramento da Fonte (todos os níveis); e a coluna *PM09* considera somente o poço de monitoramento nomeado como “09” (todos os níveis). Os valores não detectados foram substituídos pela metade do limite de detecção (GILBERT, 1987). Os resultados encontrados indicam que se trata de uma área com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido e alguma disponibilidade de nitrato (detectado principalmente nos primeiros níveis, devido à utilização anterior da área (pecuária)), boa disponibilidade de sulfato, temperatura favorável à ocorrência de atividades biológicas e pH levemente ácido.

TABELA 4.4 – Caracterização da água subterrânea antes da liberação dos produtos.

Determinações	Área B100			Área B20		
	Total	PMF	PM09	Total	PMF	PM09
Temperatura (°C)	23,32	23,40	22,40	23,10	22,94	22,42
Potencial de oxi-redução (mV)	+328	+353	+383	+389	+400	+436
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	0,28	0,20	0,31	0,38	0,35	0,24
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	0,00	0,00	N.A.	0,00	0,00	N.A.
Acidez (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	52,65	54,41	N.A.	57,14	39,59	N.A.
pH	4,38	4,27	4,25	4,44	4,46	4,28
Cloro (mg.L ⁻¹)	7,19	7,46	6,17	13,23	10,46	19,94
Brometo (mg.L ⁻¹)	0,05 ^{a)}	0,05 ^{a)}	0,05 ^{a)}	0,05 ^{a)}	0,05 ^{a)}	0,05 ^{a)}
Fosfato (mg.L ⁻¹)	0,06 ^{a)}	0,06 ^{a)}	0,06 ^{a)}	0,06 ^{a)}	0,06 ^{a)}	0,06 ^{a)}
Nitrato (mg.L ⁻¹)	0,04	0,13	1,26	0,23	4,73	6,95
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,015 ^{a)}	0,015 ^{a)}	0,015 ^{a)}	0,015 ^{a)}	0,015 ^{a)}	0,015 ^{a)}
Ferro (II) (mg.L ⁻¹)	1,47	1,97	0,67	0,32	0,06	0,23
Sulfato (mg.L ⁻¹)	14,12	11,20	13,78	5,22	4,66	3,30
Sulfeto (mg.L ⁻¹)	0,017	0,008	0,018	0,010	0,004	0,008
Acetato (mg.L ⁻¹)	0,14	0,06 ^{a)}	0,15	0,15	0,24	0,67
Metano (mg.L ⁻¹)	0,002 ^{a)}	0,002 ^{a)}	N.A.	0,002 ^{a)}	0,002 ^{a)}	0,002 ^{a)}

Notas: N.A. – não analisado; a) valor referente à metade do limite de detecção.

As TABELA 4.5 e TABELA 4.6 mostram os resultados das análises realizadas pela CIDASC para determinação do teor de matéria orgânica e nutrientes no solo. Segundo Jaramillo (1996), pode-se converter o valor do teor de matéria orgânica a teor de carbono orgânico, dividindo-se o percentual da matéria orgânica por 1,72. O resultado dessa conversão também é mostrado na TABELA 4.5. As análises geoquímicas demonstraram que o solo da área experimental é caracterizado por baixo teor de carbono orgânico (típico de solos tropicais) e baixas concentrações de macro e micronutrientes.

TABELA 4.5 – Resultado da determinação de matéria orgânica e macronutrientes no solo

Camada	M.O. (%)	C.O. (%)	Macronutrientes (mg.kg solo ⁻¹)					
			N.T.	P	K	Ca	Mg	S
Areia fina, clara	0,50	0,29	500	5,40	21,00	94,3	28,6	0,16
Areia fina, escura, c/ mat.org.	2,40	1,39	900	3,80	7,00	47,2	28,6	0,18
Areia fina, escura, c/ traços a.l.r.	1,00	0,58	500	2,00	11,00	47,2	14,3	0,20
Areia fina, marrom claro	0,40	0,23	400	2,10	13,00	47,2	14,3	0,18

TABELA 4.6 – Resultado da determinação de micronutrientes no solo .

Camada	Micronutrientes (mg.kg solo ⁻¹)							
	FeI	Zn	Mn	Al	Na	B	Cu	
Areia fina, clara	300	0,24	0,76	253,9	38,0	-	0,56	
Areia fina, escura, c/ mat.org.	600	0,32	1,40	253,9	0,0	-	0,16	
Areia fina, escura, c/ traços a.l.r.	700	0,28	1,72	238,1	18,0	-	0,28	
Areia fina, marrom claro	100	0,32	1,48	333,3	74,0	-	1,00	

4.1.3. Análises microbiológicas

Anteriormente à liberação dos produtos nas áreas experimentais, foram coletadas amostras de solo saturado em cada uma das fontes de contaminação para determinação e caracterização da microbiota local (análises microbiológicas controle – *background*). Os resultados preliminares obtidos demonstraram que a concentração bacteriana do local foi baixa ($\approx 10^3$ cópias de genes de bactérias totais. g solo⁻¹), conforme demonstrado pelas análises de *qPCR*. Esta concentração de bactérias relativamente baixa pode ser justificada pelo baixo teor de matéria orgânica. Baixos índices de matéria orgânica refletem em baixa concentração de carbono orgânico disponível para o crescimento celular. De todos os grupos de bactérias investigados (listados no item 3.3.2), somente bactérias totais foram detectadas. Como a concentração de bactérias totais foi relativamente baixa, a concentração de grupos específicos de bactérias (reductoras de ferro (III), nitrito, sulfato, etc.) esteve muito abaixo do limite de detecção do equipamento ($\approx 10^2$ cópias de genes de bactérias totais. g solo⁻¹).

4.2. MONITORAMENTO DOS EXPERIMENTOS DE CAMPO

Os experimentos com liberação controlada de biodiesel foram monitorados através de coletas e análises (em campo e em laboratório) de amostras de água subterrânea. No total, foram realizadas seis campanhas de coleta/análise. A primeira ocorreu antes da liberação dos produtos de modo a determinar os parâmetros físico-químicos de referência do local (*background*). As demais ocorreram conforme mostrado na TABELA 4.7.

O tempo de duração de cada campanha variou conforme a quantidade de poços escolhidos para coleta/análise em cada área. Na maioria das campanhas, foram monitorados os poços numerados de 1 a 25 (FIGURA 4.7). No entanto, para apresentação dos resultados, foram considerados apenas os poços Fonte e PM09 (PM – poço de monitoramento) (FIGURA 4.7 e FIGURA 4.8) de cada uma das áreas experimentais. Estes pontos foram escolhidos, pois representam a direção da linha central da pluma de compostos dissolvidos, em que foram detectadas as maiores concentrações dissolvidas de contaminantes e de subprodutos metabólicos. Nestes pontos, todos os níveis de

monitoramento da água subterrânea (localizados a 2, 3, 4, 5, e 6 metros de profundidade em relação ao nível do terreno) foram amostrados e analisados.

TABELA 4.7 – Períodos em que foram realizados os monitoramentos nas áreas B100 e B20.

Coleta/Análise	Início	Fim	Tempo após a liberação (meses)
1	Novembro / 2007	Dezembro / 2007	0
Liberação dos produtos	Junho / 2008	Junho / 2008	0
2	Julho / 2008	Setembro / 2008	1,3 – 2,7
3	Junho / 2009	Agosto / 2009	12,1 – 14,2
4	Fevereiro / 2010	Fevereiro / 2010	19,7 – 19,9
5	Junho / 2010	Julho / 2010	24,5 – 25,0
6	Novembro/2010	Novembro/2010	29

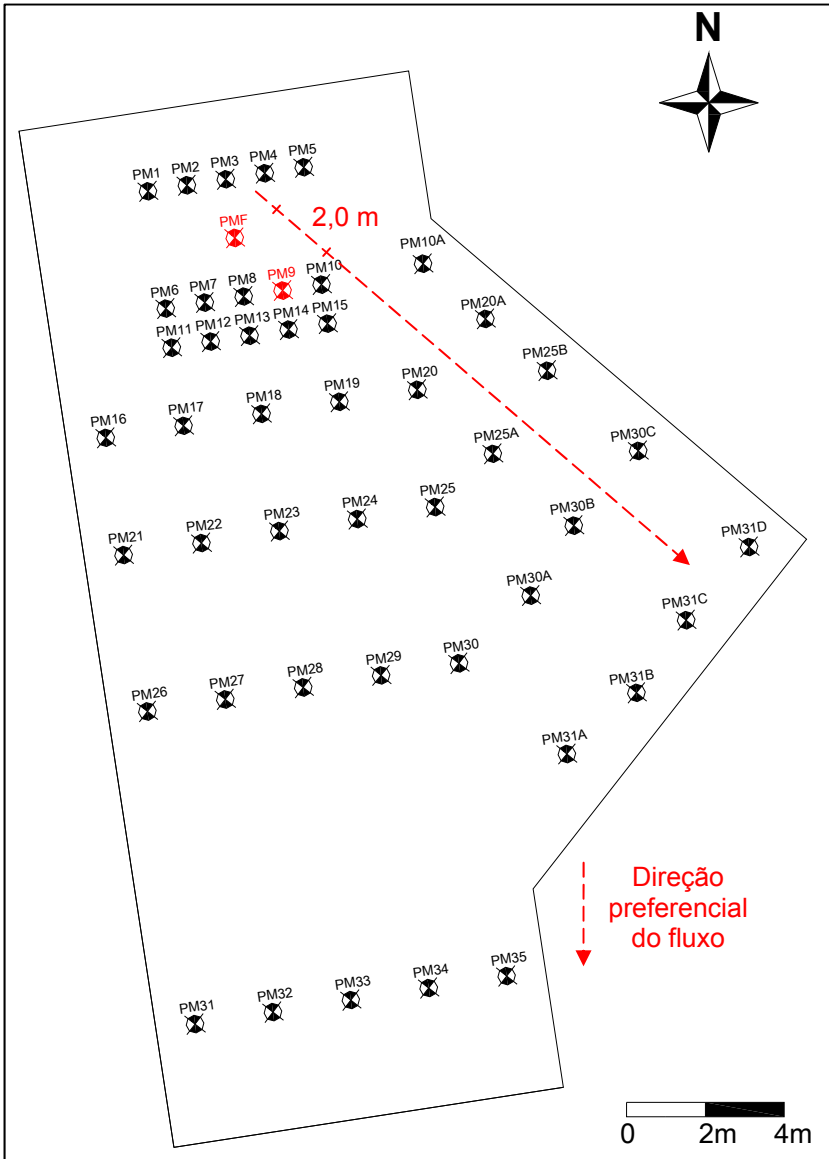


FIGURA 4.7 – Distribuição dos poços nas áreas experimentais. Em destaque estão os poços escolhidos para representação dos resultados, Fonte e PM09.



FIGURA 4.8 – Localização dos poços Fonte e PM09 na área experimental.

4.2.1. Experimento com 100 litros de biodiesel puro de soja (B100)

A ocorrência de processos naturais de atenuação do biodiesel puro (B100) na água subterrânea experimental foi avaliada através do consumo dos receptores de elétrons disponíveis nesse ambiente, da formação de subprodutos metabólicos e da variação de indicadores físico-químicos como o potencial de oxidação-redução, pH, alcalinidade, acidez, dentre outros descritos no capítulo Materiais e Métodos.

As maiores variações ocorreram nos poços Fonte e PM09 e nos dois primeiros níveis de monitoramento, 2 e 3 metros, os mais próximos à profundidade em que o produto foi liberado na área experimental (1,5 metro). As variações detectadas em cada uma dessas duas profundidades podem ser visualizadas nas figuras a seguir. A FIGURA 4.9 e a FIGURA 4.10 referem-se às variações detectadas no nível de monitoramento 2 metros e a FIGURA 4.11 e a FIGURA 4.12, referem-se ao nível 3 metros. O perfil de variações por nível de monitoramento (variação vertical) está disponível no Apêndice A.

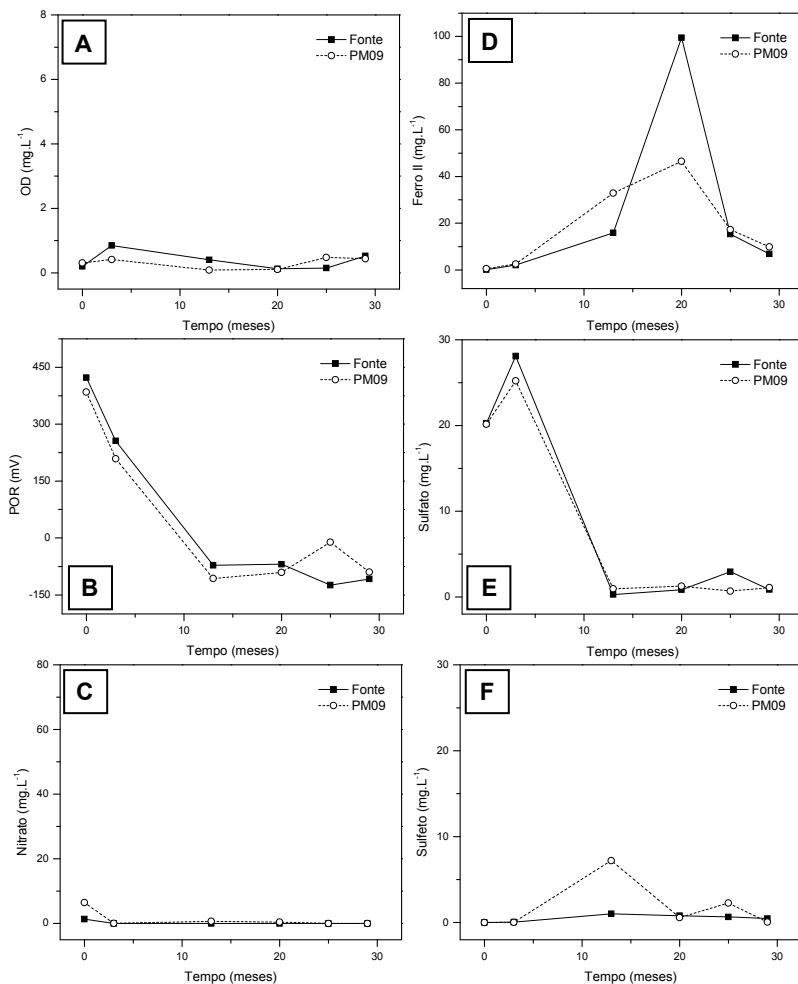


FIGURA 4.9 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.

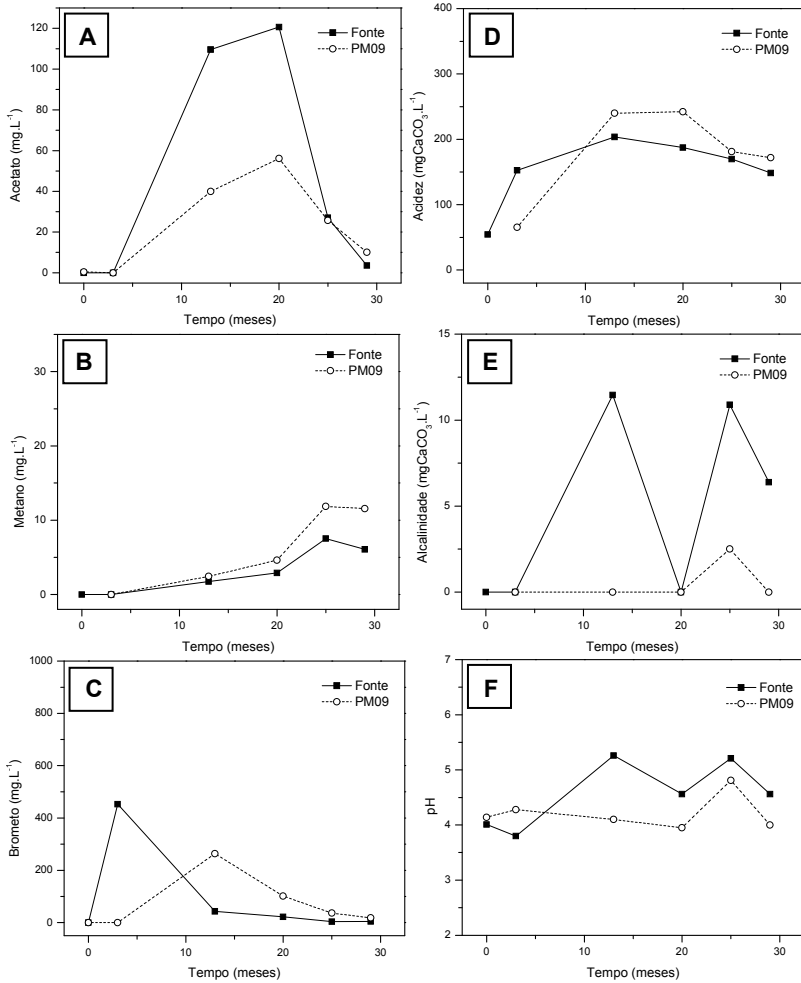


FIGURA 4.10 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.

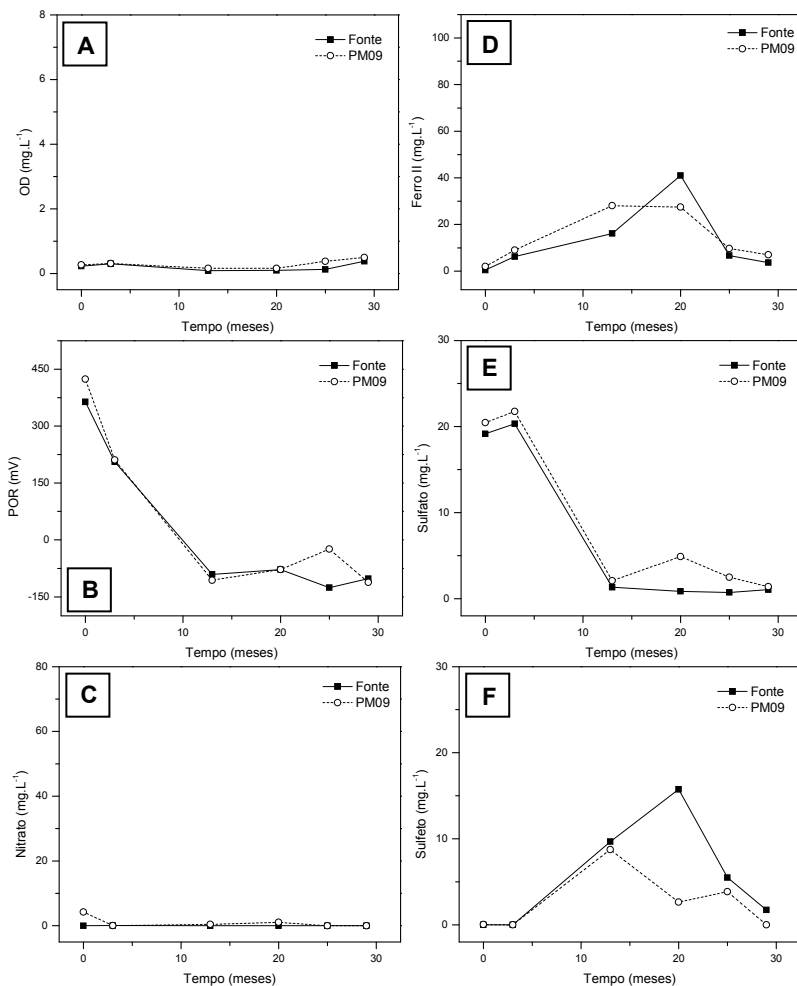


FIGURA 4.11 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.

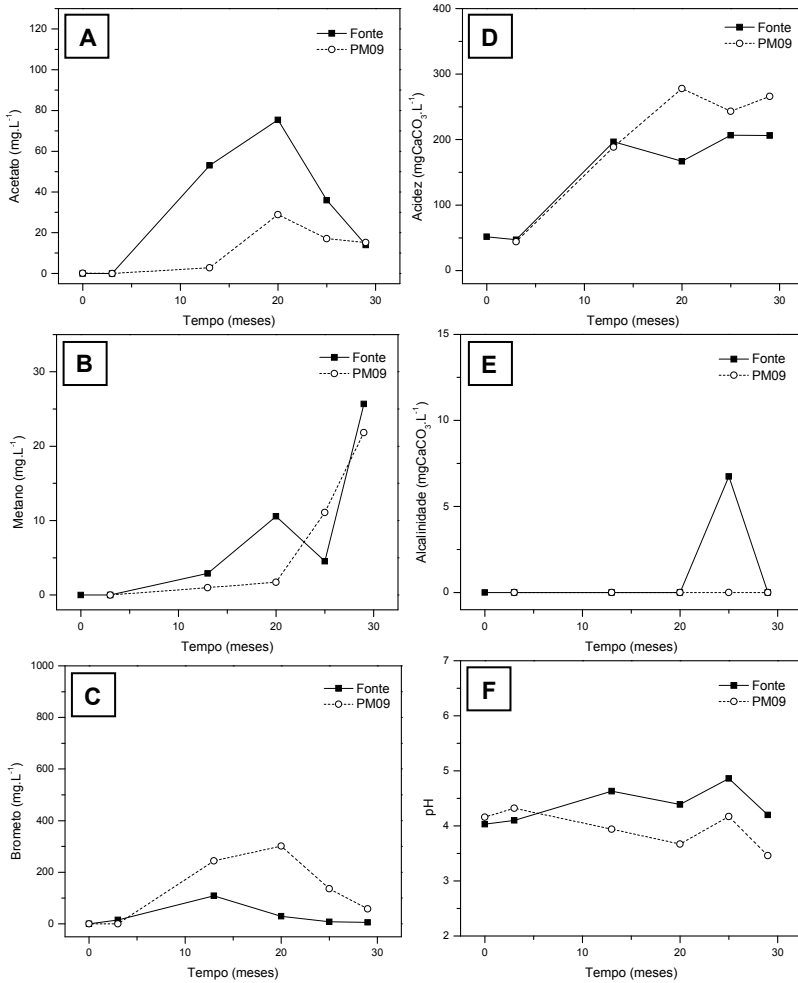


FIGURA 4.12 – Variações detectadas no experimento B100 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.

Em relação aos receptores de elétrons disponíveis, o ambiente em que houve a liberação do biodiesel puro de soja foi considerado anaeróbio, uma vez que as concentrações de oxigênio dissolvido detectadas após a liberação do biodiesel permaneceram, na maioria das vezes, menores que $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (WIEDEMEYER et al., 1999) (FIGURA 4.9 A e FIGURA 4.11 A). As condições redutoras detectadas no meio, após a adição do contaminante, também indicaram evidências da ocorrência de processos anaeróbios de biodegradação do biodiesel de soja. Somente após 1 ano da liberação dos 100 litros de B100, o potencial de oxidação-redução permaneceu negativo (FIGURA 4.9 B e FIGURA 4.11 B).

Em ambientes anaeróbios, os principais constituintes do biodiesel (os ésteres metílicos) são primeiramente hidrolisados a metanol e ácidos graxos de cadeia longa, e estes últimos são, então, convertidos a acetato e hidrogênio (e, em menor quantidade, a propionato e butirato) por bactérias sintróficas acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio (APOH) (TABELA 4.8) (SCHINK, 1997). Na presença de receptores de elétrons inorgânicos, bactérias não sintróficas, como as sulfato redutoras, podem competir com as sintróficas acetogênicas pela conversão dos substratos disponíveis, nesse caso, principalmente, os ácidos graxos de cadeia longa, durante a rota β -oxidação (COLLERAN et al., 1995; RABERS et al., 2000). Apesar desta possibilidade, a presença de bactérias não sintróficas, em comunidades degradadoras de AGCL, foi verificada predominantemente durante a conversão dos compostos secundários formados durante a degradação dos AGCL (SOUSA, 2006; SOUZA et al., 2007; SOUSA et al, 2009a; SOUSA et al, 2009b). Postgate (1984) e Singleton (1993) também concluíram que, em ecossistemas naturais, é mais provável que as bactérias sulfato redutoras estejam envolvidas com os últimos estágios de mineralização de um composto do que aos estágios iniciais de fermentação.

Da mesma forma, atribuiu-se o consumo dos receptores de elétrons inorgânicos disponíveis na área do experimento com B100, principalmente, à transformação dos subprodutos da degradação dos AGCL. Foram observados acúmulos de ferro II (de até 100 mg.L^{-1} na Fonte (FIGURA 4.9 D)) e sulfeto (de até 15 mg.L^{-1} na Fonte (FIGURA 4.11 F)) na água subterrânea, até o 20º mês de monitoramento, mesmo período em que foram detectadas as maiores concentrações de acetato (até 120 mg.L^{-1} na Fonte (FIGURA 4.10 A)), o principal subproduto da biodegradação anaeróbia do biodiesel. A produção de acetato e demais ácidos graxos voláteis aumentou a acidez do meio (FIGURA 4.10 D e FIGURA 4.12 D). Transcorridos dois anos da liberação do produto na

área, foram detectadas menores concentrações de ferro II, sulfeto e acetato, enquanto maiores concentrações de metano passaram a ser observadas (FIGURA 4.10 B e FIGURA 4.12 B). Esse seria um indício de que o esgotamento da limitada quantidade de receptores de elétrons inorgânicos na área favoreceu o predomínio da metanogênese, etapa mais significativa na remoção de subprodutos metabólicos, como o acetato, em ambientes subterrâneos (NUNES, 2006; NUNES e CORSEUIL, 2007).

A atividade metanogênica foi observada, portanto, mesmo o pH do meio de estudo tendo apresentado característica ácida durante todo o período de monitoramento. Outros estudos também observaram o desenvolvimento da metanogênese em pH mais ácido. Estudos desenvolvidos com sedimentos de lagoa mostraram que a metanogênese acetoclástica (formação de metano a partir da transformação de acetato) ocorreu a pH 5,6, embora em taxas menores do que se estivesse ocorrendo a pH neutro (PHELPS e ZEIKUS, 1984). Já em reatores anaeróbios, a atividade das metanogênicas hidrogenotróficas foi observada em pH abaixo de 5,0, embora as metanogênicas acetoclásticas tenham sido inibidas a partir desse valor (HWANG et al., 2004; (KIM et al., 2004). Nestes reatores, atividades metanogênicas originadas da utilização de hidrogênio foram encontradas em pH 4,0 (HWANG et al., 2004) e pH 4,5 (KIM et al., 2004). As arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, portanto, se mostraram mais tolerantes a condições ácidas em relação às demais metanogênicas. Outro aspecto importante a ser considerado é que as arqueas metanogênicas não tendem a crescer em suspensão em biorreatores, mas formando agregados e que a conversão de ácido acético a ácido carbônico (mais fraco) ocorre, portanto, no interior destes agregados. Com base nisso, De Beer et al. (1992) mostraram que o pH no interior dos agregados é maior do que o pH no meio líquido, uma vez que o ácido mais forte (acético) é transformado em um ácido mais fraco (carbônico).

Para exemplificar a relevância da metanogênese em relação aos demais processos de degradação no ambiente subterrâneo (com baixa disponibilidade de receptores inorgânicos), determinou-se o percentual de acetato que foi consumido em cada um dos processos redox. Para isso, foi feito o balanço estequiométrico de consumo, via diferentes rotas de oxidação-redução, do acetato produzido durante a degradação do biodiesel, utilizando-se o modelo energético de biodegradação de McCarty, que considera a produção celular (McCARTY, 1969) (TABELA 4.9). Detalhes dos cálculos podem ser visualizados no Apêndice C.

TABELA 4.8 – Reações de transformação dos principais AGCL presentes no biodiesel.

β-oxidação dos principais AGCL a acetato e hidrogênio		
$C_{18}H_{31}O_2^- + 16 H_2O \rightarrow 9 CH_3COO^- + 8 H^+ + 14 H_2$ (ácido linoleico - C_{18:2})	$\Delta G^\circ + 631,2 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.1)
$C_{18}H_{33}O_2^- + 16 H_2O \rightarrow 9 CH_3COO^- + 8 H^+ + 15 H_2$ (ácido oleico - C_{18:1})	$\Delta G^\circ + 709,8 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.2)
$C_{18}H_{35}O_2^- + 16 H_2O \rightarrow 9 CH_3COO^- + 8 H^+ + 16 H_2$ (ácido esteárico - C_{18:0})	$\Delta G^\circ + 788,4 \text{ kJ. reação}^{-1}$	(4.3)
$C_{16}H_{31}O_2^- + 14 H_2O \rightarrow 8 CH_3COO^- + 7 H^+ + 14 H_2$ (ácido palmítico - C_{16:0})	$\Delta G^\circ + 697,7 \text{ kJ. reação}^{-1}$	(4.4)

Nota: os valores de ΔG° foram calculados a partir dos dados de Thauer et al. (1977) e Lalman (2000) para pH \neq 7.

TABELA 4.9 – Reações de oxidação-redução para consumo de acetato, segundo o modelo energético de biodegradação de McCarty.

Reações de oxidação-redução para o consumo de acetato	
CH₃COO⁻ + 0,82 O₂ + 0,24 NH₄⁺ → 0,24 C₅H₇O₂N + 0,76 HCO₃⁻ + 0,06 CO₂ + 0,76 H₂O	(4.5)
(respiração aeróbia)	
CH₃COO⁻ + 0,68 NO₃⁻ + 0,23 NH₄⁺ + 0,68 H⁺ → 0,23 C₅H₇O₂N + 0,34 N₂ + 0,77 HCO₃⁻ + 0,08 CO₂ + 1,11 H₂O	(4.6)
(nitrato redução)	
CH₃COO⁻ + 3,36 Fe⁺³ + 0,23 NH₄⁺ + 0,91 H₂O → 0,23 C₅H₇O₂N + 3,36 Fe⁺² + 0,77 HCO₃⁻ + 0,07 CO₂ + 3,36 H⁺	(4.7)
(ferro redução)	
CH₃COO⁻ + 0,92 SO₄²⁻ + 0,03 NH₄⁺ + 1,38 H⁺ → 0,03 C₅H₇O₂N + 0,46 H₂S + 0,46 HS⁻ + 0,97 HCO₃⁻ + 0,87 CO₂ + 0,97 H₂O	(4.8)
(sulfato redução)	
CH₃COO⁻ + 0,03 CO₂ + 0,02 NH₄⁺ + 0,92 H₂O → 0,02 C₅H₇O₂N + 0,95 CH₄ + 0,98 HCO₃⁻	(4.9)
(metanogênese)	

Conforme as reações apresentadas na TABELA 4.9, o consumo de 1 mol de oxigênio está relacionado à conversão de 1,22 moles de acetato, enquanto o consumo de 1 mol de nitrato está relacionado à conversão de 1,47 moles de acetato. Quanto aos produtos acumulados, a produção de 1 mol de ferro II está relacionada ao consumo de 0,3 mol de acetato, a produção de 1 mol de sulfeto ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$) está relacionada ao consumo de 1,09 moles de acetato e a produção de 1 mol de metano, ao consumo de 1,05 moles de acetato (TABELA 4.10).

TABELA 4.10 – Relações estequiométricas para o consumo de acetato.

Reação	Relação
Respiração aeróbia	1 : 1,22 ($\text{O}_2:\text{CH}_3\text{COO}^-$)
Nitrato redução	1 : 1,47 ($\text{NO}_3^-:\text{CH}_3\text{COO}^-$)
Ferro redução	1 : 0,30 ($\text{Fe}^{+2}:\text{CH}_3\text{COO}^-$)
Sulfato redução	1 : 1,09 ($\text{S}^-:\text{CH}_3\text{COO}^-$)
Metanogênese	1 : 1,05 ($\text{CH}_4:\text{CH}_3\text{COO}^-$)

Com base nestas relações estequiométricas, foi possível determinar as concentrações de acetato necessárias à transformação das concentrações detectadas no meio de receptores de elétrons inorgânicos (oxigênio e nitrato) e de produtos formados (ferro II, sulfeto e metano). Para isso, as concentrações mássicas (mg.L^{-1}) detectadas de cada receptor de elétrons e dos produtos foram transformadas em concentrações molares (mol.L^{-1}), através da divisão pelas respectivas massas molares, e depois transformadas em concentrações molares de *acetato consumido*, através da multiplicação da concentração molar de cada receptor ou produto pelo número de moles de acetato consumido equivalente (TABELA 4.10). De posse destes valores e da quantidade total de acetato consumido em cada período monitorado, foi possível atribuir a cada processo redox uma porcentagem de participação na biodegradação do acetato (FIGURA 4.13, FIGURA 4.15, FIGURA 4.17 e FIGURA 4.19) (detalhes dos cálculos podem ser visualizados no Apêndice D). As quantidades consumidas de acetato que correspondem a cada um destas porcentagens foram expressas em termos de concentração (mg.L^{-1}) e podem ser visualizadas nas FIGURA 4.14, FIGURA 4.16, FIGURA 4.18 e FIGURA 4.20. Embora o predomínio da metanogênese na biodegradação do acetato tenha ocorrido somente dois

anos após a liberação do biodiesel puro de soja na área, esse foi o processo mais significativo na remoção do acetato.

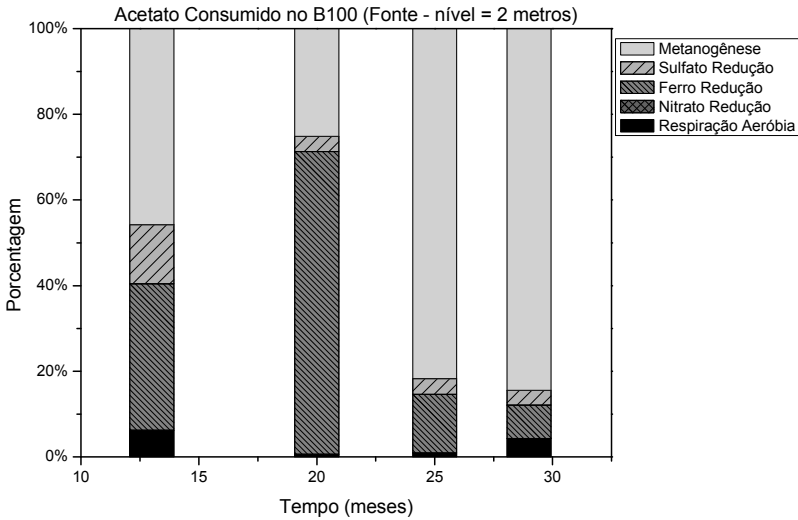


FIGURA 4.13 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 2 metros de profundidade.

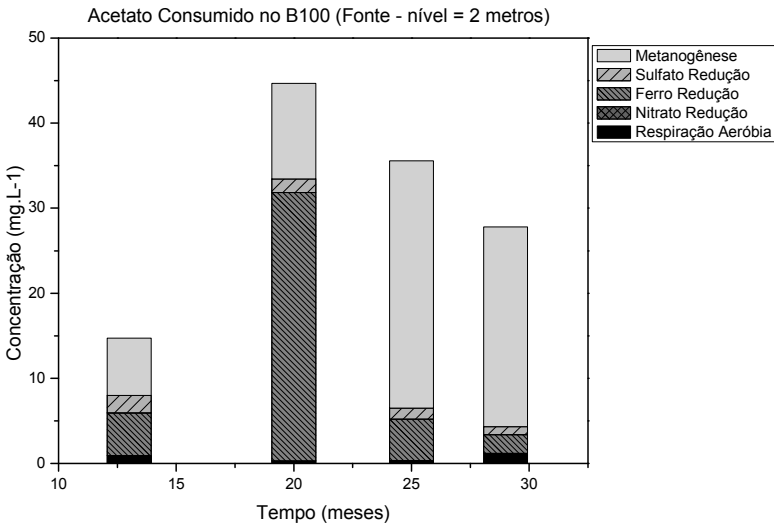


FIGURA 4.14 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 2 metros de profundidade.

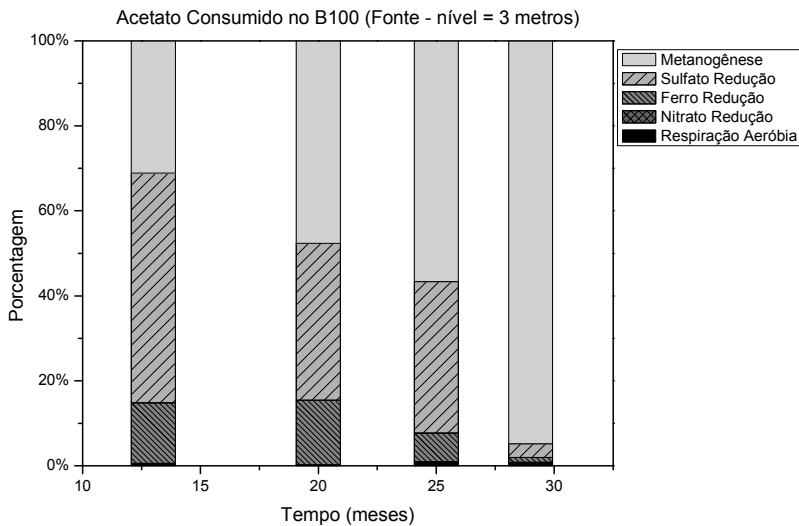


FIGURA 4.15 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 3 metros de profundidade.

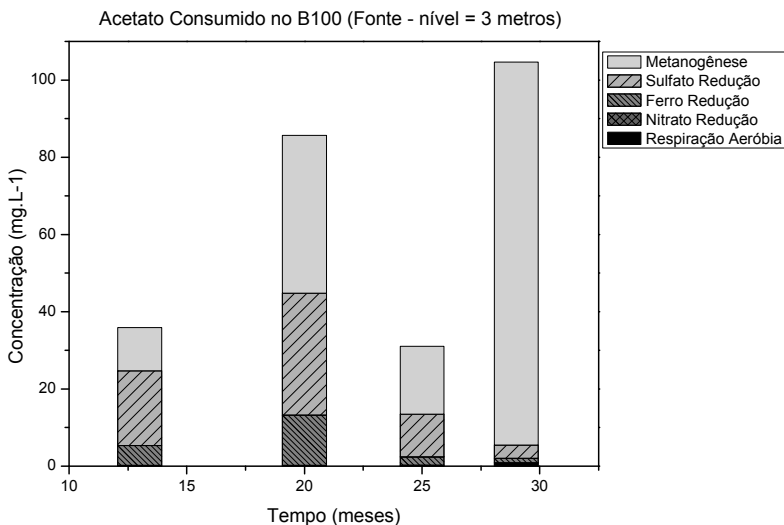


FIGURA 4.16 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B100, a 3 metros de profundidade.

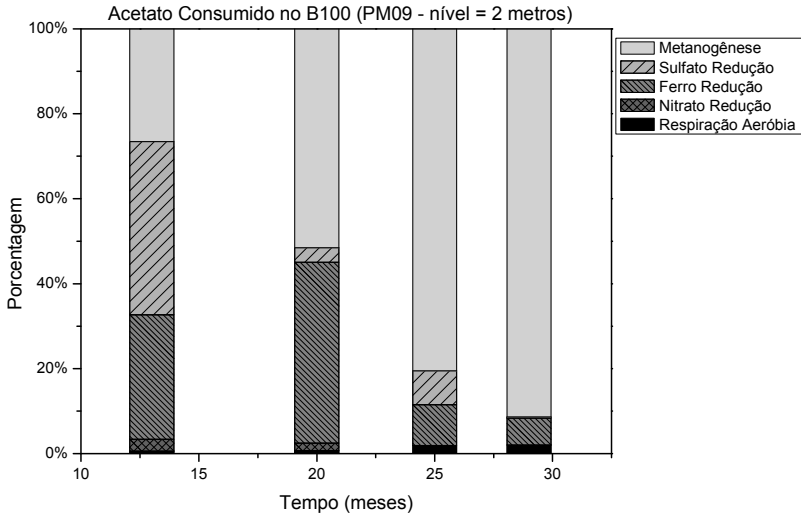


FIGURA 4.17 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 2 metros de profundidade.

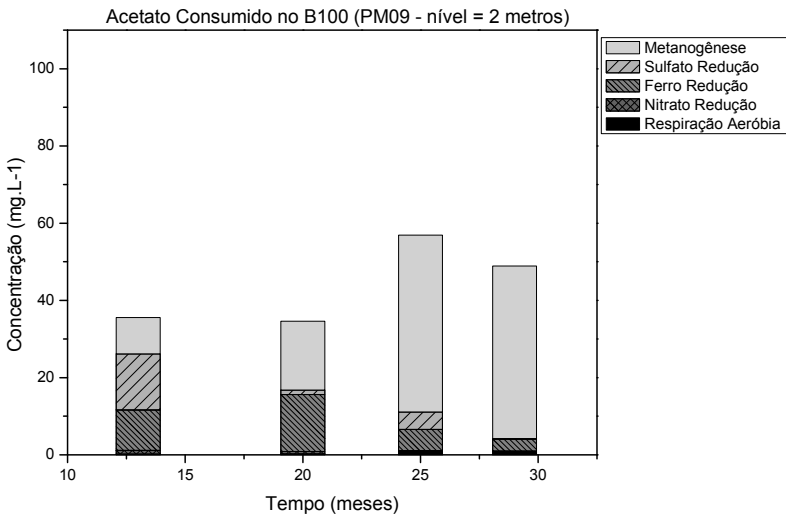


FIGURA 4.18 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 2 metros de profundidade.

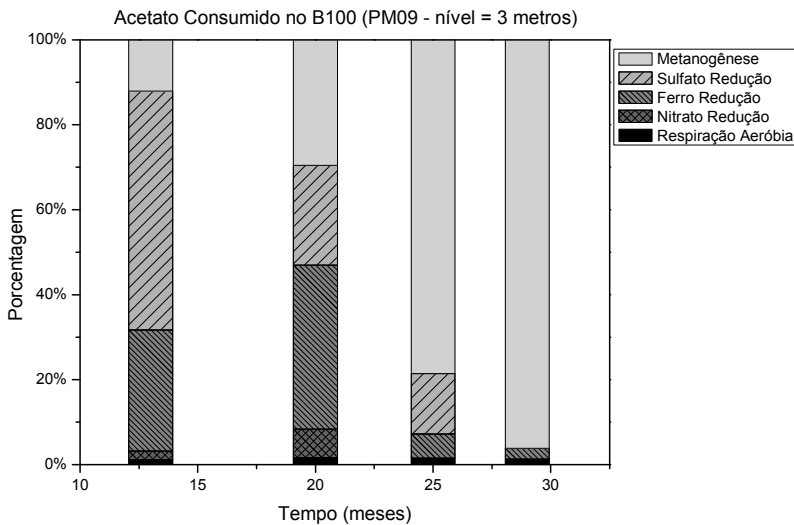


FIGURA 4.19 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 3 metros de profundidade.

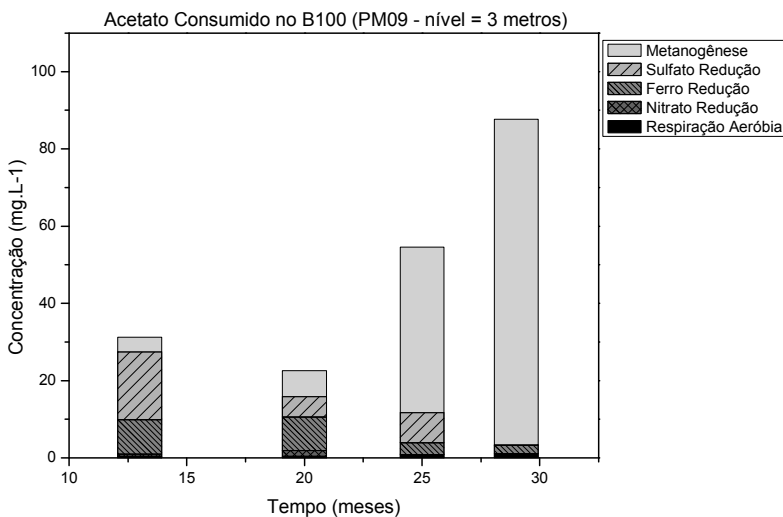


FIGURA 4.20 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B100, a 3 metros de profundidade.

Enquanto houve disponibilidade de receptores de elétrons inorgânicos no ambiente subterrâneo, eles foram utilizados, principalmente, na transformação dos subprodutos da degradação do biodiesel. No entanto, nas concentrações em que estes receptores se encontravam presentes no meio, não foram suficientes para remover a quantidade de matéria orgânica existente e por isso, mesmo durante a ocorrência destes processos de oxidação-redução, uma quantidade expressiva de subprodutos, como o acetato (120 mg.L^{-1} , FIGURA 4.10 A), ainda permaneceu na área. Outros subprodutos, como propionato e butirato, também foram detectados no experimento com B100, embora em concentrações muito menores quando comparadas às concentrações detectadas de acetato (FIGURA 4.21). A partir do momento em que houve o esgotamento dos receptores inorgânicos e a metanogênese passou a ser a etapa principal na transformação dos subprodutos, a quantidade de subprodutos remanescentes decaiu consideravelmente. O acetato, por exemplo, chegou a concentrações inferiores a 4 mg.L^{-1} na Fonte (FIGURA 4.10 A), durante o predomínio da metanogênese.

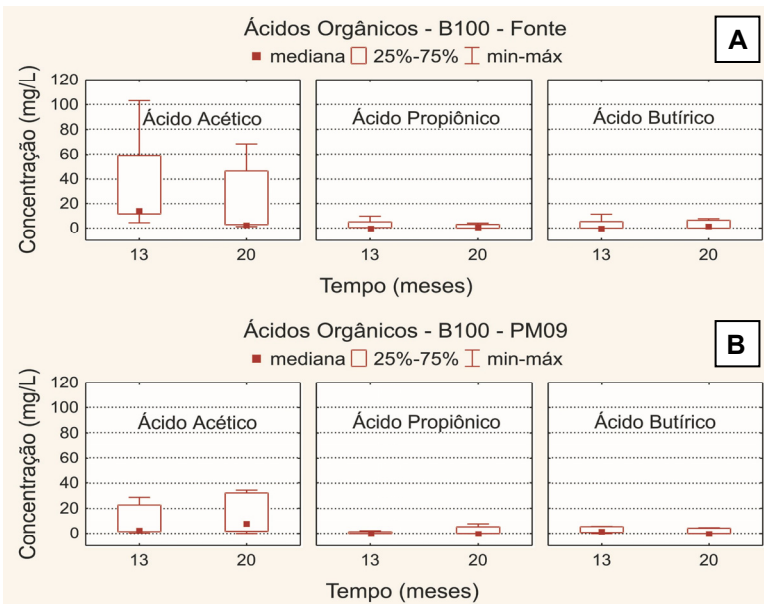


FIGURA 4.21 – Ácidos graxos voláteis detectados no experimento com B100: A) na Fonte; B) no PM09.

Nota: Os gráficos representam a distribuição de todas as concentrações detectadas nas diferentes profundidades de monitoramento.

Resultados obtidos através de análises de água subterrânea com técnicas de biologia molecular reforçaram os resultados das análises físico-químicas a partir de evidências dos processos microbiológicos atuantes e indicaram um aumento de bactérias totais estimulado pela presença do biodiesel (nas amostras controle foram detectadas 103 cópias de gene de bactérias totais.g solo-1 e nas amostras de água subterrânea após a liberação do B100 foram detectadas 108 cópias de gene de bactérias totais.g de sólidos suspensos totais -1). Aos 20 meses, foram detectadas na Fonte do experimento com B100, nível 2 metros, maior quantidade de cópias de bactérias totais ($2,35 \times 10^8$ cópias de gene.g de SST-1) do que arqueas (inclusive metanogênicas) ($9,33 \times 10^7$ cópias de gene.g de SST-1). Das bactérias específicas analisadas, as ferro (III)-redutoras (*Geobacter* sp.) foram encontradas em maior quantidade ($8,85 \times 10^4$ cópias de gene.g de SST-1). De fato, neste mesmo período (e local), foram observados um maior consumo de acetato devido à redução do ferro (III) (FIGURA 4.14) e o maior pico de produção de ferro (II) (FIGURA 4.9 D). Já aos 25 meses, foram detectadas na Fonte do B100, nível 3 metros, maior concentração de arqueas ($1,92 \times 10^8$ cópias de gene.g de SST⁻¹) do que de bactérias totais ($6,89 \times 10^7$ cópias de gene.g de SST⁻¹), ressaltando o possível predomínio da metanogênese no ambiente a partir desse período. Das bactérias detectadas, nenhuma comunidade específica (bactérias redutoras de nitrito, de ferro, de sulfato) pôde ser identificada, pois as quantidades detectadas estavam abaixo do limite de detecção ($1,0 \times 10^3$ cópias de gene.g de SST-1). Ainda neste período (25 meses), também foram detectadas mais cópias de arqueas ($1,06 \times 10^8$ cópias de gene.g de SST⁻¹) do que bactérias totais ($3,95 \times 10^7$ cópias de gene.g de SST⁻¹) no poço PM09, nível 2 metros, do experimento com B100. Das bactérias totais, foram identificadas tanto bactérias ferro redutoras (*Geobacter* sp), quanto sulfato redutoras (*Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfovibrio desulfuricans*), numa proporção de praticamente 50% cada ($1,23 \times 10^4$ cópias de gene.g de SST⁻¹ de ferro redutoras e $2,54 \times 10^4$ cópias de gene.g de SST⁻¹ de sulfato redutoras).

Embora o biodiesel tenha estimulado o desenvolvimento da microbiota nativa (comprovado pelo aumento da quantidade de bactérias totais no meio), a adição de 100 litros deste biocombustível na água subterrânea, retardou em dois anos o predomínio da metanogênese como principal processo atuante na remoção dos subprodutos metabólicos do biodiesel na água subterrânea.

4.2.2. Experimento com 100 litros da mistura diesel/biodiesel (B20)

Assim como para o experimento com biodiesel puro, a ocorrência de processos naturais de atenuação da mistura diesel/biodiesel (B20) na água subterrânea foi avaliada através do consumo dos receptores de elétrons disponíveis, da formação de subprodutos metabólicos e da variação de indicadores físico-químicos. Para esse experimento, as maiores variações também ocorreram nos poços Fonte e PM09, e nos dois primeiros níveis de monitoramento, 2 e 3 metros de profundidade, os mais próximos à profundidade em que os 100 litros da mistura B20 foram liberados na área experimental (1,5 metro). As variações detectadas em cada uma dessas duas profundidades são mostradas nas figuras a seguir (FIGURA 4.22 a FIGURA 4.27). O perfil de variações por nível de monitoramento está disponível no Apêndice B.

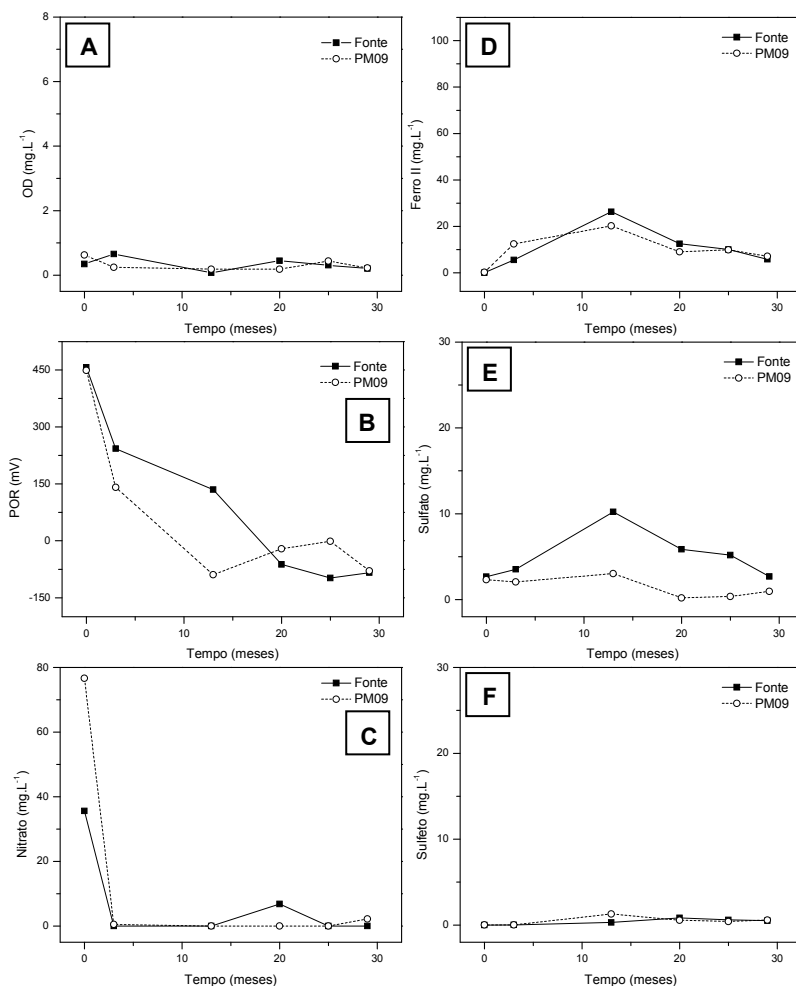


FIGURA 4.22 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.

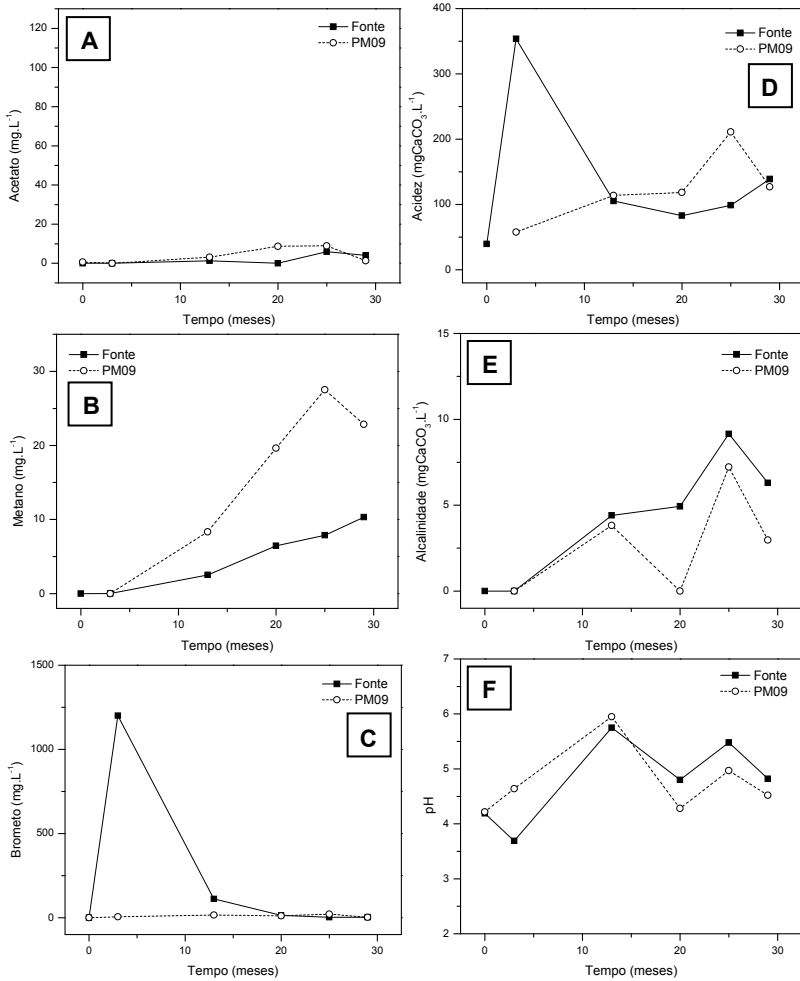


FIGURA 4.23 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.

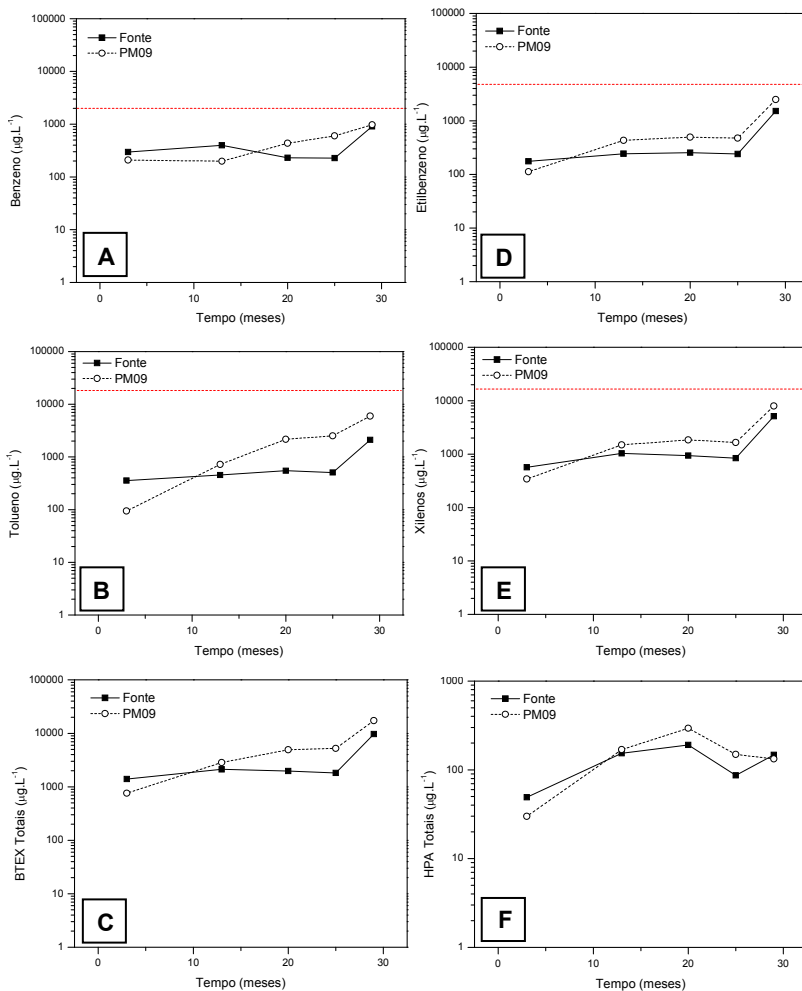


FIGURA 4.24 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 2 metros: A) Benzeno; B) Tolueno; C) BTEX totais; D) Etilbenzeno; E) Xilenos totais; F) HPA totais.

Nota: a linha tracejada em vermelho representa o valor da solubilidade efetiva do composto, conforme TABELA 2.4.

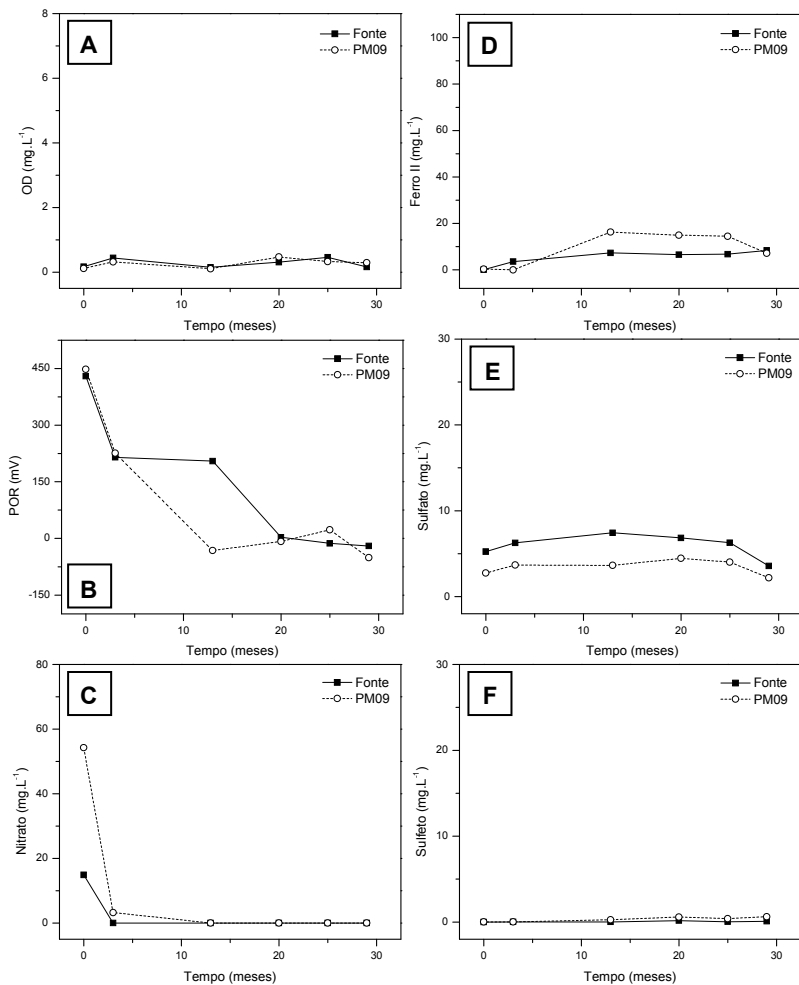


FIGURA 4.25 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Oxigênio dissolvido; B) Potencial de oxi-redução; C) Nitrato; D) Ferro II; E) Sulfato; F) Sulfeto.

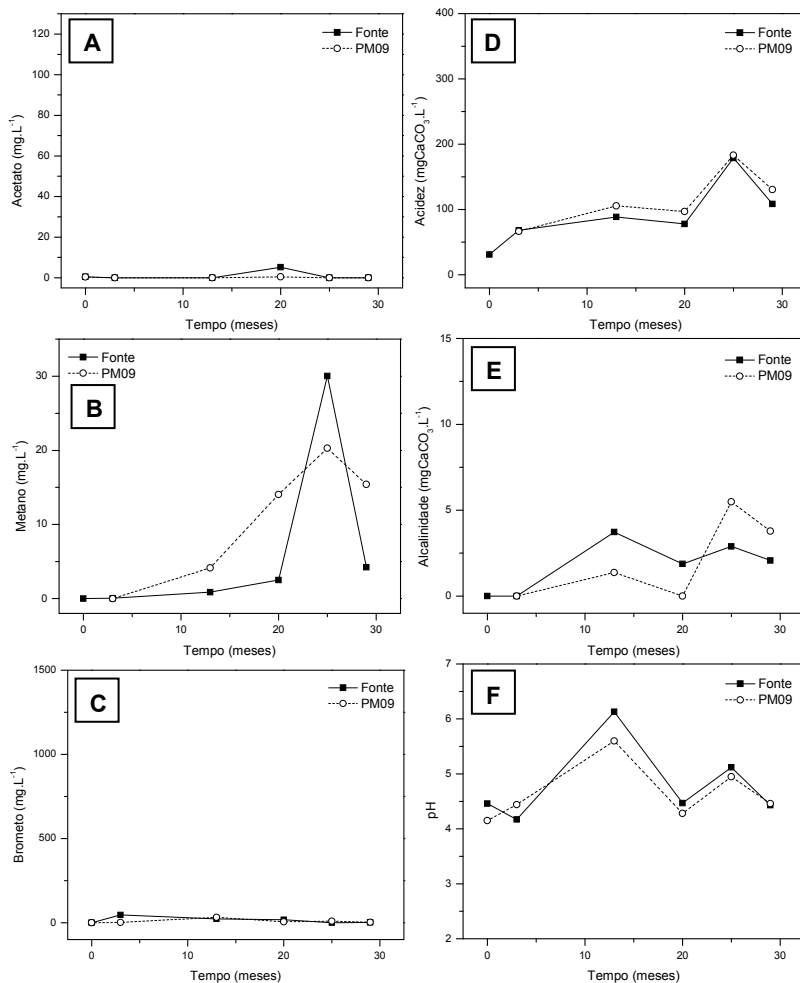


FIGURA 4.26 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Acetato; B) Metano; C) Brometo; D) Acidez; E) Alcalinidade; F) pH.

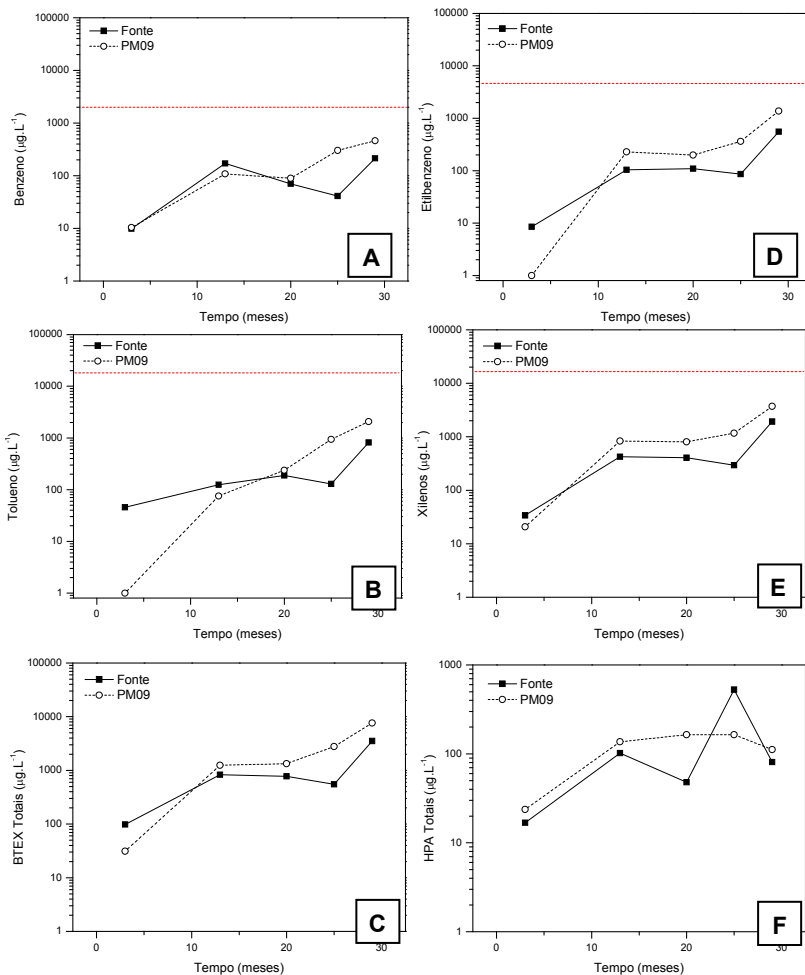


FIGURA 4.27 – Variações detectadas no experimento B20 ao longo do tempo, nos poços Fonte e PM09, no nível 3 metros: A) Benzeno; B) Tolueno; C) BTEX totais; D) Etilbenzeno; E) Xilenos totais; F) HPA totais.

Nota: a linha tracejada em vermelho representa o valor da solubilidade efetiva do composto, conforme TABELA 2.4.

O ambiente em que foram liberados os 100 litros de B20 foi considerado anaeróbio, pois as concentrações de oxigênio dissolvido detectadas permaneceram, na maioria das vezes, menores que $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (WIEDEMEYER et al., 1999) (FIGURA 4.22 A e FIGURA 4.25 A). Além disso, condições redutoras foram detectadas após a liberação da mistura no meio. Condições redox negativas predominaram no PM09 após 1 ano da liberação; e na Fonte, essas condições foram observadas somente após 20 meses (FIGURA 4.22 B e FIGURA 4.25 B).

Sob condições anaeróbias, os receptores de elétrons inorgânicos disponíveis no meio foram utilizados para a transformação da mistura diesel/biodiesel. Observou-se o decaimento, nos três primeiros meses, das concentrações aquosas de nitrato detectadas no meio antes da liberação da mistura (FIGURA 4.22 C e FIGURA 4.25 C) e o acúmulo de espécies reduzidas, principalmente ferro II, durante o primeiro ano após a liberação (FIGURA 4.22 D e FIGURA 4.25 D). Como a concentração aquosa dos compostos constituintes do diesel fóssil foi crescente durante todo o período do monitoramento (FIGURA 4.24 e FIGURA 4.27), provavelmente o consumo dos receptores inorgânicos esteve mais associado à transformação do biodiesel. E, desta forma, assim como para o B100, atribuiu-se o consumo dos receptores de elétrons inorgânicos disponíveis no meio, principalmente, à transformação do acetato e do hidrogênio produzidos durante a biodegradação dos AGCL (estes últimos, produtos da hidrólise do biodiesel).

Apesar de as razões estequiométricas para transformação do biodiesel e de seus subprodutos metabólicos serem as mesmas para ambos os experimentos (TABELA 4.8, TABELA 4.9 e TABELA 4.10), o volume de biodiesel puro de soja liberado no experimento com B20 foi 5 vezes menor em relação ao experimento com B100 (dos 100 litros da mistura, somente 20 litros eram biodiesel puro de soja; os 80 litros restantes eram diesel derivado de petróleo) e, portanto, as concentrações detectadas no meio, tanto de subprodutos metabólicos quanto de espécies reduzidas, também foram menores. Concentrações de ferro II chegaram a valores próximos a 25 mg.L^{-1} no poço Fonte, na profundidade 2 metros, após um ano do início do experimento (FIGURA 4.22 D). Já a máxima concentração de sulfeto detectada foi de $1,30 \text{ mg.L}^{-1}$ no nível 2 metros do PM09, para o mesmo período (FIGURA 4.22 F). As concentrações de acetato permaneceram baixas durante todo o período de monitoramento, com máximas de 9 mg.L^{-1} aos 20 e 25 meses (FIGURA 4.23 A e FIGURA 4.26 A). Além do acetato, não foram detectados outros ácidos graxos voláteis, como o

propionato e o butirato (FIGURA 4.28). A produção de espécies ácidas aumentou a acidez no meio (FIGURA 4.23 D e FIGURA 4.26 D), no entanto, em concentrações menores às detectadas para o experimento com B100.

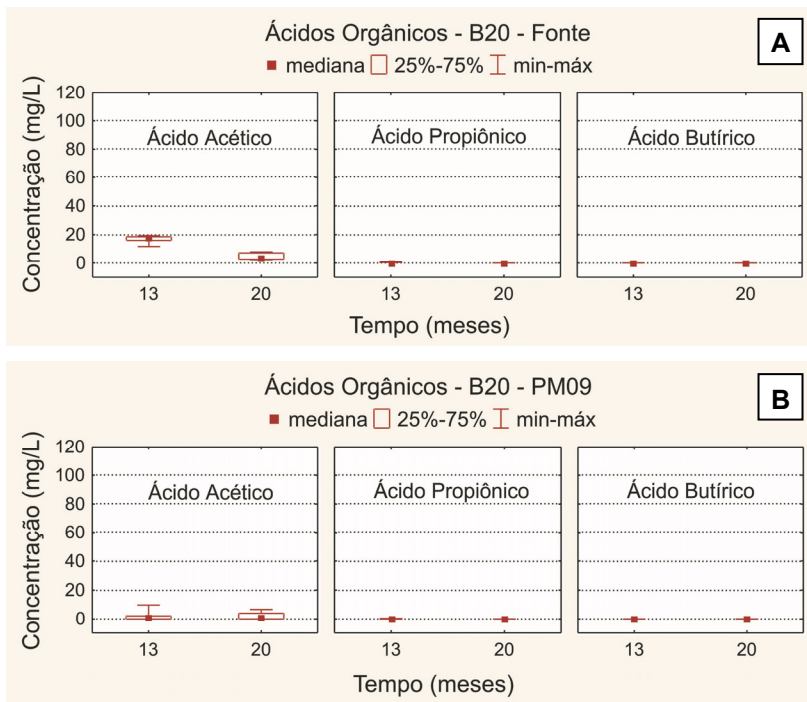


FIGURA 4.28 – Ácidos graxos voláteis no experimento com B20: A) na Fonte; B) no PM09.

Nota: Não houve formação de propionato e butirato. Os gráficos representam a distribuição de todas as concentrações detectadas nas diferentes profundidades de monitoramento.

Somente a partir do primeiro ano da liberação dos 100 litros de B20 na área experimental, a metanogênese passou a predominar no meio. Aos 13 meses, concentrações de metano próximas a 10 mg.L^{-1} foram detectadas no PM09, nível 2 metros (FIGURA 4.23 B). Aos 20 meses, nesse mesmo poço, as concentrações de metano se encontravam muito próximas ao valor de saturação em água (22 mg.L^{-1}) (TOXNET, 2008), ultrapassando esse valor após dois anos. As altas concentrações de metano detectadas após um ano da liberação da mistura estiveram relacionadas, principalmente, à conversão do acetato, uma vez que as concentrações deste composto se mantiveram baixas no ambiente. Além disso, as altas concentrações dos compostos aromáticos do diesel detectadas na água subterrânea reforçaram a ideia de que, na mistura, o biodiesel foi o combustível preferencialmente degradado (assim como em CORSEUIL et al., 2011b) e, portanto, as concentrações de metano detectadas estiveram mais associadas à transformação do biodiesel.

A fim de se verificar a relevância da metanogênese no consumo de acetato, foi determinado, assim como para o experimento com B100, o percentual de acetato que foi consumido via cada um dos processos redox descritos na TABELA 4.9. O consumo de acetato via nitrato redução pode ter sido subestimado, uma vez que o acúmulo de nitrito (a espécie reduzida intermediária nesse processo) não foi observado, provavelmente devido à instabilidade reativa deste composto. A metanogênese passou a ser o principal processo de transformação após 1 ano da liberação da mistura no ambiente e os maiores consumos de acetato foram observados no PM09.

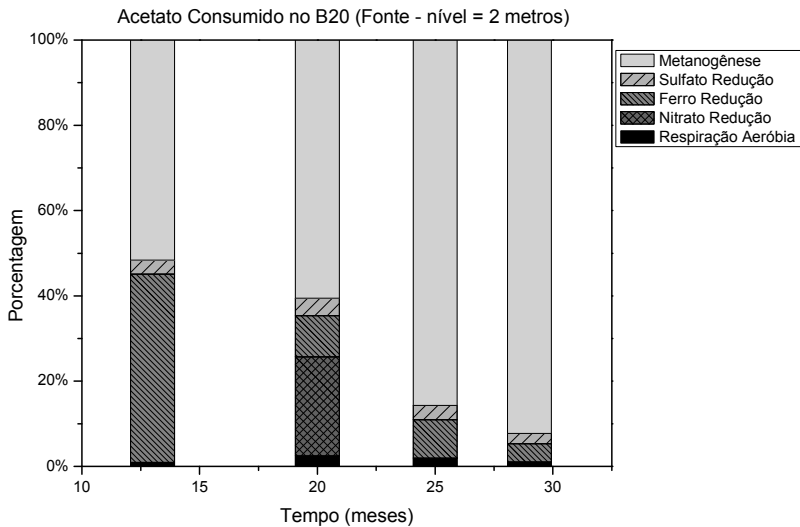


FIGURA 4.29 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 2 metros de profundidade.

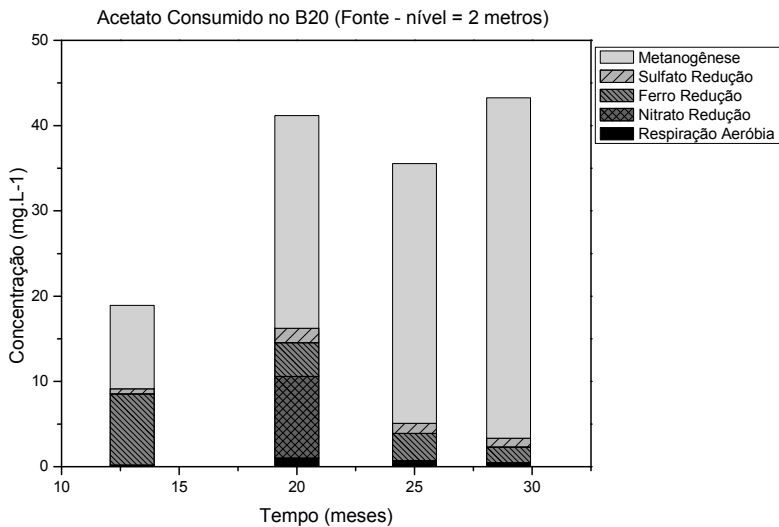


FIGURA 4.30 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 2 metros de profundidade.

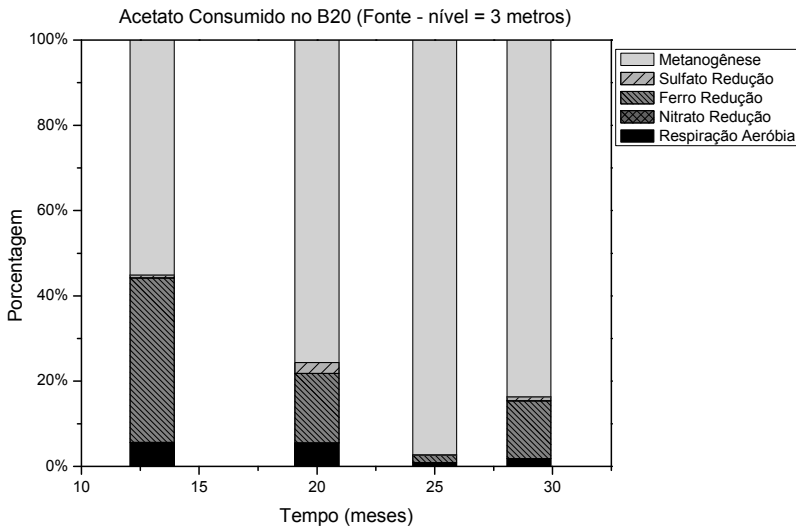


FIGURA 4.31 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 3 metros de profundidade.

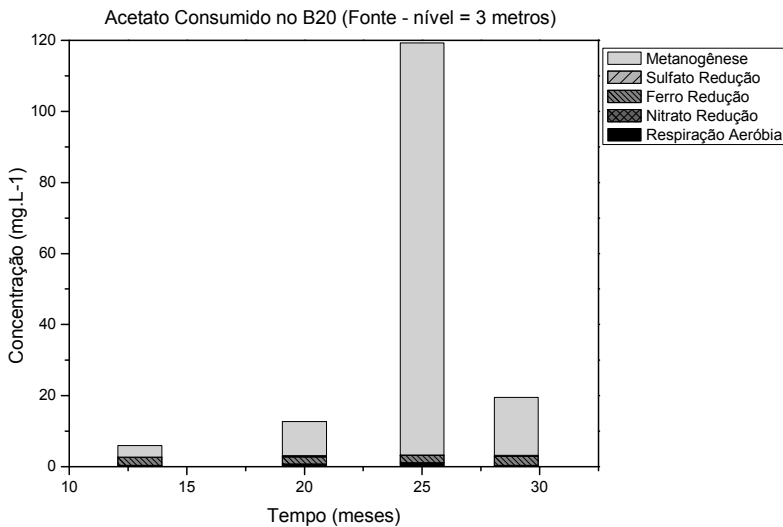


FIGURA 4.32 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes na Fonte do B20, a 3 metros de profundidade.

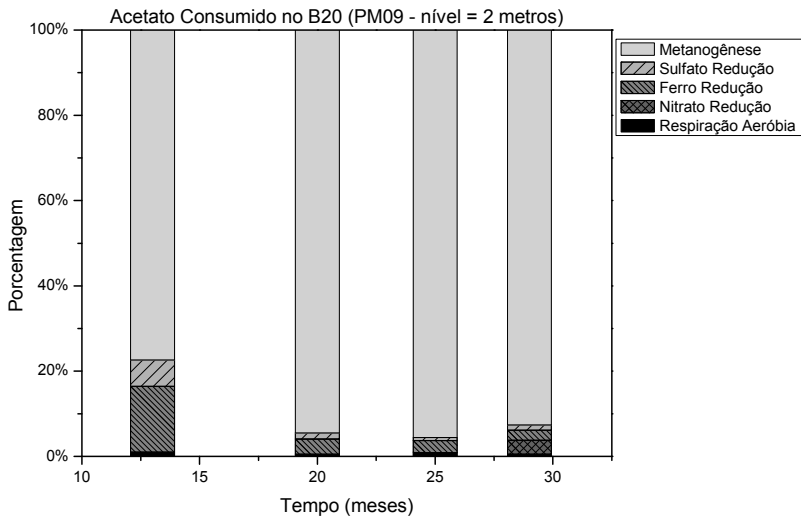


FIGURA 4.33 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 2 metros de profundidade.

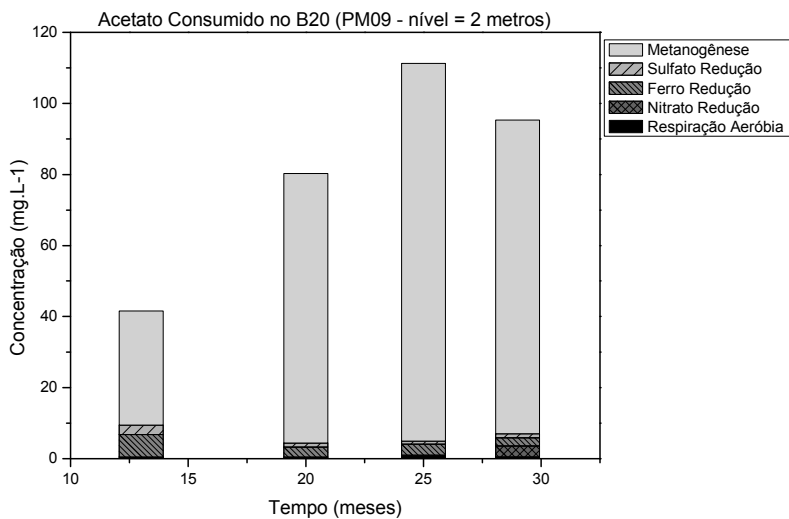


FIGURA 4.34 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 2 metros de profundidade.

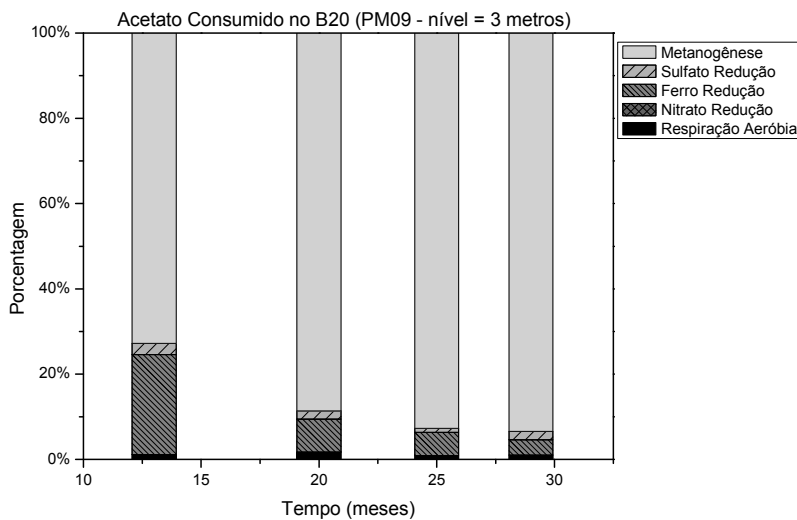


FIGURA 4.35 – Distribuição percentual de acetato consumido entre os diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 3 metros de profundidade.

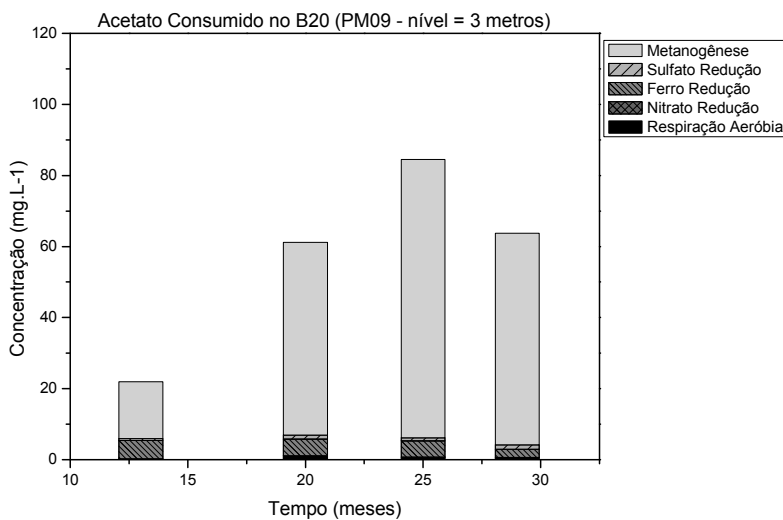


FIGURA 4.36 – Quantidade de acetato consumido em cada um dos diferentes processos de biodegradação atuantes no PM09 do B20, a 3 metros de profundidade.

Análises de água subterrânea com técnicas de biologia molecular indicaram um aumento de biomassa, provavelmente estimulada pela fração de biodiesel na mistura (controle $\approx 10^3$ cópias de gene de bactérias totais.g solo⁻¹ e nas amostras de água subterrânea após a liberação do B20 foram detectadas $\approx 10^8$ cópias de gene de bactérias totais.g SST⁻¹) e reforçaram os resultados das análises físico-químicas. Aos 17 meses, a quantidade de arqueas (inclusive metanogênicas) já era muito próxima ao de bactérias totais. Foram detectadas no PM09 do experimento com B20, nível 3 metros, $5,78 \times 10^7$ cópias de gene de arqueas.g de sólidos suspensos⁻¹ e $9,93 \times 10^7$ cópias de gene de bactérias totais.g de SST⁻¹, sendo a grande a maioria destas bactérias ($1,72 \times 10^6$ cópias de gene.g de SST⁻¹), ferro redutoras (*Geobacter sp*). A partir dos 20 meses, verificou-se que a quantidade de bactérias totais começou a decair. Para esse período foram detectadas na Fonte do B20, nível 3 metros $4,53 \times 10^7$ cópias de gene de bactérias totais.g de SST⁻¹. Destas, nenhuma bactéria específica pode ser identificada, pois as quantidades detectadas estavam abaixo do limite de detecção ($1,0 \times 10^3$ cópias de gene.g de SST⁻¹). Aos 23 meses, foram quantificadas na Fonte do experimento com B20, nível 2 metros, $3,02 \times 10^5$ cópias de gene de bactérias totais.g de SST⁻¹, sem específicas (abaixo do limite de detecção - $1,0 \times 10^3$ cópias de gene.g de SST⁻¹). No poço PM09, $3,83 \times 10^5$ cópias de gene de bactérias totais.g de SST⁻¹ (sem específicas – abaixo do limite de detecção - $1,0 \times 10^3$ cópias de gene.g de SST⁻¹) foram quantificadas no nível 2 metros e $2,74 \times 10^5$ cópias de gene de bactérias totais.g de SST⁻¹ foram identificadas no nível 3 metros (sem específicas – abaixo do limite de detecção - $1,0 \times 10^3$ cópias de gene.g de SST⁻¹).

Embora a adição de um volume menor (20 litros) de biodiesel no ambiente tenha antecipado em um ano (em relação ao experimento com 100 litros) o tempo para que a metanogênese pudesse se estabelecer como processo de transformação predominante no meio, a baixa solubilidade do biodiesel e sua consequente lenta biodegradação tornaram esta etapa ainda mais duradoura, o que retardou o início da degradação dos compostos aromáticos presentes no diesel. Após 29 meses da liberação da mistura na água subterrânea, as concentrações dos compostos aromáticos do diesel na água subterrânea ainda era crescente no meio.

4.2.3. Implicações biogeoquímicas das diferentes cargas orgânicas liberadas de biodiesel

No ambiente subterrâneo de estudo, condições anaeróbias foram predominantes durante a biodegradação do biodiesel puro de soja (B100) e da mistura desse biocombustível com diesel (B20). No experimento em que houve a liberação de 100 litros de B20 (20 litros de biodiesel de soja e 80 litros de diesel), condições metanogênicas foram predominantes após um ano da liberação da mistura, e para o experimento com 100 litros de B100 (100 litros de biodiesel de soja), condições metanogênicas passaram a predominar somente após dois anos.

Em ambientes metanogênicos, nos quais os receptores de elétrons disponíveis são prótons e dióxido de carbono, as relações sintróficas entre os micro-organismos são particularmente importantes para a eficiente biodegradação dos compostos orgânicos. Nestes ambientes, as reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação ocorrem em etapas sequenciais, com os produtos de um estágio atuando como substrato para o próximo. Nos casos em que a energia livre padrão de uma das reações envolvidas for positiva ($\Delta G^\circ > 0$), os processos metabólicos só serão termodinamicamente favoráveis nas condições ambientais ($\Delta G < 0$) se os produtos desta reação forem mantidos em baixas concentrações, conforme a Equação da Energia Livre (Equação 4.10). Para isso, a transferência de produtos intermediários entre os micro-organismos que atuam nos diferentes estágios será fundamental.

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{Produtos}]^a}{[\text{Reagentes}]^b} \quad (4.10)$$

em que:

- ΔG = variação da energia livre em condições variáveis [$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$];
- ΔG° = variação da energia livre em condições padrões (concentração 1 M, temperatura 25°C e pressão 1 atm) [$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$];
- R = constante universal dos gases [$R = 0,008314 \text{ kJ} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$];
- T = temperatura na água subterrânea [K];
- [Produtos] = concentração dos produtos na água subterrânea [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$];
- [Reagentes] = concentração dos reagentes na água subterrânea [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$];
- a e b = coeficientes estequiométricos das equações balanceadas.

Considerando que as reações envolvidas na biodegradação dos compostos do biodiesel geram acetato e hidrogênio e que, estas reações são endergônicas ($\Delta G^\circ > 0$) sob condições padrão (TABELA 4.11, Reações 4.11 e 4.15), a biodegradação destes combustíveis só ocorrerá nas condições do ambiente ($\Delta G < 0$) se as concentrações de acetato e hidrogênio permanecerem baixas no meio. Para isso, o acetato e o hidrogênio terão de ser consumidos nos estágios seguintes envolvidos no processo global de biodegradação. As opções termodinâmicas mais prováveis para o consumo destes produtos no meio, em condições metanogênicas, estão listadas na TABELA 4.11 e são exemplificadas pelo composto hidrolisado mais abundante proveniente do biodiesel, o ácido linoleico (C18:2). Conforme estas opções, a conversão do acetato poderá ocorrer por bactérias acetogênicas sintróficas produtoras obrigatórias de hidrogênio (APOH) (Reação 4.12) ou pelas arqueas através da metanogênese acetoclástica (Reação 4.16). Embora esta última opção seja termodinamicamente mais favorável nas condições padrões, ela foi considerada uma etapa limitante no processo de biodegradação do biodiesel devido ao efeito tóxico/inibitório dos AGCL sobre os micro-organismos anaeróbios, especialmente arqueas acetoclásticas (HANAKI et al., 1981; KOSTER e CRAMER, 1987; ANGELIDAKI e AHRING, 1992; RINZEMA et al., 1994; LALMAN, 2000; LALMAN e BAGLEY, 2000; LALMAN e BAGLEY, 2001; LALMAN e BAGLEY, 2002). No caso da degradação sintrófica do acetato, como também se trata de uma reação endergônica com produção de hidrogênio, esta reação também dependerá da remoção de hidrogênio do meio líquido. A remoção de hidrogênio será feita por arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, com a redução do dióxido de carbono a metano (Reações 4.13 e 4.17).

TABELA 4.11 – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do ácido linoleico (biodiesel). Possíveis rotas A e B.

A) Oxidação a acetato e hidrogênio, associada à oxidação sintrófica do acetato e à redução do CO₂			
ácido linoleico - C_{18:2}:			
$C_{18}H_{31}O_2 + H^+ + 16 H_2O$	$\rightarrow 9 CH_3COO^- + 9 H^+ + 14 H_2$	$\Delta G^\circ +631,16 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.11)
$9 CH_3COO^- + 9 H^+ + 18 H_2O$	$\rightarrow 36 H_2 + 18 CO_2$	$\Delta G^\circ +495,43 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.12)
$50 H_2 + 12,5 CO_2$	$\rightarrow 12,5 CH_4 + 25 H_2O$	$\Delta G^\circ -1634,34 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.13)
soma:	$C_{18}H_{31}O_2 + H^+ + 9 H_2O$	$\Delta G^\circ - 507,75 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.14)
B) Oxidação a acetato e hidrogênio, associada à metanogênese acetoclástica e à redução do CO₂			
ácido linoleico - C_{18:2}:			
$C_{18}H_{31}O_2 + H^+ + 16 H_2O$	$\rightarrow 9 CH_3COO^- + 9 H^+ + 14 H_2$	$\Delta G^\circ +631,16 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.15)
$9 CH_3COO^- + 9 H^+$	$\rightarrow 9 CH_4 + 9 CO_2$	$\Delta G^\circ - 681,29 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.16)
$14 H_2 + 3,5 CO_2$	$\rightarrow 3,5 CH_4 + 7 H_2O$	$\Delta G^\circ - 457,61 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.17)
soma:	$C_{18}H_{31}O_2 + H^+ + 9 H_2O$	$\Delta G^\circ - 507,75 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.18)

Nota: os valores de ΔG° foram calculados a partir dos dados de Thauer et al. (1977) e Lalman (2000) para pH \neq 7.

O acúmulo de acetato e/ou hidrogênio na fase dissolvida pode, portanto, desencadear limitações termodinâmicas que afetam a continuidade do processo de biodegradação dos compostos orgânicos. Nos experimentos de campo, a ocorrência ou não do acúmulo de produtos no meio esteve relacionada às diferentes cargas orgânicas de biodiesel liberadas no meio. Para o experimento com 100 litros de biodiesel puro (B100), altas concentrações de acetato foram detectadas na fase dissolvida, tanto na região da fonte de contaminação quanto a 2 metros de distância da mesma (PM09) (FIGURA 4.37). Ao contrário, para o experimento em que houve a liberação de 20 litros de biodiesel puro (mistura B20), baixas concentrações de acetato remanescente no meio líquido foram detectadas (FIGURA 4.37). Como o volume da matéria mais facilmente biodegradável (biodiesel) foi menor no experimento com a mistura de combustíveis (B20), a produção de acetato também foi menor e, portanto, nas concentrações em que se encontrava no meio, grande parte do acetato do B20 pôde ser rapidamente consumida, implicando em menos produto acumulado (remanescente) na fase dissolvida. Desta forma, as menores concentrações de acetato acumuladas no experimento com B20 permitiram a continuidade do processo de biodegradação, tornando exergônicas, nas condições ambiente, as reações endergônicas nas condições padrão. As altas concentrações de metano, um dos produtos finais da transformação do acetato, detectadas no experimento com B20, reforçaram essa teoria (FIGURA 4.38).

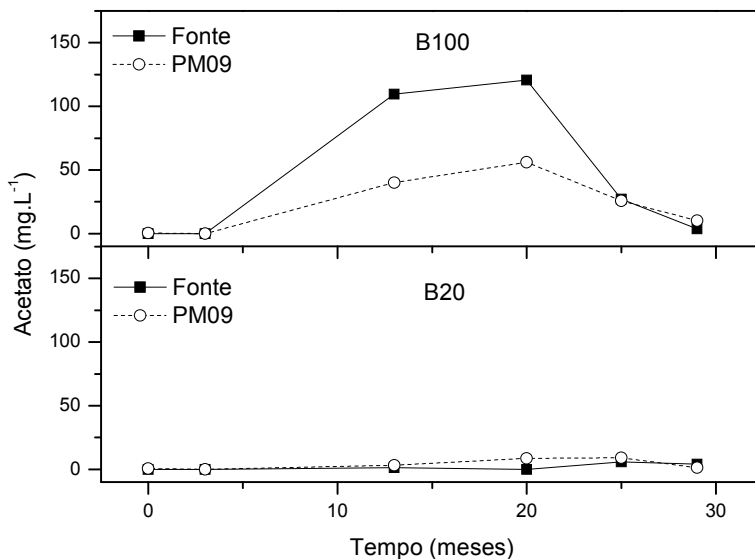


FIGURA 4.37 – Concentrações remanescentes de acetato nos experimentos com B100 e B20, no nível 2 metros dos poços Fonte e PM09.

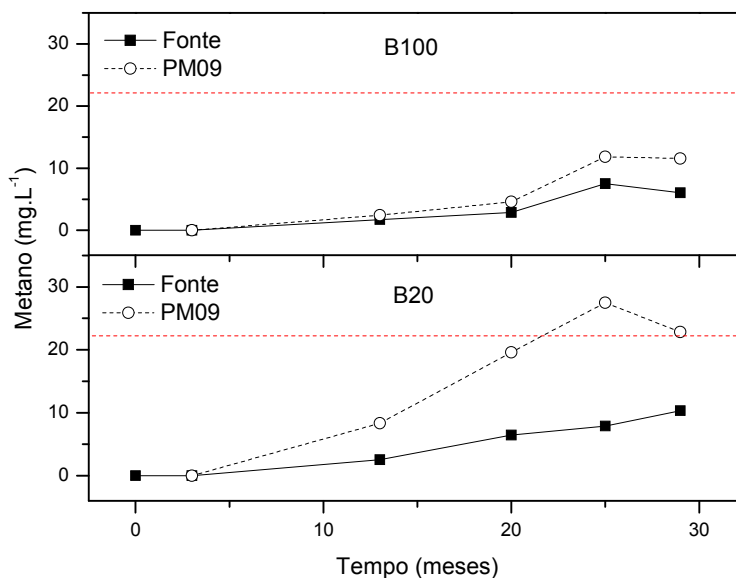


FIGURA 4.38 – Concentrações de metano detectadas nos experimentos com B100 e B20, no nível 2 metros dos poços Fonte e PM09.

Nota: A linha tracejada em vermelho representa a concentração de saturação em água.

Condições de excesso de fonte de carbono, além de levarem ao acúmulo de produtos no meio líquido, desencadeando limitações termodinâmicas que impedem a continuidade dos processos biodegradativos, também favorecem a formação de outros produtos intermediários. Como a formação do acetato vem acompanhada da produção de hidrogênio, em condições de excesso de matéria orgânica, ainda mais hidrogênio será produzido pelos micro-organismos, contribuindo para o esgotamento da capacidade de reciclagem de NADH. O hidrogênio produzido precisa ser consumido pelos micro-organismos responsáveis pelas etapas seguintes (principalmente metanogênese) para que as bactérias acetogênicas possam produzir ainda mais subprodutos oxidados (acetato). Se não houver esse consumo, as bactérias passarão a produzir ácidos graxos mais reduzidos que o acético, como ácido propiônico e butírico (WOLIN e MILLER, 1982; AHRING et al., 1995), como uma alternativa de disposição de elétrons que resulte em menor produção de hidrogênio (MOSEY, 1983). O problema da formação destes compostos mais reduzidos, no entanto, é que eles não são substratos diretos da metanogênese (WOLIN e MILLER, 1982) (TABELA 4.12).

TABELA 4.12 – Reações para consumo de propionato e butirato.

Reações acetogênicas para o consumo de propionato e butirato	
propionato:	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2$	$\Delta G^\circ +71,7 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.19)
butirato:	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	$\Delta G^\circ +88,2 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.20)

Nota: os valores de ΔG° foram calculados a partir dos dados de Thauer et al. (1977) para pH ≠7.

A presença de propionato e butirato em concentrações significativas no meio é, portanto, outro indicativo da ocorrência de limitação termodinâmica dos processos de biodegradação do biodiesel. No experimento com B100 foram detectadas concentrações de propionato e butirato (máximas de $9,6 \text{ mg.L}^{-1}$ e $11,3 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente). Ao contrário, no experimento com B20, quando detectadas, as concentrações foram inferiores a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (FIGURA 4.39).

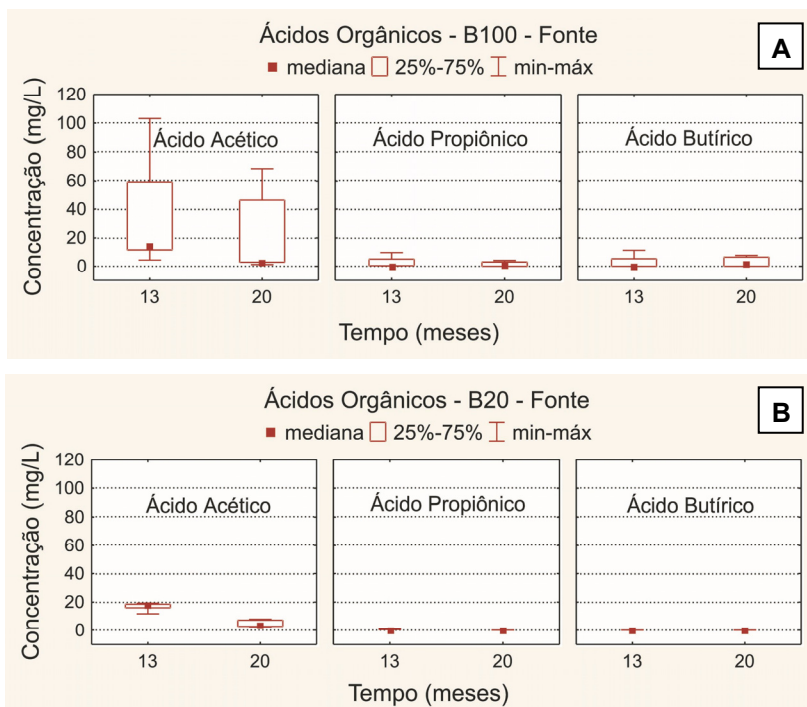


FIGURA 4.39 – Ácidos graxos voláteis nos poços Fonte dos experimentos com A) B100 e B) B20.

Além do consumo de acetato, a degradação satisfatória dos AGCL também dependerá da manutenção de baixas pressões parciais de hidrogênio no meio. A associação sintrófica entre duas ou mais espécies de micro-organismos mantém a pressão parcial do hidrogênio em torno de 10^{-4} a 10^{-6} atm ($\approx 10^{-9}$ a 10^{-11} M)⁵ (ZEHNDER, 1978). Do contrário, o acúmulo de hidrogênio será prevenido através da formação de ácidos voláteis reduzidos (WOLIN e MILLER, 1982). E, uma vez que há a formação destes ácidos mais reduzidos, níveis de hidrogênio maiores que 10^{-6} atm são termodinamicamente desfavoráveis para a conversão do propionato a acetato pelas bactérias acetogênicas (TABELA 4.12, Reação 4.19). Por outro lado, quando a pressão parcial do hidrogênio é menor do que 10^{-6} atm, as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas são inibidas, pois a energia livre para conversão do CO_2 a CH_4 se torna positiva (THAUER et al., 1977).

Cálculos teóricos reforçaram as evidências de limitação termodinâmica na biodegradação do biodiesel pelo acúmulo de acetato no meio. Para a realização dos cálculos, utilizando-se a equação 4.10, foram levados em consideração: as condições do ambiente no momento em que foram detectadas as máximas concentrações de acetato próximas às fontes de contaminação de ambos os experimentos (temperatura média de 25°C e pH médio de 4,0, aos 20 meses); a faixa de baixas pressões parciais de hidrogênio, em que não é esperado ocorrer limitação pelo acúmulo deste composto (10^{-4} a 10^{-6} atm); e a máxima solubilidade efetiva em água ($S_{ef,w}$) de cada AGCL proveniente da hidrólise do biodiesel, conforme TABELA 4.13.

⁵ O valor da constante da Lei de Henry para o hidrogênio, a 25°C, é 1282,1 L.atm.mol⁻¹ ou $1,907 \times 10^{-2}$ [adimensional]. A concentração de saturação em água (ou máxima solubilidade) é de 0,73 mM ($\approx 10^{-3}$ M ou 1,47 mg.L⁻¹) a 25°C.

TABELA 4.13 – Grandezas utilizadas no cálculo da solubilidade efetiva ($S_{ef,w}$) dos principais compostos hidrolisados do biodiesel (AGCL).

Ácidos	MM (g.mol ⁻¹)	Ssat,w ^a) (mg.L ⁻¹)	% massa b)	% molar c)	Sef,w ^c) (mg.L ⁻¹)	Sef,w ^c) (mol.L ⁻¹)
Palmitico (C16:0)	255,18	7,2	11,3	0,0443	0,319	1,25E-06
Estearico (C18:0)	283,20	2,9	3,5	0,0124	0,036	1,27E-07
Oleico (C18:1)	281,20	2,9	23,6	0,0839	0,243	8,66E-07
Linoleico (C18:2)	279,20	2,9	54,7	0,1959	0,568	2,03E-06
Linolênico (C18:3)	277,20	2,9	6,9	0,0249	0,072	2,60E-07

Legenda: MM – massa molecular; Ssat,w – solubilidade de saturação do composto puro em água;
% massa – razão percentual, em massa, dos compostos presentes no óleo puro de soja;
% molar – fração molar dos compostos presentes no óleo puro de soja; Sef,w – solubilidade efetiva do composto em água, quando numa mistura.

Notas: a) dados extraídos de RALSTON e HOERR, 1942; b) dados extraídos de NDIAYE et al., 2006;
c) valores calculados.

Para a máxima concentração de acetato detectada no experimento com B20 (9 mg.L⁻¹), o sistema foi considerado termodinamicamente favorável à transformação de todos os ácidos avaliados, conforme as reações apresentadas na TABELA 4.8. Para os ácidos esteárico (18:0) e palmítico (16:0) é necessário que a pressão de hidrogênio permaneça inferior a 10⁻⁵ atm (FIGURA 4.42 e FIGURA 4.43, respectivamente). As altas concentrações de metano detectadas (FIGURA 4.38), no entanto, sugerem que, além do acetato, o hidrogênio produzido também estaria sendo consumido e, por isso, é provável que a pressão de hidrogênio se mantenha nessa faixa. Já para a máxima concentração de acetato detectada no experimento com B100 (120 mg.L⁻¹), as reações de transformação dos ácidos somente serão termodinamicamente favoráveis no meio se as pressões de hidrogênio se mantiverem baixas. A reação de transformação do ácido linoleico (18:2), por exemplo, somente ocorreria em pressão parcial de hidrogênio inferior a 10⁻⁴ atm (FIGURA 4.40). Para uma pressão igual a este valor, a concentração máxima de acetato que deveria permanecer no meio seria de, aproximadamente, 40 mg.L⁻¹. Para os demais ácidos, as condições termodinâmicas favoráveis à ocorrência das reações de transformação seriam ainda mais restritivas. Para o ácido oleico (18:1), a pressão de hidrogênio deveria permanecer inferior a 10⁻⁵ atm (FIGURA 4.41) e, para os ácidos esteárico (18:0) e palmítico (16:0), esta pressão deveria permanecer próxima a 10⁻⁶ atm (FIGURA 4.42 e FIGURA 4.43, respectivamente). Sabendo-se que para concentrações de acetato próximas a 120 mg.L⁻¹, concentrações superiores à máxima concentração de saturação do hidrogênio na água ($\approx 10^{-3}$ M) seriam produzidas, o consumo de hidrogênio precisaria ser intenso para a manutenção de baixas pressões deste composto na fase dissolvida. É importante ressaltar, no entanto, que a lenta transferência dos constituintes do biodiesel para a fase aquosa, devido à baixa solubilidade deste biocombustível, poderia tornar as condições de degradação ainda mais restritivas, uma vez que as reais concentrações dos ácidos na água subterrânea poderiam ser menores do que as solubilidades efetivas calculadas.

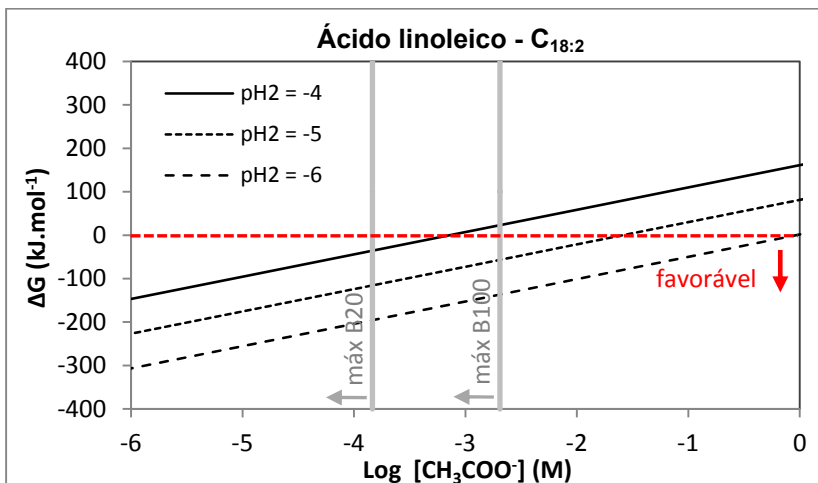


FIGURA 4.40 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido linoleico (18:2) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.1), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

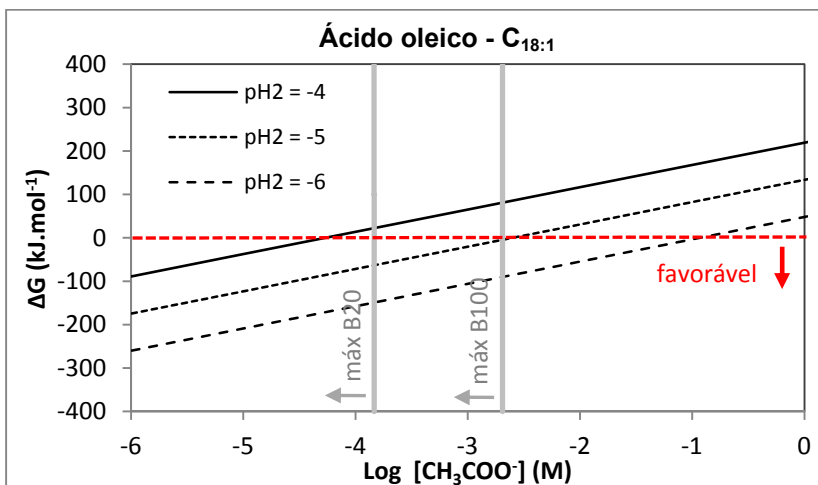


FIGURA 4.41 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido oleico (18:1) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.2), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

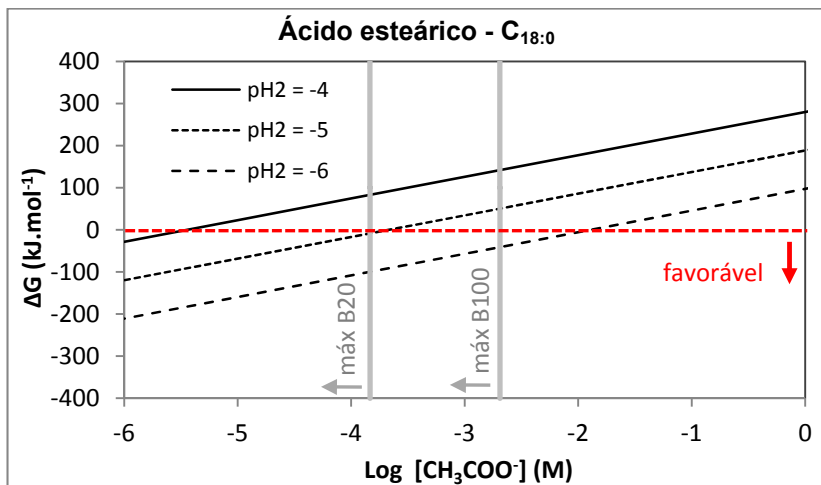


FIGURA 4.42 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido esteárico (18:0) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.3), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

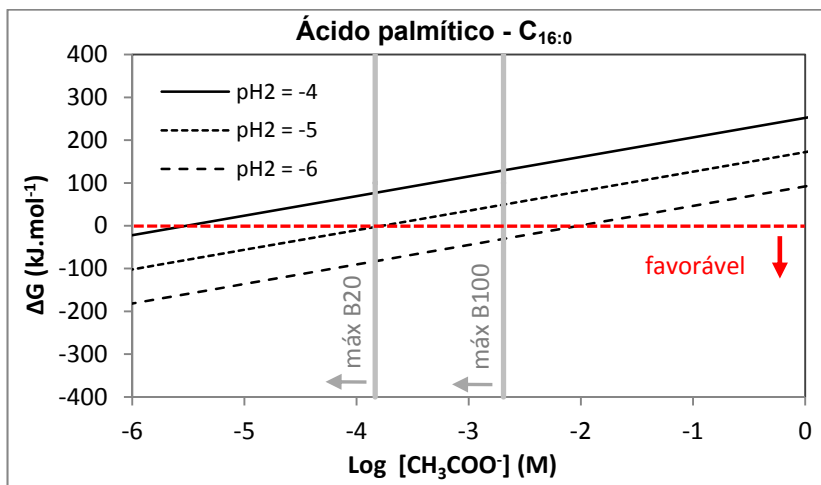


FIGURA 4.43 – Viabilidade termodinâmica para transformação do ácido palmítico (16:0) a acetato e hidrogênio (TABELA 4.8, Reação 4.4), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

4.2.4. Influência do biodiesel no processo de degradação dos combustíveis fósseis

As diferentes alterações biogeoquímicas causadas no meio pela liberação de diferentes cargas orgânicas de biodiesel de soja na água subterrânea podem trazer diferentes implicações ao processo de degradação dos compostos aromáticos dos combustíveis fósseis. Durante todo o período de monitoramento (29 meses) do experimento em que foram liberados 20 litros de biodiesel de soja juntamente a 80 litros de diesel (B20), não foi observada significativa degradação dos compostos aromáticos (mono e policíclicos) do diesel fóssil, uma vez que as concentrações destes compostos na água permaneceram altas. O biodiesel de soja se comportou, portanto, como uma fonte preferencial de carbono para os micro-organismos nativos (assim como observado para os experimentos de laboratório de CORSEUIL et al, 2011b), retardando o início da degradação dos compostos aromáticos. Com relação à degradação do biodiesel nesta mistura, não foi observado um acúmulo de acetato, o principal subproduto metabólico, na água subterrânea. Concentrações máximas de 9 mg.L^{-1} foram detectadas somente aos 20 e 25 meses. Como a degradação do biodiesel envolve a cooperação sintrófica entre os micro-organismos atuantes, as baixas concentrações de acetato detectadas seriam um indício de que este produto intermediário estaria sendo rapidamente convertido a outro produto, em outro estágio do processo de biodegradação. Como exemplo desta conversão do acetato, pode-se citar as concentrações de metano próximas a 10 mg.L^{-1} detectadas aos 13 meses e que continuaram a crescer alcançando níveis de saturação em água (22 mg.L^{-1}) em 20 meses. As concentrações de metano detectadas indicaram que a presença de 20 litros de biodiesel de soja na água subterrânea permitiu a predominância da metanogênese durante o processo de biodegradação somente 1 ano após sua liberação. Sabendo-se que a etapa metanogênica é a principal responsável pela completa biodegradação de compostos orgânicos no ambiente subterrâneo (i.e., com baixa disponibilidade de receptores de elétrons inorgânicos), quanto antes ela for estimulada, mais rapidamente ocorrerá o esgotamento da fonte preferencial de carbono e mais rapidamente os compostos aromáticos do diesel poderão ser biodegradados.

Ao contrário, a liberação de um volume maior de biodiesel no ambiente pode levar à inibição termodinâmica do processo de degradação do próprio biodiesel e, conseqüentemente, do processo de

degradação dos compostos aromáticos do diesel fóssil. No experimento em que foram liberados 100 litros de biodiesel de soja na água subterrânea, foi observado um acúmulo de acetato no meio com concentrações de até 120 mg.L^{-1} em 20 meses de monitoramento. Conseqüentemente, concentrações de 10 mg.L^{-1} de metano, principal produto da transformação do acetato, só foram observadas após 2 anos (o dobro do tempo em relação ao experimento com 20 litros). O excesso de produtos acumulados no meio (acetato e, possivelmente, hidrogênio), provenientes da transformação dos AGCL do biodiesel, pode ter levado à inibição termodinâmica das etapas envolvidas no processo de biodegradação do biodiesel, dentre elas, a metanogênese. Se este experimento com 100 litros de biodiesel de soja se tratasse de uma mistura com diesel, os compostos aromáticos poderiam demorar ainda mais tempo a serem biodegradados, em relação ao experimento com 20 litros de biodiesel.

Mesmo que a biodegradação dos aromáticos do diesel combustível possa ocorrer concomitantemente à biodegradação do biodiesel de soja, a presença de altas concentrações de acetato e hidrogênio no meio pode interferir no processo de degradação dos compostos aromáticos. Em condições metanogênicas, os hidrocarbonetos monoaromáticos e policíclicos aromáticos do diesel, como benzeno e nafataleno, respectivamente, podem ser completamente biodegradados via diferentes rotas metabólicas (TABELA 4.14). No primeiro estágio desse processo, os hidrocarbonetos aromáticos podem ser fermentados a acetato e hidrogênio (Rotas A e B, Reações 4.21, 4.25, 4.29 e 4.33), ou a acetato apenas (Rotas C e D, Reações 4.37, 4.41, 4.45 e 4.48). No entanto, essas reações são endergônicas em condições padrão e somente ocorrerão nas condições ambiente se os produtos liberados no meio forem mantidos em baixas concentrações. Uma vez que os produtos da degradação do biodiesel são basicamente os mesmos da fermentação dos hidrocarbonetos aromáticos (acetato e hidrogênio), a presença deles no meio, em determinadas concentrações, pode levar à inibição termodinâmica dos processos fermentativos de degradação do diesel.

TABELA 4.14 – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do benzeno e do naftaleno (diesel fóssil). Possíveis rotas A, B, C e D.

A) Oxidação a acetato e hidrogênio, associada à oxidação sintrófica do acetato e à redução do CO₂			
benzeno:			
$C_6H_6 + 6 H_2O$	$\rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + 3 H_2$	$\Delta G^\circ +190,34 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.21)
$3 CH_3COO^- + 3 H^+ + 6 H_2O$	$\rightarrow 12 H_2 + 6 CO_2$	$\Delta G^\circ +165,14 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.22)
$15 H_2 + 3,75 CO_2$	$\rightarrow 3,75 CH_4 + 7,5 H_2O$	$\Delta G^\circ - 490,30 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.23)
soma: $C_6H_6 + 4,5 H_2O$	$\rightarrow 3,75 CH_4 + 2,25 CO_2$	$\Delta G^\circ - 134,82 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.24)
naftaleno:			
$C_{10}H_8 + 10 H_2O$	$\rightarrow 5 CH_3COO^- + 5 H^+ + 4 H_2$	$\Delta G^\circ +300,47 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.25)
$5 CH_3COO^- + 5 H^+ + 10 H_2O$	$\rightarrow 20 H_2 + 10 CO_2$	$\Delta G^\circ +275,24 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.26)
$24 H_2 + 6 CO_2$	$\rightarrow 6 CH_4 + 12 H_2O$	$\Delta G^\circ - 784,48 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.27)
soma: $C_{10}H_8 + 8 H_2O$	$\rightarrow 6 CH_4 + 4 CO_2$	$\Delta G^\circ - 208,77 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.28)
B) Oxidação a acetato e hidrogênio, associada à metanogênese acetoclástica e à redução do CO₂			
benzeno:			
$C_6H_6 + 6 H_2O$	$\rightarrow 3 CH_3COO^- + 3 H^+ + 3 H_2$	$\Delta G^\circ +190,34 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.29)
$3 CH_3COO^- + 3 H^+$	$\rightarrow 3 CH_4 + 3 CO_2$	$\Delta G^\circ - 227,10 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.30)
$3 H_2 + 0,75 CO_2$	$\rightarrow 0,75 CH_4 + 1,5 H_2O$	$\Delta G^\circ - 98,06 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.31)
soma: $C_6H_6 + 4,5 H_2O$	$\rightarrow 3,75 CH_4 + 2,25 CO_2$	$\Delta G^\circ - 134,82 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.32)
naftaleno:			
$C_{10}H_8 + 10 H_2O$	$\rightarrow 5 CH_3COO^- + 5 H^+ + 4 H_2$	$\Delta G^\circ +300,47 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.33)
$5 CH_3COO^- + 5 H^+$	$\rightarrow 5 CH_4 + 5 CO_2$	$\Delta G^\circ - 378,50 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.34)
$4 H_2 + 1 CO_2$	$\rightarrow 1 CH_4 + 2 H_2O$	$\Delta G^\circ - 130,75 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.35)
soma: $C_{10}H_8 + 8 H_2O$	$\rightarrow 6 CH_4 + 4 CO_2$	$\Delta G^\circ - 208,77 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.36)
C) Oxidação a acetato apenas, associada à oxidação sintrófica do acetato e à redução do CO₂			
benzeno:			
$C_6H_6 + 4,5 H_2O + 1,5 CO_2$	$\rightarrow 3,75 CH_3COO^- + 3,75 H^+$	$\Delta G^\circ +149,05 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.37)
$3,75 CH_3COO^- + 3,75 H^+ + 7,5 H_2O$	$\rightarrow 15 H_2 + 7,5 CO_2$	$\Delta G^\circ +206,43 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.38)
$15 H_2 + 3,75 CO_2$	$\rightarrow 3,75 CH_4 + 7,5 H_2O$	$\Delta G^\circ - 490,30 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.39)
soma: $C_6H_6 + 4,5 H_2O$	$\rightarrow 3,75 CH_4 + 2,25 CO_2$	$\Delta G^\circ - 134,82 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.40)
naftaleno:			
$C_{10}H_8 + 8 H_2O + 2 CO_2$	$\rightarrow 6 CH_3COO^- + 6 H^+$	$\Delta G^\circ +245,42 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.41)
$6 CH_3COO^- + 6 H^+ + 12 H_2O$	$\rightarrow 24 H_2 + 12 CO_2$	$\Delta G^\circ +330,29 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.42)
$24 H_2 + 6 CO_2$	$\rightarrow 6 CH_4 + 12 H_2O$	$\Delta G^\circ - 784,48 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.43)
soma: $C_{10}H_8 + 8 H_2O$	$\rightarrow 6 CH_4 + 4 CO_2$	$\Delta G^\circ - 208,77 \text{ kJ.reação}^{-1}$	(4.44)

TABELA 4.15 (Cont.) – Reações envolvidas nos processos metabólicos de biodegradação do benzeno e do naftaleno (diesel fóssil). Possíveis rotas A, B, C e D.

D) Oxidação a acetato apenas, associada à metanogênese acetoclástica			
benzeno:			
$C_6H_6 + 4,5 H_2O + 1,5 CO_2$	\rightarrow	$3,75 CH_3COO^- + 3,75 H^+$	$\Delta G^\circ +149,05 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.45)
$3,75 CH_3COO^- + 3,75 H^+$	\rightarrow	$3,75 CH_4 + 3,75 CO_2$	$\Delta G^\circ - 283,87 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.46)
soma: $C_6H_6 + 4,5 H_2O$	\rightarrow	$3,75 CH_4 + 2,25 CO_2$	$\Delta G^\circ - 134,82 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.47)
naftaleno:			
$C_{10}H_8 + 8 H_2O + 2 CO_2$	\rightarrow	$6 CH_3COO^- + 6 H^+$	$\Delta G^\circ +245,42 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.48)
$6 CH_3COO^- + 6 H^+$	\rightarrow	$6 CH_4 + 6 CO_2$	$\Delta G^\circ - 454,19 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.49)
soma: $C_{10}H_8 + 8 H_2O$	\rightarrow	$6 CH_4 + 4 CO_2$	$\Delta G^\circ - 208,77 \text{ kJ.reação}^{-1}$ (4.50)

Nota: os valores de ΔG° foram calculados a partir dos dados de Thauer et al. (1977) para pH \neq 7.

Cálculos termodinâmicos teóricos foram utilizados para avaliar a influência das máximas concentrações de acetato detectadas no meio, em ambos os experimentos, com relação à possível inibição termodinâmica do processo de biodegradação dos compostos aromáticos. Considerando as condições ambiente em que as máximas concentrações de acetato foram detectadas próximas às fontes de ambos os experimentos (aos 20 meses, em que a temperatura média era 25°C e o pH médio era 4,0), para as rotas que geram acetato e hidrogênio, quanto maior a concentração de acetato no meio, menor teria de ser a de hidrogênio para que a reação pudesse ocorrer. Na máxima concentração de acetato detectada no experimento com B20, 9 mg.L⁻¹ (1,5×10⁻⁴ M ou log (-3,8) M), o sistema foi considerado termodinamicamente favorável (exergônico ($\Delta G < 0$)) em relação à fermentação do benzeno e do naftaleno para pressões de hidrogênio iguais ou menores a 10⁻⁵ atm (FIGURA 4.44 e FIGURA 4.45, respectivamente). Em pressões maiores de hidrogênio (>10⁻⁴ atm), o sistema só continuaria favorável se as concentrações de acetato permanecessem menores que 1,0 mg.L⁻¹ (ou < log (-4,75) M) para o benzeno (FIGURA 4.44) e menores que 2,0 mg.L⁻¹ (ou < log (-4,5) M) para o naftaleno (FIGURA 4.45). Ao contrário, para a máxima concentração de acetato detectada no experimento com B100, 120 mg.L⁻¹ (2,0×10⁻³ M ou log (-2,7) M), o sistema somente foi considerado termodinamicamente favorável em relação à fermentação do benzeno para pressões de hidrogênio iguais ou

inferiores a 10^{-6} atm (o que é pouco provável de ocorrer visto que o consumo de hidrogênio precisaria ser intenso para a manutenção destas pressões e as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas são inibidas termodinamicamente quando a pressão de hidrogênio é menor do que 10^{-6} atm (THAUER et al., 1977)) (FIGURA 4.44). Em relação à fermentação do naftaleno, o sistema foi considerado desfavorável termodinamicamente (endergônico ($\Delta G > 0$)) para todas as pressões de hidrogênio avaliadas (FIGURA 4.45). Isso revela que a influência do acetato é ainda maior para a degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fração ainda menos solúvel do diesel. Considerando a ocorrência da rota sem a produção de hidrogênio, em ambos os experimentos o sistema seria endergônico para as concentrações de acetato detectadas (FIGURA 4.46 e FIGURA 4.47).

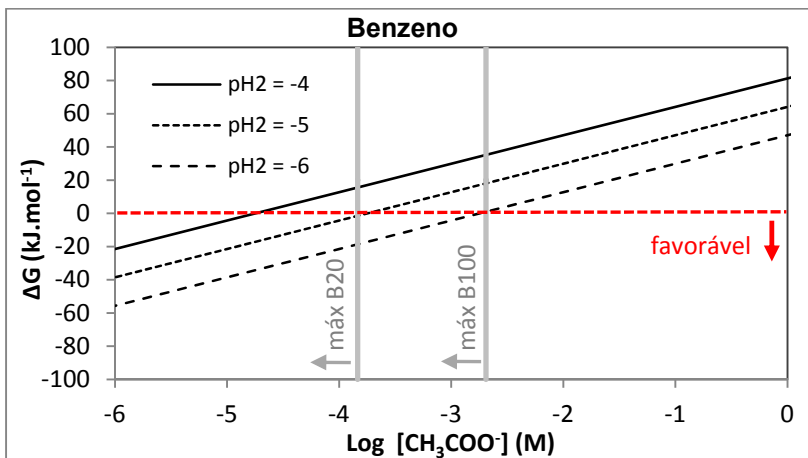


FIGURA 4.44 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de benzeno no B20 (1 mg.L⁻¹) a acetato e hidrogênio (Reações 4.21 e 4.29), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

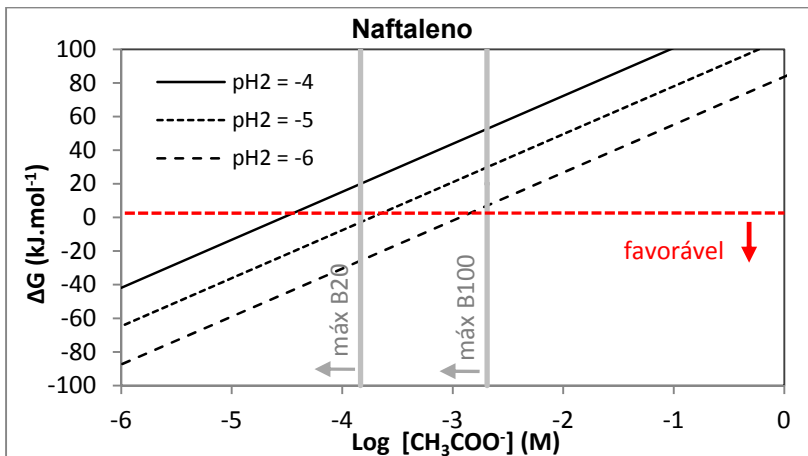


FIGURA 4.45 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de naftaleno no B20 (0,12 mg.L⁻¹) a acetato e hidrogênio (Reações 4.25 e 4.33), para uma faixa de pressões de H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ atm.

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

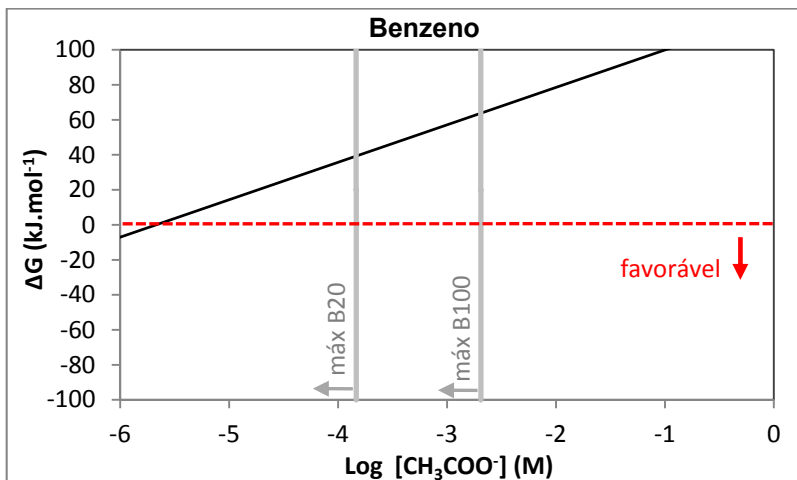


FIGURA 4.46 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de benzeno no B20 (1 mg.L⁻¹) a acetato apenas (Reações 4.37 e 4.45).

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

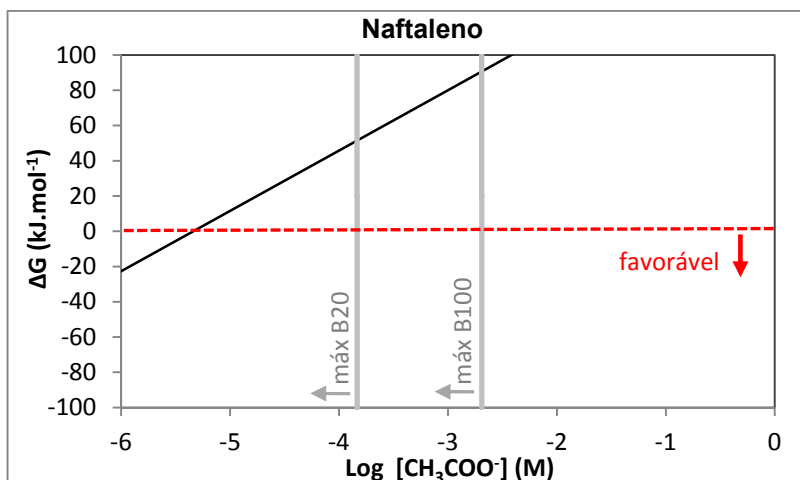


FIGURA 4.47 – Viabilidade termodinâmica para fermentação da máxima concentração medida de naftaleno no B20 (0,12 mg.L⁻¹) a acetato apenas (Reações 4.41 e 4.48).

Nota: Em destaque no eixo x estão as máximas concentrações de acetato medidas nos experimentos com B20 e B100.

Os resultados obtidos com os experimentos de campo sugerem que o biodiesel de soja pode dificultar a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Isso ocorreria tanto pelo excesso de subprodutos da biodegradação do biodiesel acumulados no meio, quanto por mecanismos similares aos que ocorrem na presença de etanol (nas misturas de gasolina com etanol), como o esgotamento acelerado dos receptores de elétrons e a degradação preferencial desta fonte de carbono pelos micro-organismos nativos (CORSEUIL et al., 2011a). Embora essa inibição dos processos naturais de degradação dos aromáticos seja similar à exercida pelo etanol, as diferentes propriedades físico-químicas destes dois biocombustíveis, principalmente em termos de solubilidade, pode afetar a dinâmica das plumas de contaminantes dissolvidos de diferentes maneiras.

A infinita solubilidade em água do etanol faz com que este particione rápida e completamente para a fase aquosa, criando um pulso de alta concentração deste composto na água subterrânea. A maior biodisponibilidade do etanol e sua maior facilidade de degradação fazem com que este composto seja, então, degradado preferencialmente na presença de combustíveis fósseis, contribuindo para a inibição da atenuação natural dos hidrocarbonetos aromáticos. Com o passar do tempo, este pulso de concentração vai tendo sua intensidade diminuída, principalmente, pela biodegradação preferencial e vai sendo transportado, junto com o fluxo da água subterrânea, para mais longe da fonte de contaminação (fonte móvel), influenciando uma região maior (FIGURA 4.48 A) (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996; POWERS e McDOWELL, 2003; CORSEUIL et al., 2011a). Ao contrário do etanol, o biodiesel apresenta baixa solubilidade em água e, por isso, sua transferência para a fase aquosa ocorre de maneira lenta, comportando-se como uma fonte fixa, e mais duradoura, de contaminação. Uma vez hidrolisados, no entanto, os compostos do biodiesel (principalmente os ácidos graxos) são preferencialmente biodegradados pelos micro-organismos nativos em relação aos compostos aromáticos dos combustíveis fósseis. Com o passar do tempo, essa fonte preferencial de carbono se torna decrescente e com potencial de migração limitado por causa da solubilidade limitante (FIGURA 4.48 B).

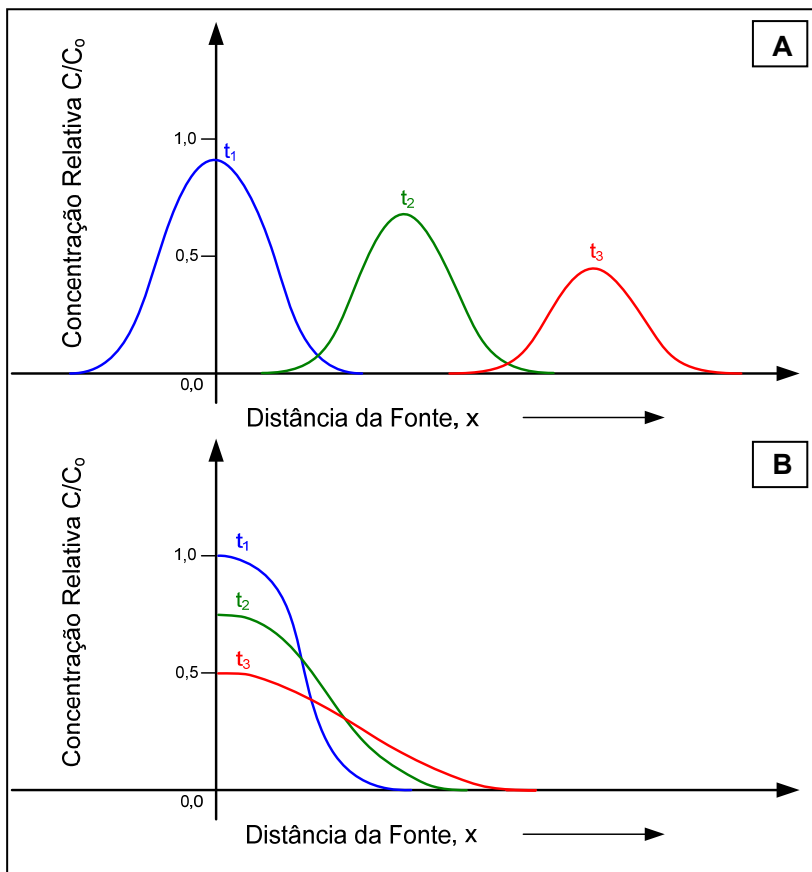


FIGURA 4.48 – Comportamentos dos diferentes biocombustíveis na água subterrânea, em relação ao tempo (t): A) Etanol (altamente solúvel) - fonte móvel de contaminação; B) Biodiesel (pouco solúvel) - fonte fixa de contaminação.

A lenta transferência do biodiesel para a água subterrânea, portanto, torna mais lento o processo de degradação deste biocombustível, em relação ao etanol, devido à limitação de sua biodisponibilidade no meio. Além disso, a baixa mobilidade do biodiesel em relação à região da fonte e a preferencial degradação deste combustível em misturas contendo combustíveis fósseis contribuem para um tempo ainda mais longo para o início da degradação dos compostos aromáticos, embora sobre uma região de influência menor.

Em contrapartida, a alta solubilidade do etanol possibilita a transformação deste composto a acetato muito mais rapidamente e por uma área muito maior, em relação ao biodiesel. Num experimento de campo com 24 litros de etanol, misturados a 76 litros de gasolina, foram medidas concentrações máximas de acetato próximas a 165 mg.L^{-1} , após 32 meses da liberação da mistura (CORSEUIL et al., 2011a), enquanto que concentrações máximas próximas a 9 mg.L^{-1} foram detectadas no experimento com 20 litros de biodiesel puro de soja e 80 litros de diesel, após 20 meses de monitoramento. O pulso de alta concentração de acetato gerado pelo etanol pode trazer implicações termodinâmicas muito maiores à degradação dos combustíveis fósseis do que o biodiesel.

Embora o biodiesel de soja retarde o início da degradação dos compostos aromáticos, a manutenção de concentrações não limitantes de acetato no meio permite a continuidade das etapas envolvidas no processo de biodegradação. Isso, além de proporcionar o esgotamento da fonte preferencial de carbono, estimula o desenvolvimento da biomassa nativa, o que pode, num segundo momento, favorecer a degradação dos compostos aromáticos.

5. CONCLUSÕES

Condições anaeróbias foram predominantes durante a biodegradação do biodiesel puro de soja (B100) e da mistura desse biocombustível com diesel (B20) no ambiente subterrâneo em que foram realizados os experimentos de campo. Os diferentes volumes liberados de biodiesel de soja, entretanto, implicaram em diferentes alterações biogeoquímicas na água subterrânea. No experimento em que houve a liberação de um maior volume de biodiesel de soja (100 litros), concentrações de acetato de até 120 mg.L^{-1} e de metano de até 10 mg.L^{-1} foram observadas na fase aquosa durante os dois primeiros anos de monitoramento. Ao contrário, no experimento em que foi liberado um menor volume de biodiesel (20 litros), baixas concentrações de acetato (máxima de 9 mg.L^{-1}) e altas concentrações de metano (máxima de 28 mg.L^{-1}) foram detectadas durante o mesmo período. No experimento com maior volume de biodiesel, portanto, o acúmulo do subproduto metabólico acetato limitou o desenvolvimento da metanogênese no meio.

No experimento desenvolvido com a mistura diesel/biodiesel (B20), altas concentrações dos compostos mono e policíclicos aromáticos constituintes da fração de diesel fóssil foram detectadas durante todo o período de monitoramento do experimento (29 meses). Estes resultados sugeriram que a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos foi dificultada pela presença do biodiesel de soja. As altas concentrações de metano e as baixas concentrações de acetato detectadas na água subterrânea deste experimento (evidências de biodegradação) sugeriram que o biodiesel de soja foi preferencialmente degradado pelos micro-organismos nativos. A alta demanda bioquímica de oxigênio exercida pelo biodiesel, sua baixa solubilidade em água e consequente lenta biodegradação, mantêm as condições metanogênicas por mais tempo no ambiente, o que é desfavorável para a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Portanto, quanto maior o volume de biodiesel no meio, maior o tempo necessário para que essa fonte se esgote e, consequentemente, por mais tempo os compostos aromáticos permanecerão no meio ambiente. Além disso, o acúmulo de subprodutos metabólicos como o acetato no meio, gerado pelo maior volume de biodiesel, pode limitar termodinamicamente o processo de biodegradação dos compostos aromáticos.

Cálculos termodinâmicos teóricos comprovaram que a presença de acetato no meio, em determinadas concentrações, interfere no processo de degradação dos compostos aromáticos. Para a máxima concentração de acetato detectada no experimento com B100 (120 mg.L^{-1}), a fermentação do benzeno e do naftaleno foram consideradas desfavoráveis termodinamicamente para pressões de hidrogênio maiores que 10^{-6} atm. Já para a máxima concentração de acetato detectada no experimento com B20 (9 mg.L^{-1}), o sistema foi considerado termodinamicamente favorável em relação à fermentação do benzeno e do naftaleno desde que as pressões de hidrogênio se mantivessem no meio iguais ou menores a 10^{-5} atm.

Embora o biodiesel de soja influencie negativamente a degradação dos compostos aromáticos, a manutenção de concentrações não limitantes de acetato no meio permite a continuidade do processo de biodegradação dos compostos orgânicos. Isso, além de proporcionar o esgotamento da fonte preferencial de carbono, estimula o desenvolvimento da biomassa nativa (o número de cópias de genes de bactérias totais e de arqueas chegou a 10^8 por grama de sólidos suspensos totais em ambos os experimentos), o que pode, num segundo momento, favorecer a degradação dos compostos aromáticos.

A hipótese formulada para o desenvolvimento desta tese foi, portanto, confirmada e, assim, uma vez que a baixa solubilidade em água do biodiesel o caracteriza como uma fonte duradora de contaminação e sua presença em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes mantém as condições no meio anaeróbias por um longo período, dificultando a degradação dos compostos aromáticos, as tecnologias para a remediação de áreas contaminadas com misturas de diesel/biodiesel devem focar a rápida remoção desta fração mais facilmente biodegradável. Para isso, processos redutores de biodegradação devem ser estimulados e as concentrações de subprodutos metabólicos, principalmente acetato e hidrogênio, devem ser monitoradas, pois são os principais limitadores termodinâmicos dos processos sintróficos de biodegradação dos compostos orgânicos.

RECOMENDAÇÕES

A partir das conclusões obtidas com este estudo, recomenda-se:

- A continuidade do monitoramento dos experimentos instalados, a fim de se acompanhar o desenvolvimento da degradação dos compostos aromáticos presentes no diesel do experimento com B20 e o esgotamento total da fonte de contaminação no experimento com B100;
- Comparar a degradação dos compostos aromáticos do diesel em derramamentos com e sem a adição de biodiesel, a fim de verificar um possível aumento na cinética de degradação destes compostos devido ao aumento da biomassa estimulada pelo consumo do biocombustível;
- Investigar as principais diferenças na degradação de compostos aromáticos, provocadas pela influência da presença de biodiesel ou etanol como aditivo do combustível fóssil;
- Avaliar a influência do hidrogênio na degradação do biodiesel e dos compostos aromáticos do diesel;
- Desenvolver metodologias de remediação que busquem acelerar o esgotamento da fonte preferencial de carbono, diminuindo, consequentemente, o tempo de permanência dos compostos aromáticos no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 7181: Solos - Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, 1984. 13 p.

AFCEE – AIR FORCE CENTER FOR ENVIRONMENTAL EXCELLENCE. **Handbook for Remediation of Petroleum-Contaminated Sites (A Risk-Based Strategy)**. Technology Transfer Division, Brooks AFB, Texas, April 1998, 285p.

AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 43. p 559-565. 1995.

ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Ecology and Biogeochemistry of *in Situ* Groundwater Bioremediation. In: JONES, J. G. (ed). **Advances in Microbial Ecology**. New York: Ed. Plenum Press, 1997. Vol. 15, Cap. 7, p. 289-350.

ANDERSON, R. T.; LOVELY, D. R. Naphthalene and benzene degradation under Fe(III)-reducing conditions in petroleum-contaminated aquifers. **Biorem. J.** v.3, n.2, p.121–135, 1999.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Effects of free long chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.37, n.6, p 808-812. 1992.

ANNWEILER, E.; MATERNA, A.; SAFINOWSKI, M.; KAPPLER, A.; RICHNOW, H.H.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R.U. Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfatereducing enrichment culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, n.12, p.5329–5333, 2000.

ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R.U. Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetraline indicate a new metabolic pathway. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, n.2, p.852–858, 2002.

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Resolução ANP N° 42, de 24 de novembro de 2004.** Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2004/dezembro/ranp%2042%20-%202004.xml>. Acesso em: março 2008.

_____. **Resolução ANP N° 7, de 19 de março de 2008.** Disponível em <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml>. Acesso em: março 2008.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 18th edition, Washington, DC, 1992.

ASTM – AMERICAM SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. E1739-95: **Standard guide for risk-based corrective action applied at petroleum release sites.** Philadelphia, 1995.

ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for fuel oils.** Sciences International, INC. Atlanta, Georgia, 1995.

_____. **Toxicological profiles.** Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>> Acesso em: março de 2008.

BALL, H. A.; JOHNSON, H. A.; REINHARD, M.; SPORMANN, A. M. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. **J. Bacteriol.** v.178, n.19, p.5755–5761, 1996.

BATSTONE, D. J. **High rate anaerobic treatment of complex wastewater**. PhD thesis, Queensland University, Australia. 2000.

BEDIENT, P.B.; RIFAI, H.S.; NEWELL, C.J. **Ground Water Contamination: Transport and remediation**. Prentice Hall. New Jersey, 1994.

_____. **Ground Water Contamination: Transport and remediation**. 2^a Ed. Prentice Hall. New Jersey, 1997.

BELLER, H. R.; SPORMANN, A. M. Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. **J. Bacteriol.** v.179, n.3, p.670–676, 1997a.

BELLER, H. R.; SPORMANN, A. M. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, n.9, p.3729–3731, 1997b.

BELLER, H.R.; KANE, S.R.; LEGLER, T.C.; ALVAREZ, P.J.J. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. **Environ Sci Technol.** v.36, n.18, p 3977 - 3984. 2002.

BIODIESEL BR. Colunas. Décio Luiz Gazzoni. 31 março 2008.

Biodiesel na Alemanha. Disponível em:

<<http://www.biodieselbr.com/colunistas/gazzoni/biodiesel-alemanha-31-03-08.htm>>. Acesso em: 01 abril 2008.

BORDEN, R.C.; DANIEL, R.A.; LEBRUN IV, L.E.; DAVIS, C.W. Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in gasoline-contaminated aquifer. **Water Resources Research.** v.33, n.5, p. 1105-1115, 1997.

BOONE, D. R. Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste. **Appl. Environ Microbiol.** v.43. p 57-64. 1982.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Obtenção de Combustível de Óleo Vegetal a Nível de Propriedade Rural.** (Documento, 18). Brasília, STI/CIT, 1985. 98 p.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool. Dispõe sobre a adição de álcool etílico anidro combustível à gasolina. **Resolução nº 37, de 27 de junho de 2007.** Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=RES&numeroAto=00000037&seqAto=000&valorAno=2007&orgao=CIMA/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>>. Acesso em abril 2008.

BRASIL. Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Lex:** Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/leis/2005/lei%2011.097%20-%202005.xml>> Acesso em março 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Conselho Nacional de Política Energética – CNPE. Estabelece em três por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, nos termos do art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Resolução nº 2, de 13 de março de 2008.** Disponível em <<http://www.mme.gov.br/download.do?attachmentId=13709&download>>. Acesso em: março 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Conselho Nacional de Política Energética – CNPE. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Resolução nº 6, de 16 de setembro de 2009.**

CALDWELL, M. E.; SUFLITA, J. M. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. **Environ. Sci. Technol.** v.34, n.7., p.1216–1220, 2000.

CÂMARA, G. M. S. Potencial da cultura da soja como fonte de matéria-prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S. & HEIFFIG, L. S. (coord.): **Agronegócio de Plantas Oleaginosas: Matérias-Primas para Biodiesel.** Piracicaba: ESALQ. p.123 – 153. 2006.

CÂMARA, G. M. S.; GODOY, O. P.; MARCOS FILHO, J.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Org. **Soja: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial.** São Paulo: Promocet, s/d. 99 p. (Série Extensão Agroindustrial, 7).

CAPIRO, N. L., DA SILVA, M. L. B.; STAFFORD, B. P.; RIXEY, W. G.; ALVAREZ, P. J. J. Microbial community response to a release of neat ethanol onto residual hydrocarbons in a pilot-scale aquifer tank. **Environmental Microbiology.** v.10, n. 9, p.2236-2244. 2008.

CHAPELLE, F.H. Ground-water Microbiology and geochemistry. 2 Ed. New York: John Wiley and Sons, 2001. 477p.

CHEN, Y. D.; BARKER, J. F.; GUI, L. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: A microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology.** v.96, p. 17-31, 2007.

CHIARANDA, H. S. **Volatilização dos compostos BTEX em ambientes de subsuperficiais contaminados com gasolina e etanol: comparação entre concentrações medidas e simuladas.** Florianópolis, 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina.

CHRISTENSEN, T. H.; KJELDSSEN, P.; ALBRECHTSEN, H.-J.; HERON, G.; NIELSEN, P. H.; BJERG, P. L.; HOLM, P. E., Attenuation of landfill leachate pollutants in aquifers. **Environ. Sci. Technol.** v.24, p 119–202. 1994.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, n.3, p.1099–1101, 1996a.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T.; WOODWARD, J. C.; PHILLIPS, E. J. P.; LOVLEY, D. R. Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. **Environ. Sci. Tech.** v.30, n.9, p.2784–2789, 1996b.

COATES, J. D.; PHILLIPS, E. J. P.; LONERGAN, D. J.; JENTER, H.; LOVLEY, D. R. Isolation of *Geobacter* species from a variety of sedimentary environments. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, n.5, p.1531–1536, 1996c.

COATES, J. D.; WOODWARD, J.; ALLEN, J.; PHILP, P.; LOVELY, D. R. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, n.9, p.3589–3593, 1997.

COATES, J. D.; ACHENBACH, L. A. The biogeochemistry of aquifer systems. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. W. (eds). **Manual of environmental microbiology**. ASM Press, Washington, D.C., p 719–727, 2001.

COATES, J. D.; CHAKRABORTY, R.; MCINERNEY, M. J. Anaerobic benzene biodegradation - a new era. **Res. Microbiol.** v.153, n.10, p.621–628, 2002.

COLLERAN, E.; FINNEGAN, S.; LENS, P. Anaerobic treatment of sulfate-containing waste streams. **Antonie Van Leeuwenhoek.** v.67. p 29-46. 1995.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixture. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.1, p.19-26, Jan/Mar. 1996.

CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B. I. A.; FERNANDES M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. **Water Research.** v.38, n.6, p.1449-1456. 2004.

CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M.; ROSÁRIO, M. Weathering of Ethanol-Blended Gasoline in Aquifers - A Field Experiment. In: The International Conference on Environmental Science and Technology, 2005, New Orleans, USA. **Proceedings of The International Conference on Environmental Science and Technology**. New Orleans: National Academy of Science. v.1, p.100-106. 2005.

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; FERNANDES, M.; SCHNEIDER, M. R.; NUNES, C. C.; ROSÁRIO, M. Do; ALVAREZ, P. J. J. BTEX Plume Dynamics Following an Ethanol Blend Release: Geochemical Footprint and Thermodynamic Constraints on Natural Attenuation. **Environ. Sci. Technol.** v. 45, p. 3422-3429, 2011a.

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; GOMES, A. P. N.; CHIARANDA, H. S.; ROSÁRIO, M. Do; ALVAREZ, P. J. J. Biodegradation of Soybean and Castor Oil Biodiesel: Implications on the Natural Attenuation of Monoaromatic Hydrocarbons in Groundwater. **Ground Water Monitoring & Remediation**. v.31, n.2, Article first published online. 2011b.

DA SILVA, M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.8, p.4720–4726, 2004.

DE BEER, D.; HUISMAN, J. W.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; OTTENGRAF, S. P. P. The Effect of pH Profiles in Methanogenic Aggregates on the Kinetics of Acetate Conversion. **Wat. Res.** v.26, n.10, p.1329–1336, 1992.

DE CARO, P.S.; MOULOUGUI, Z.; VAITILINGOM, G.; BERGE, J.C.H. Interest of combining an additive with diesel-ethanol blends for use in diesel engines. **Fuel**. 80, p. 565–574, 2001.

DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, n.54, p.894–904, 2007.

DIRUSSO, C. C.; BLACK, P. N.; WEIMAR, J. D. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. **Prog Lipid Res.** v.38. p.129-197. 1999.

EDWARDS, E. A.; WILLS, L. E.; REINHARD, M.; GRBIĆ-GALIĆ, D. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* v.58, n.3, p.794–800, 1992.

EVANS, P. J.; MANG, D. T.; KIM, K. S.; YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, n.4, p.1139–1145, 1991a.

EVANS, P. J.; MANG, D. T.; YOUNG, L. Y. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, n.2, p.450–454, 1991b.

FENCHEL, T.; KING, G. M.; BLACKBURN, T. H. **Bacterial Biogeochemistry**. Academic Press: London, 1998.

FERNANDES, M. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina**. Florianópolis, 2002. 213f. Tese (Doutorado em Química) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina,.

FOON, C.S.; LIANG, Y.C.; DIAN, N.L.H.M.; MAY, C.Y.; HOCK, C.C.; NGAN, M.A. Crystallisation and Melting Behavior of Methyl Esters of Palm Oil. **American Journal of Applied Sciences**. v.3, n.5, p.1859-1863. 2006.

FREEDMAN, B. Variables Affecting of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 61; n. 10; p.1638-1643; 1984.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification Kinetics of Soybean Oil; **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.63; p.1375; 1986.

FRIES, M. R.; ZHOU, J.; CHEE-SANFORD, J.; TIEDJE, J. M. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, n.8, p.2802–2810, 1994.

GIBSON, J.; HARWOOD, C. S. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. **Annual Rev. Microbiol.** v.56, p.345–369, 2002.

GILBERT, R. O. **Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1987.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de biodiesel soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos.** Florianópolis, 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina.

GRABOWSKI, A.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. **Res. Microbiol.** 156. p.814–821. 2005.

GRBIĆ-GALIĆ, D.; VOGEL, T. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** v.53, n.2, p.254–260, 1987.

GRIM, Ralph E. **Applied clay mineralogy.** New York: McGraw-Hill, 1962. 422p.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Sci. Technol.** v.15. p.127-167. 1983.

HANAKI, K.; NAGASE, M.; MATSUO, T. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. **Biotechnol Bioeng.** v.23. p.1591–1610. 1981.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **Eur. J. Biochem.** v.243, n.3, p.577–596, 1997a.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Microbial anaerobic aromatic metabolism. **Anaerobe**. v.3, n.1, p.1–22, 1997b.

HEIMANN, A.; JAKOBSEN, R.; BLODAU, C. Energetic Constraints on H₂-Dependent Terminal Electron Accepting Processes in Anoxic Environments: A Review of Observations and Model Approaches. **Environ. Sci. Technol.** v.44, p. 24–33. 2010.

HVORSLEV, M. J. Time lag and soil permeability in ground water observations. **Bulletin Army Corps of Engineers Waterway Experimentation Station**. U.S. n. 36, 1951.

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUNB, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. **Journal of Biotechnology**. v.111, n.3, p.297–309, 2004.

JARAMILLO, I. R. **Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência del suelo. Parte 1**. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 1996.

JERIS, J. S.; MCCARTY, P. L. The biochemistry of methane fermentation using C14 tracers. **J. Water Pollut. Control Fed.** v.37, n.2, p.178-192. 1965.

KAIPPER. B. I. A. **Influência do Etanol na Solubilidade de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados por Óleo Diesel**. Florianópolis, 2003. 179f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

KANE, S. R.; BELLER, H. R.; LEGLER, T. C.; ANDERSON, R. T. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. **Biodegradation**. v.13, n.2, p.149–154, 2002.

KIM, I. S.; HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUNB, S. H.; LEE, S. T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.29, n.11, p.1133–1140, 2004.

KIM, J.; CORAPCIOGLU, M. Y. Modeling dissolution and volatilization of NAPL sources migrating on the groundwater table. **Journal of Contaminant Hydrology**, Texas, v.65, n.1-2, p.137-158, 2003.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**. n.86, p.1059-1070. 2005.

KOCH, J.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; FUCHS, G. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. **Eur. J. Biochem**. v.211, n.3, p.649–661, 1993.

KRIEGER, C. J. Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus sp.* strain T. **J. Bacteriol**. v.181, n.20, p.6403–6410, 1999.

KROP, H.B.; VELZEN, M.J.M.V.; PARSONS, J.R.; GOVERS, H.A.J. n-Octanol-Water Partition Coefficients, Aqueous Solubilities and Henry's Law Constants of Fatty Acid Esters. **Chemosphere**. v.34, n.1, p.107-119. 1997.

LAGE, I.C. **Avaliação de metodologias para determinação da permeabilidade em meios porosos: a área experimental da Fazenda Ressacada, SC**. Rio de Janeiro, 2005. 119p. Dissertação (Mestrado em Geociências). Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LALMAN, J. A. **Anaerobic degradation of linoleic (C18:2), oleic (C18:1) and stearic (C18:0) acids and their inhibitory effects on acidogens, acetogens and methanogens.** PhD Thesis, University of Toronto, Canada. 2000.

LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. **Water Res.** v.34, p.4220-4228. 2000.

LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. **Water Research.** v.35, n.12, p.2975-2983. 2001.

LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. **Water Res.** v.36, p.3307-3313. 2002.

LAPINSKIENÈ, A.; MARTINKUS, P.; RÈBZDAITÈ, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution.** n.142, p.432-437. 2006.

LEAMER, R.W.; SHAW, B. A simple apparatus for measuring noncapillary porosity an extensive scale. **J. Am. Soc. Agrom.**,v.33, p.1003-1008, 1941.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry.** 2.ed. New York: Worth Publishers, Inc., 1993. 1013p.

LENGELER, W. J.; DREWS, G.; SCHLEGEL, H. G. **Biology of prokaryotes.** Malden, MA: Blackwell Science, Inc. 1999.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B.C.P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology.** n.97, p.250-256. 2005.

LEUTHNER, B.; LEUTWEIN, C.; SCHULZ, H.; HORTH, P.; HAEHNEL, W.; SCHILTZ, E.; SCHAGGER, H.; HEIDER, J. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. **Mol. Microbiol.** v.28, n.3, p.615–628, 1998.

LOVLEY, D. R.; LONERGAN, D. J. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. **Appl. Environ. Microbiol.** v.56, n.6, p.1858–1864, 1990.

LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology**, v.18, p.75-81. 1997.

MAH, R. A.; WARD, D. M.; BARESI, L.; GLASS, T. L. Biogenesis of methane. **Ann. Rev. Microbiol.** v.31, p.309-341. 1977.

McCARTY, P. L. **Energetics and bacterial growth**. Presented at the 5th Rudolf Research Conference, Rutgers, the State University, New Brunswick, NJ. 1969.

MECKENSTOCK, R.U.; ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; RICHNOW, H.H.; SCHINK, B. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, n.7, p.2743–2747, 2000.

MENES, R. J.; FERNANDEZ, A.; MUXI, L. Physiological and molecular characterization of an anaerobic thermophilic oleate-degrading enrichment culture. **Anaerobe.** v.7, p.17–24. 2001.

MILLER, N. J.; MUDGE, S. M. The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. **Spill Science and Technology Bulletin**, v.4, p.17-33, 1997.

MORAES, E. M.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; ADORNO, M. A. T. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios. In: CHERNICHARO, C. A. L. (coord.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos**. Belo Horizonte: PROSAB. p. 35-39. 2001.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, vol. 15, p. 209-232. 1983.

NDIAYE, P.M.; FRANCESCHI, E.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C.; TAVARES, F.W.; OLIVEIRA, J.V. Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**. v.37, n.1, p.29-37. 2006.

NEWELL, C.J.; ACREE, S.D.; ROSS, R.R.; HULING, S.G. **Light Nonaqueous Phase Liquids**. U.S.EPA. Ground water Issue, EPA/540/S-95/500. 1995.

NIST- National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=112-63-0&Units=SI&cMS=on>>. Acesso em março 2008.

NOVAK, J. T.; CARLSON, D. A. Kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. **J Water Pollut Control Fed**. v.42, p. 1932-1943. 1970.

NUCK, B. A.; FEDERLE, T. W. Batch test for assessing the mineralization of C-14-radiolabeled compounds under realistic anaerobic conditions. **Environ Sci Technol**. v.30, p. 3597-3603. 1996.

NUNES, C.C. **Dinâmica da variação dos receptores de elétrons e subprodutos metabólicos em águas subterrâneas impactadas por derramamento de gasolina com etanol.** Florianópolis, 2006. 244f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina.

NUNES, C.C.; CORSEUIL, H.X. Importância do Etanol na Atenuação do Etanol na Atenuação Natural de Águas Subterrâneas Impactadas por Gasolina. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, vol.12, no.3, p.259-265, set 2007.

NUNN, W. D. A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.** v.50, p. 179 - 192. 1986.

OLIVEIRA, J.C.S. **Contaminação de sedimentos argilosos por combustíveis automotivos. Problema de avaliação da permeabilidade.** Salvador, 2001. 204f. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado.** Fortaleza: Unigráfica, 2003.

PELLETIER, D. A.; HARWOOD, C. S. 2-Ketocyclohexanecarboxyl Coenzyme A Hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. **J. Bacteriol.** v.180, n.9, p.2330–2336, 1998.

PHELPS, T. J.; ZEIKUS, J. G. Influence of pH on Terminal Carbon Metabolism in Anoxic Sediments from a Mildly Acidic Lake. **Applied and Environmental Microbiology.** v.48, n.6, p.1088–1095, 1984.

PHELPS, C. D.; ZHANG, X.; YOUNG, L. Y. Use of stable isotopes to identify benzoate as a metabolite of benzene degradation in a sulphidogenic consortium. **Environ. Microbiol.** v.3, n.9, p.600–603, 2001.

POSTGATE, J. R. **The Sulfate-Reducing Bacteria.** Cambridge University Press, Cambridge, England. 1984.

POWERS, S. E.; McDOWELL, C. J. Infiltration and distribution of ethanol and ethanol blended gasoline in vadose zone. **Environ. Sci. Technol.** v. 37, p.1803-1810, 2003.

PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere.** n.71, p.1446-1451. 2008.

RABERS, R.; HANSEN, T.; WIDDEL, F. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (eds). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community.** New York: Springer-Verlag. 2000.

RABUS, R.; NORDHAUS, R.; LUDWIG, W.; WIDDEL, F. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, n.5, p.1444–1451, 1993.

RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Arch. Microbiol.** v.170, n.5, p.377–384, 1998.

RALSTON, A. W.; HOERR, C. W. The solubilities of the normal saturated fatty acids. **J. Organic Chem.** v. 7, p. 546–555. 1942.

RAMOS, L.P.; DOMINGOS, A.K.; KUCEK, K.T.; WILHELM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.28-37. 2003.

RATLEDGE, C. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: RATLEDGE, C. (ed.). **Biochemistry of Microbial Degradation**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. Chapter 4.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.61, n.2, p.262-280. 1997.

SCHINK, B., STAMS, A. J. M. Syntrophism among prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (eds). **The Prokaryotes** (electronic 3rd ed). New York, USA: Springer Verlag, 2002.

SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.55, p.29-56, 2002.

SCHWARZENBACH, R.P., GSCHWEND, P.M., IMBODEM, D.M. **Environmental Organic Chemistry**. 2ª Ed. Wiley Interscience. NY, 2003. 1313p.

SCIENCE LAB.COM - Chemicals and Laboratory Equipment. **Material Safety Data Sheet**. Disponível em: <http://www.sciencelab.com/xMSDS-Methyl_linolenate-8363>. Acesso em março 2008.

SERUYA, H. **Óleos Vegetais**. In: XXXI Congresso Brasileiro de Química. Curso. Recife; [s.n.]; 1991.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Local/SA_Splash.html>. Acesso em março 2008.

SINGLETON, R. The sulfate-reducing bacteria: an overview. In: ODOM, J. M.; SINGLETON, R. (eds). **The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives**. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 1-20.

SMITH, P. H.; MAH, R. A. Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. **Applied Microbiology**. v.14. p.368-371. 1966.

SOUSA, D. Z. **Ecology and Physiology of Anaerobic Microbial Communities that Degrade Long Chain Fatty Acids**. PhD Thesis, Universidade do Minho, Portugal. 2006.

SOUSA, D. Z.; PEREIRA, M. A.; STAMS, A. J. M.; ALVES, M. M.; SMIDT, H. Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long chain fatty acids (LCFA). **Appl Environ Microb**. v. 73, p. 1054–1064. 2007.

SOUSA, D. Z.; ALVES, J. I.; ALVES, M. M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. M. Effect of sulfate on methanogenic communities that degrade unsaturated and saturated long-chain fatty acids (LCFA). **Environ Microbiol**. v.11, p.68–80. 2009a.

SOUSA, D. Z.; SMIDT, H.; ALVES, M. M.; STAMS, A. J. M. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 68, p. 257–272. 2009b.

STAMS, A. J. M.; DE BOK, F. A. M.; PLUGGE, C. M.; VAN EEKERT, M. H. A.; DOLFING, J.; SCHRAA, G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. **Environ. Microbiol**. 8. 371-382. 2006.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 780p.

TAYLOR, L.T.; JONES, D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. **Chemosphere**, v.44, n.5, p.1131-1136, 2001.

TGSC - The Good Scents Company. Disponível em:

<<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1477771.html>>.

Acesso em março 2008.

THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy conservation in chemotropic anaerobic bacteria. **Bacteriol Rev.** 41. 100–180. 1977.

TOXNET – Toxicology Data Network. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB)**. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>. Acesso em março 2008.

TPHCWG – TOTAL PETROLEUM HYDROCARBON CRITERIA WORKING GROUP. **Selection of Representative TPH fractions based on fate and transport considerations**. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, v. 3. Amherst Scientific Publishers, 1997.

TSAI, J.-C.; KUMAR, M.; LIN, J.-G. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. **J. Hazard. Mater.** v.164, n.2–3, p.847–855, 2009.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu. Roteiro das Energias Renováveis. Energias Renováveis no Século XXI: construir um futuro mais sustentável. COM(2006) 848. Bruxelas, 10 de janeiro de 2007. **Lex:** EUR-Lex. Acesso ao direito da União Europeia. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0848:FIN:PT:PDF>

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Aerobic Aquatic Biodegradation**. 40 C.F.R. Chapter 1, Subpart D, Section 796.3100. Washington, D.C. 1992.

_____. **Choosing the correct procedure**. Chapter two, 1996 a. CD-ROM.

_____. Office of Emergency and Remedial Response. **Soil Screening Guidance: Technical Background Document**. EPA/540/R-95/128. Washington, D.C. 1996b.

_____. Office of Underground Storage Tanks. **Expedited Site Assessment Tools For Underground Storage Tank Sites - A Guide For Regulators**. Washington, March 1997.

_____. Region 1. **Technical Guidance for the Natural Attenuation Indicators: Methane, Ethane, and Ethene**. New England, July 2001.

VIANI, R.; BRAZ-FILHO, R.. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Quim. Nova**, 19, 400, 1996.

WENG, C. N.; JERIS, J. S. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. **Water Research**, v.10, p.9-18. 1976.

WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfurreducing bacteria. In: ZEHNDER, A. J. B. **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1988. p. 469–585.

WIEDEMEIER, T.H.; RIFAI, H.S.; NEWELL, C.J.; WILSON, J.T. **Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999. 617p.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. **ASM News**. v.48. p.561-565. 1982.

ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; HAWS, R. & MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Trans. ASAE**, v. 41, p.1423-1430, 1998.

ZEHNDER, A. J. B. Ecology of methane formation. In: MITCHELL, R. (ed.). **Water Pollution Microbiology**. New York: Wiley & Sons, 1978. Vol. 2, Chapter 13, p. 349–376.

ZENGLER, K.; HEIDER, J.; ROSSELLÓ-MORA, R.; WIDDEL, F. Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. **Arch. Microbiol.** v.172, n.4, p.204–212, 1999.

ZINDER, S. H. Physiological ecology of methanogens. In: FERRY, J. G. **Methanogens: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics**. London/New York: Chapman & Hall, 1993. P. 128-206.

APÊNDICES

Incorporam este item os seguintes conjuntos de documentos:

APÊNDICE A – Variação das concentrações detectadas no experimento com B100, por profundidade e ao longo do tempo.....	160
APÊNDICE B – Variação das concentrações detectadas no experimento com B20, por profundidade e ao longo do tempo.....	166
APÊNDICE C – Reações de oxidação-redução para consumo de acetato segundo o modelo energético de biodegradação de McCarthy.....	175
APÊNDICE D – Determinação das concentrações de acetato transformadas nos diferentes processos redox.....	184

APÊNDICE A – Variação das concentrações detectadas no experimento com B100, por profundidade e ao longo do tempo.

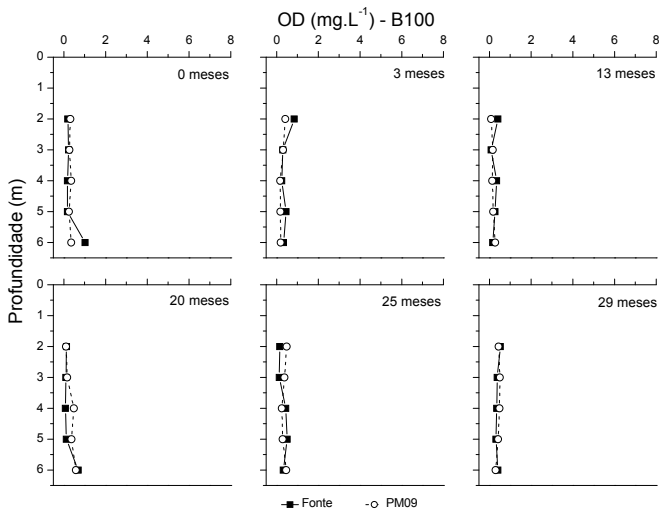


FIGURA A 1 – Variação vertical das concentrações de oxigênio detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

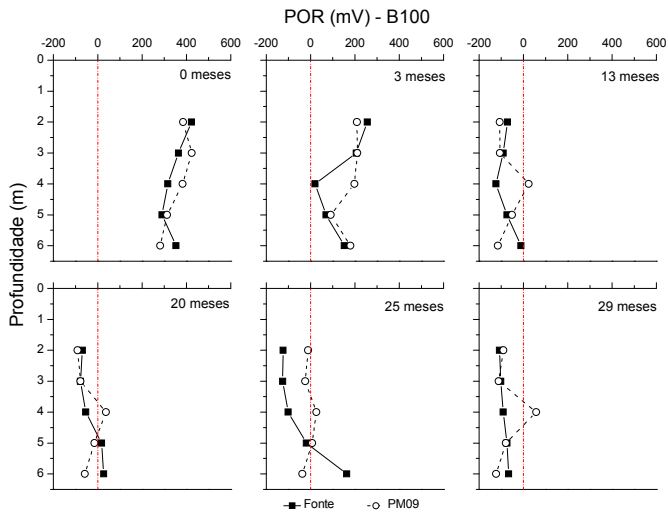


FIGURA A 2 – Variação vertical do potencial de oxidação-redução medido no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

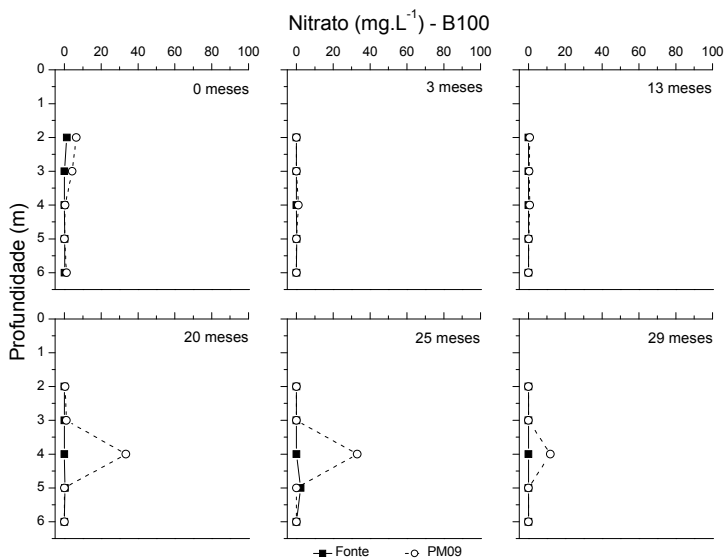


FIGURA A 3 – Variação vertical das concentrações de nitrato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

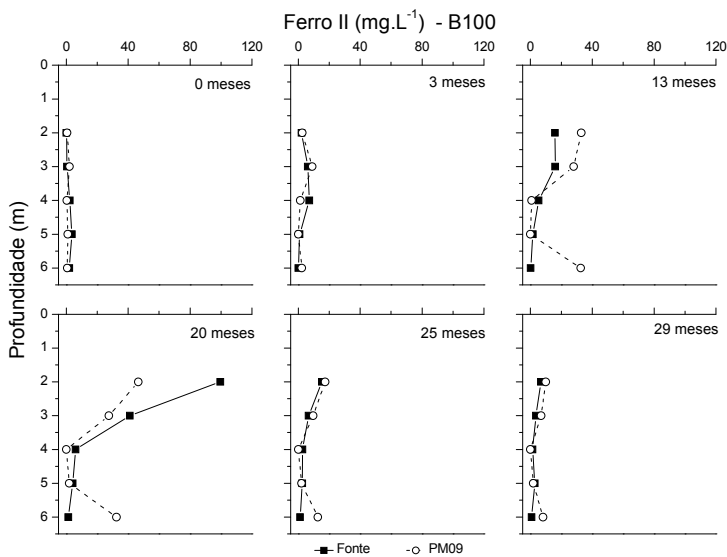


FIGURA A 4 – Variação vertical das concentrações de ferro II detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

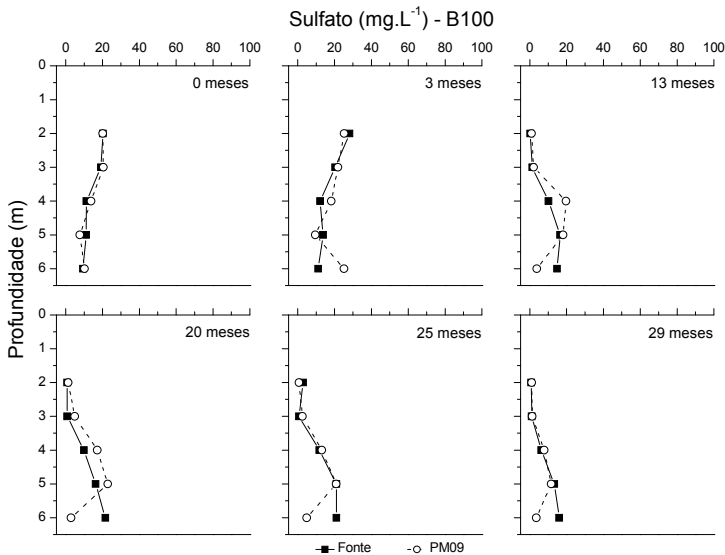


FIGURA A 5 – Variação vertical das concentrações de sulfato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

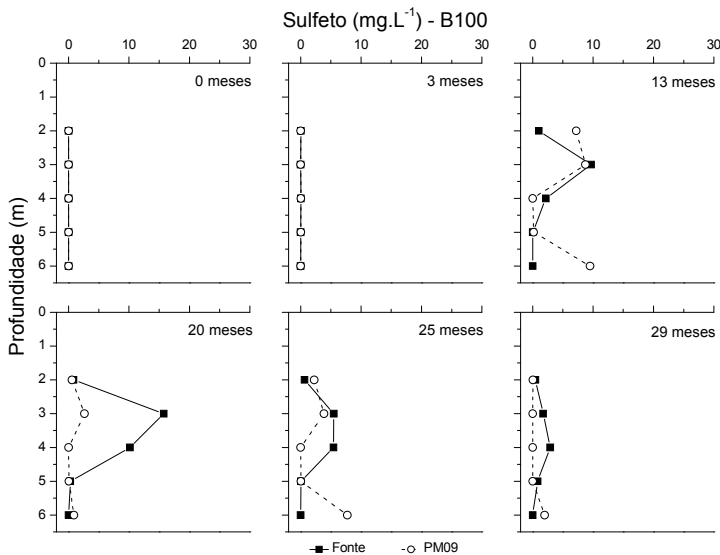


FIGURA A 6 – Variação vertical das concentrações de sulfeto detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

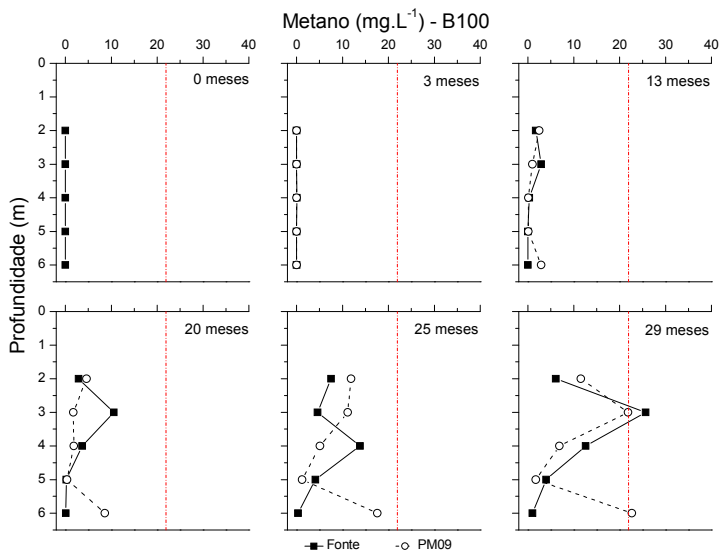


FIGURA A 7 – Variação vertical das concentrações de metano detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

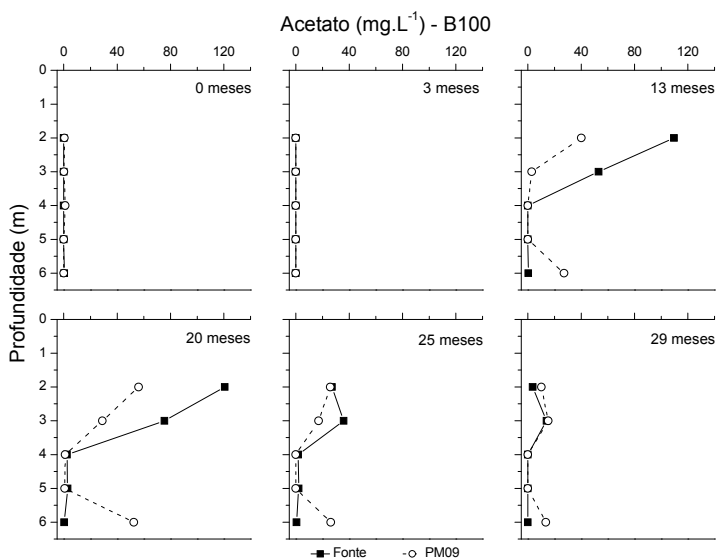


FIGURA A 8 – Variação vertical das concentrações de acetato detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

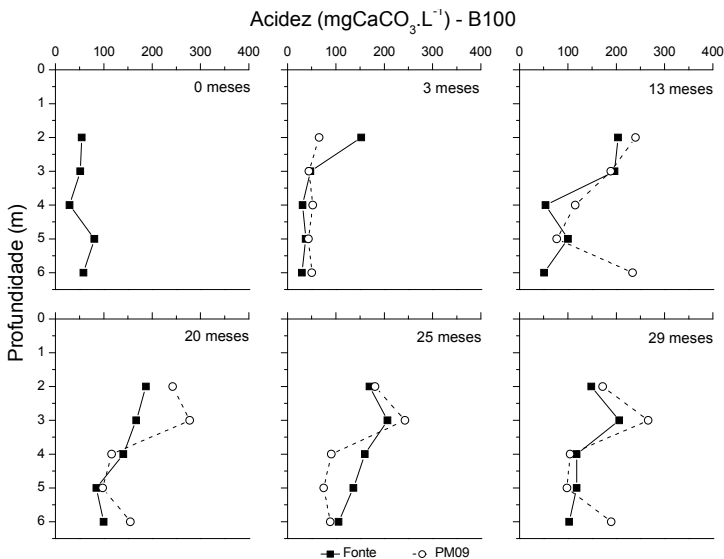


FIGURA A 9 – Variação vertical das concentrações representativas de acidez detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

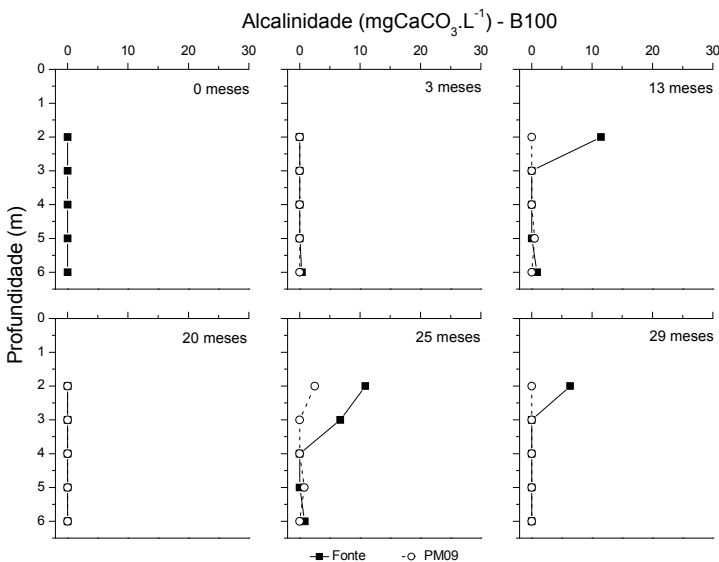


FIGURA A 10 – Variação vertical das concentrações representativas de alcalinidade detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

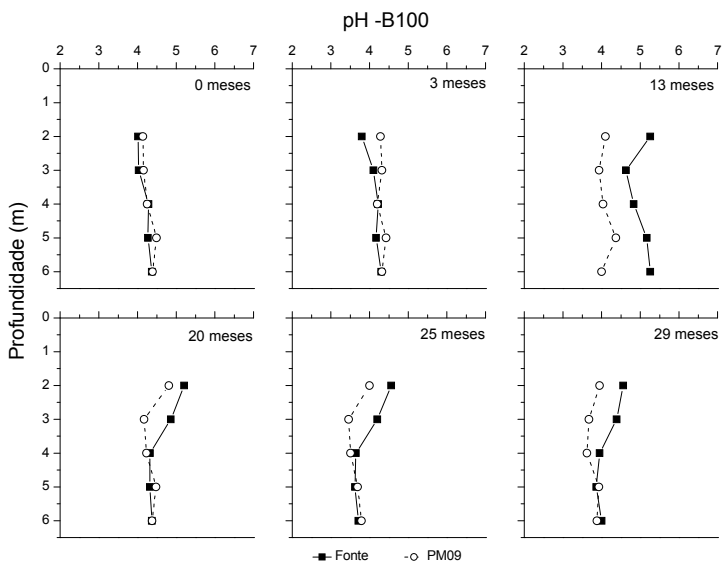


FIGURA A 11 – Variação vertical do pH detectado no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

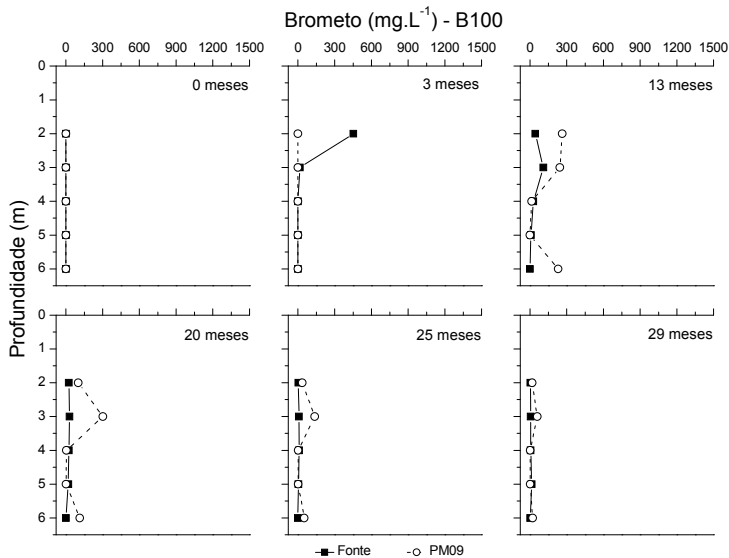


FIGURA A 12 – Variação vertical das concentrações de brometo detectadas no experimento com B100, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

APÊNDICE B – Variação das concentrações detectadas no experimento com B20, por profundidade e ao longo do tempo.

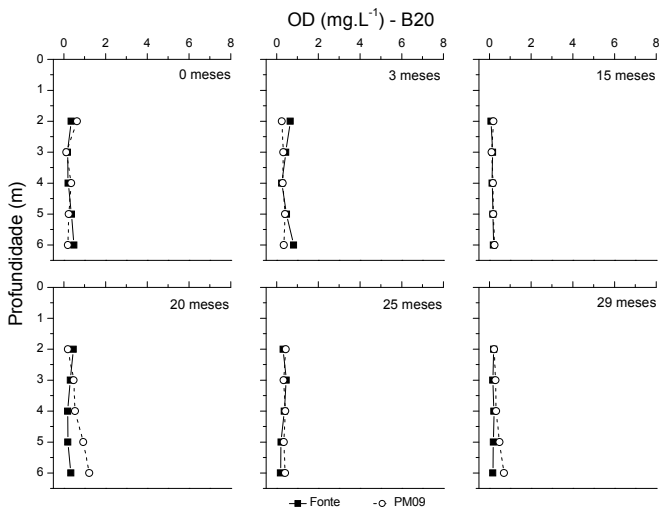


FIGURA B 1 – Variação vertical das concentrações de oxigênio detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

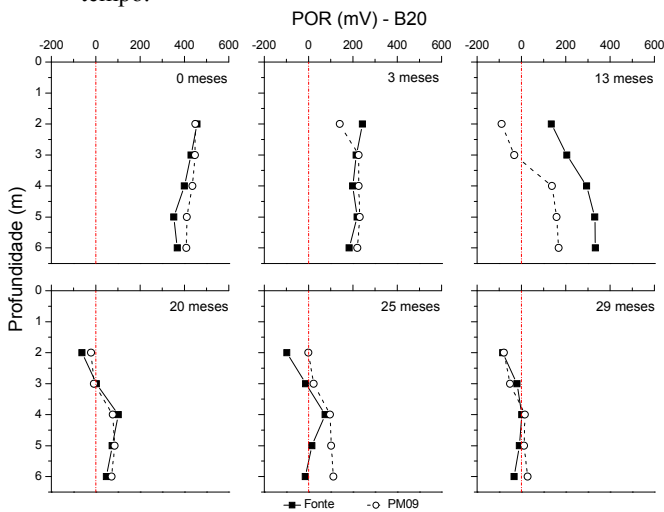


FIGURA B 2 – Variação vertical do potencial de oxidação-redução medido no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

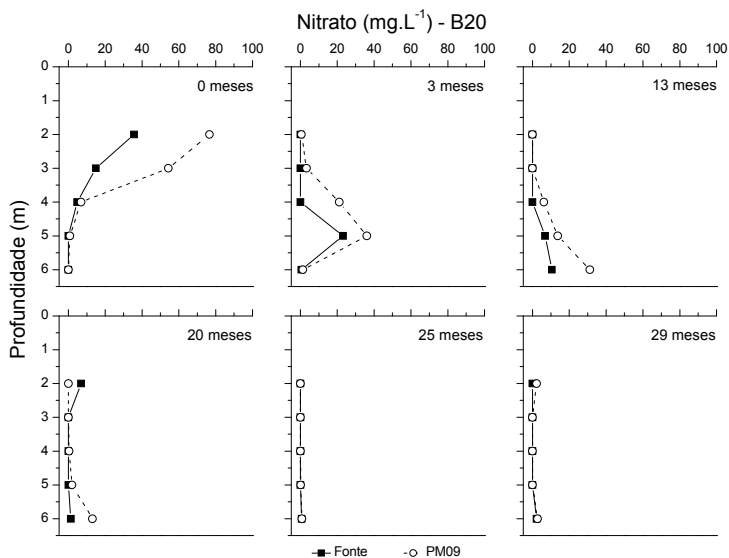


FIGURA B 3 – Variação vertical das concentrações de nitrato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

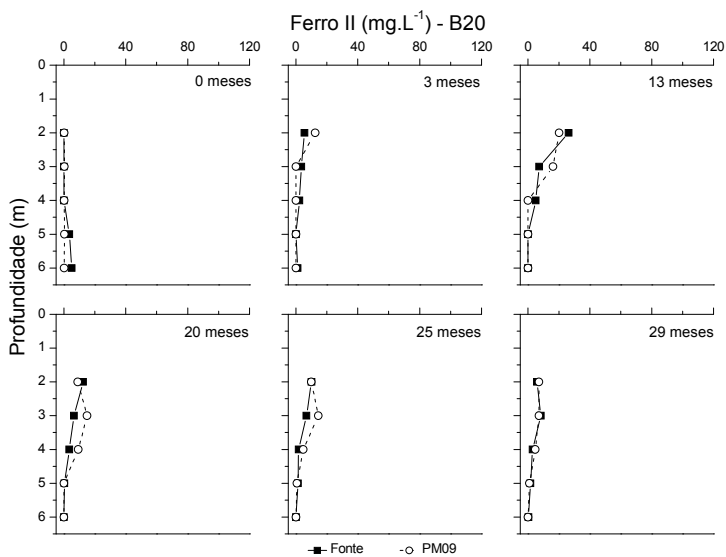


FIGURA B 4 – Variação vertical das concentrações de ferro II detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

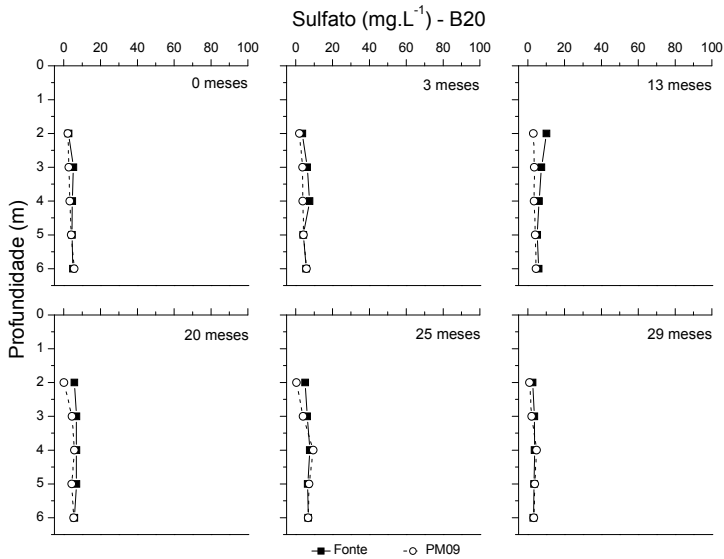


FIGURA B 5 – Variação vertical das concentrações de sulfato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

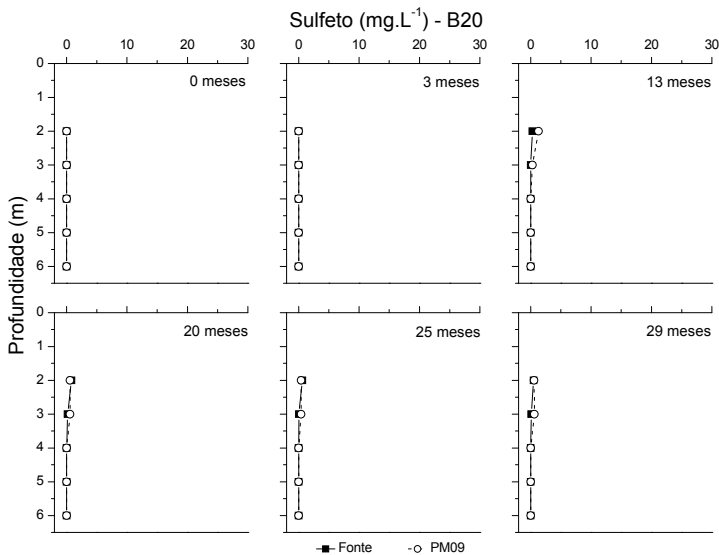


FIGURA B 6 – Variação vertical das concentrações de sulfeto detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

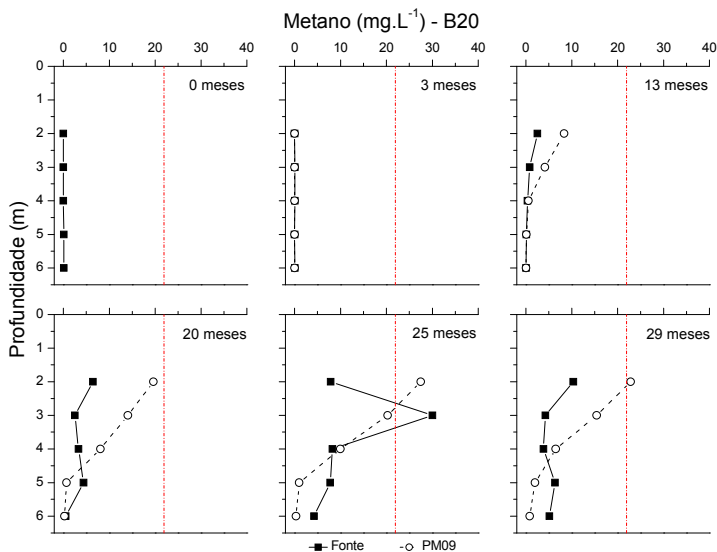


FIGURA B 7 – Variação vertical das concentrações de metano detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

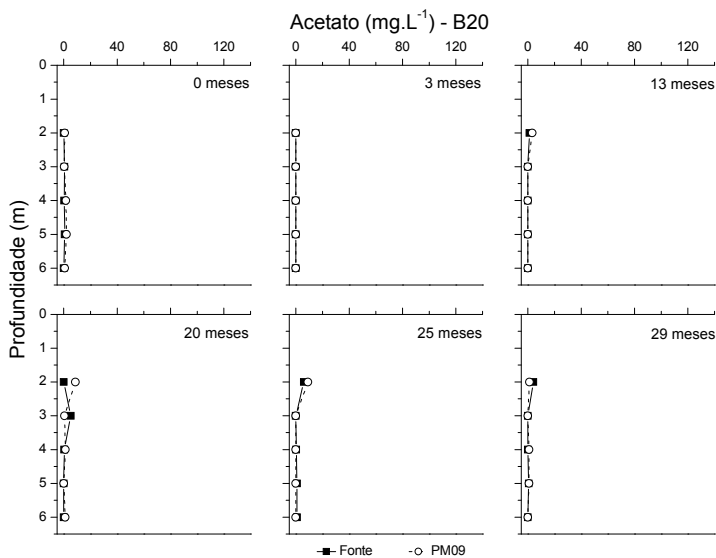


FIGURA B 8 – Variação vertical das concentrações de acetato detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

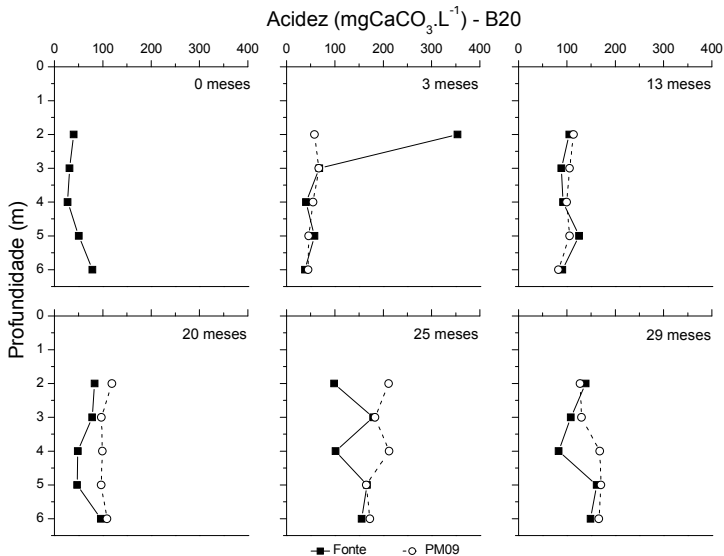


FIGURA B 9 – Variação vertical das concentrações representativas de acidez detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

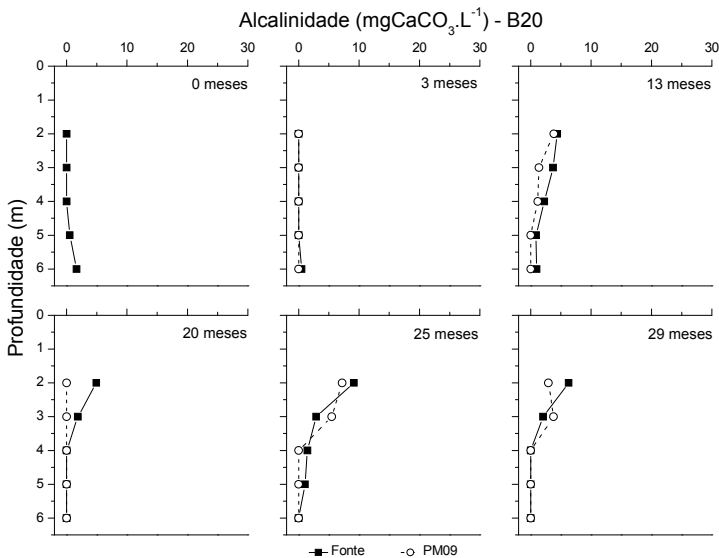


FIGURA B 10 – Variação vertical das concentrações representativas de alcalinidade detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

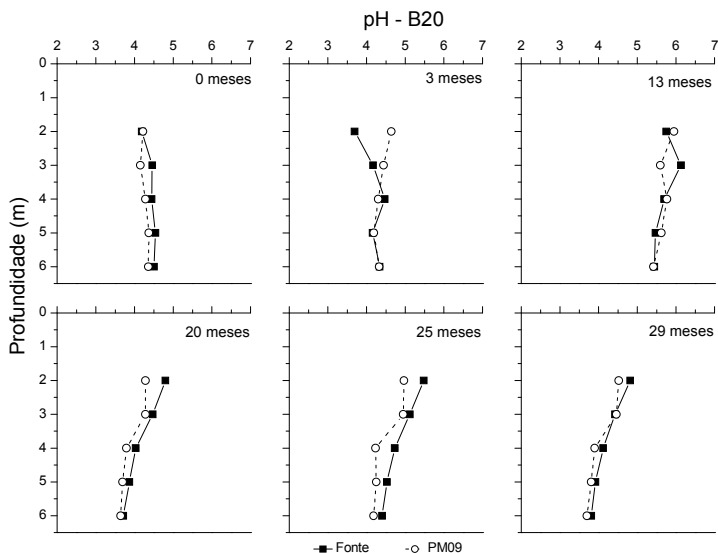


FIGURA B 11 – Variação vertical do pH detectado no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

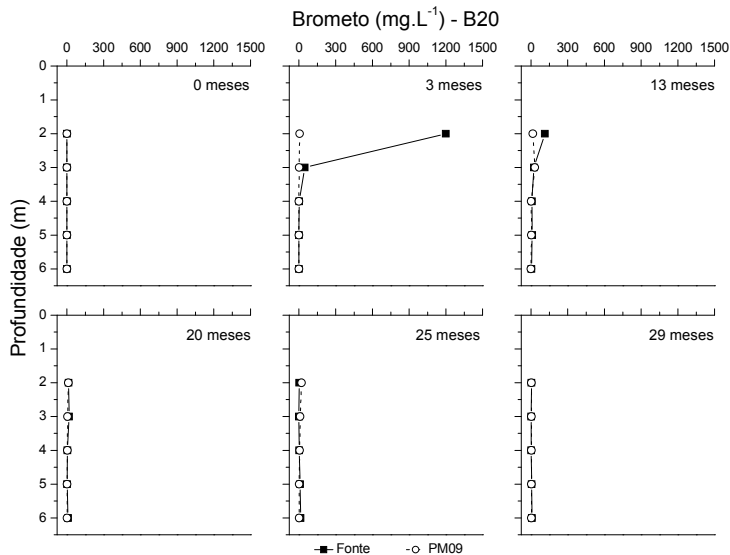


FIGURA B 12 – Variação vertical das concentrações de brometo detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

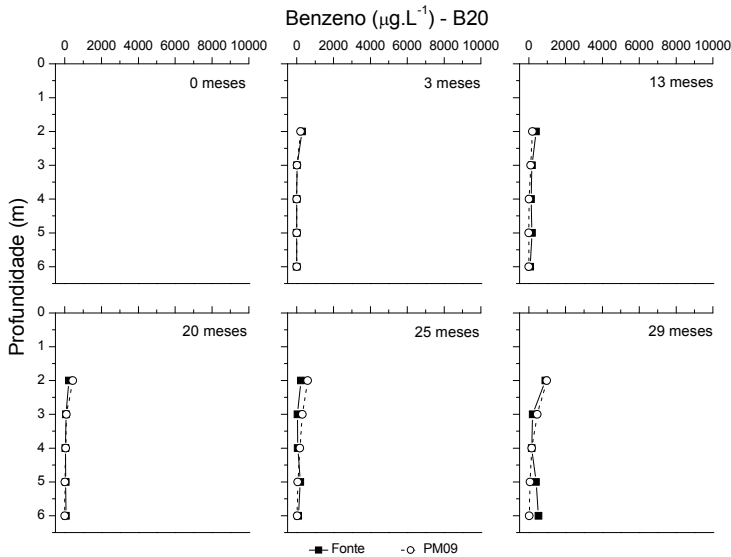


FIGURA B 13 – Variação vertical das concentrações de benzeno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

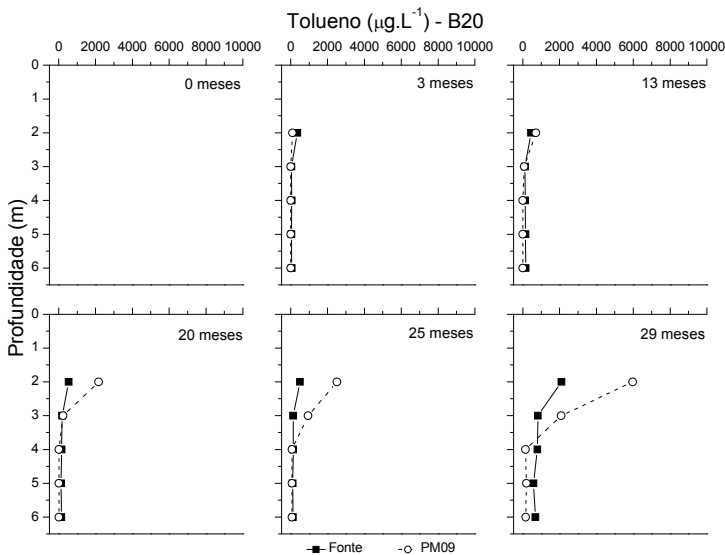


FIGURA B 14 – Variação vertical das concentrações de tolueno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

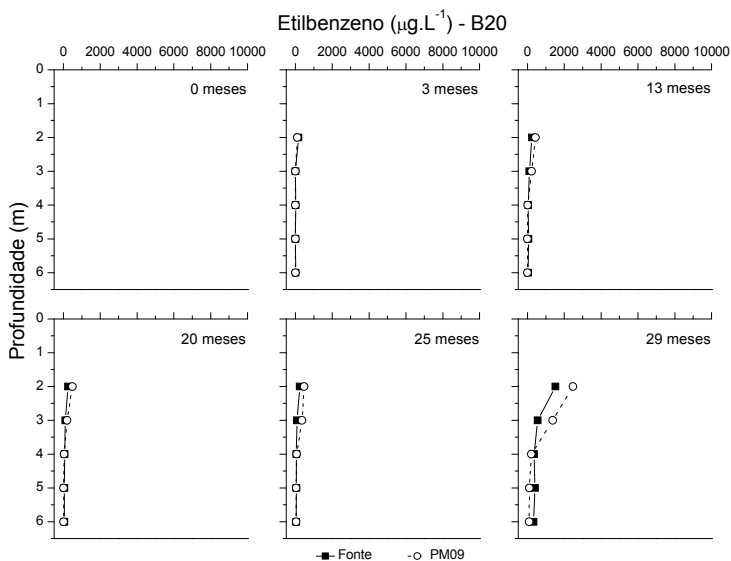


FIGURA B 15 – Variação vertical das concentrações de etilbenzeno detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

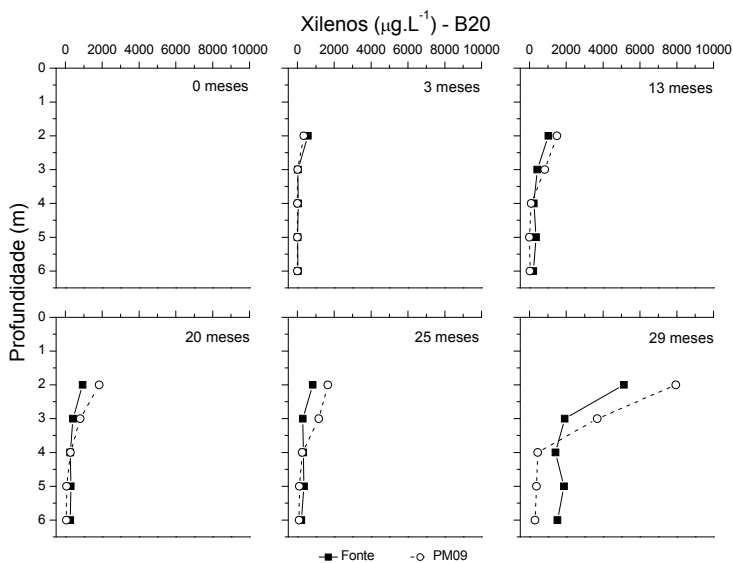


FIGURA B 16 – Variação vertical das concentrações de xilenos detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

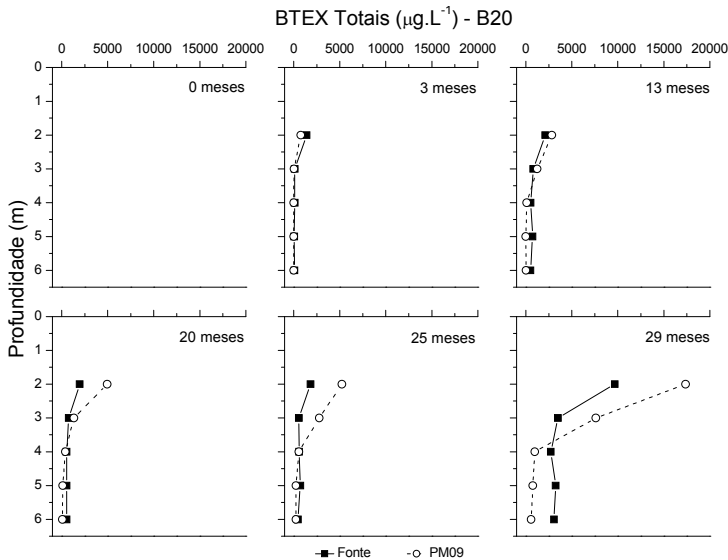


FIGURA B 17 – Variação vertical das concentrações de BTEX totais detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

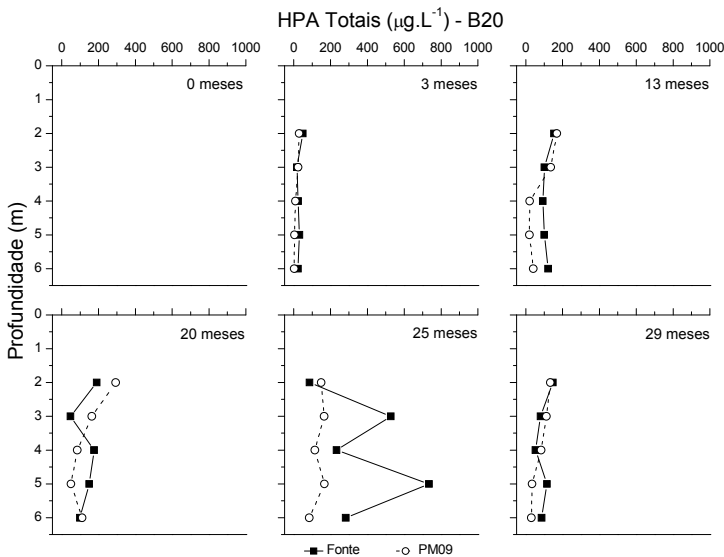


FIGURA B 18 – Variação vertical das concentrações de HPA totais detectadas no experimento com B20, nos poços Fonte e PM09, ao longo do tempo.

APÊNDICE C – Reações de oxidação-redução para consumo de acetato segundo o modelo energético de biodegradação de McCarty.

O modelo energético de biodegradação desenvolvido por McCarty (1969) considera que quando os microrganismos usam um substrato doador de elétrons, uma porção destes elétrons é transferida ao receptor para gerar energia e a outra, para a síntese de novas células. Deste modo, pode-se estimar a quantidade de produtos finais produzidos na degradação de contaminantes orgânicos, assim como a quantidade de biomassa gerada. A equação geral que representa a biodegradação é dada por:

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d, \quad (C.1)$$

Em que a fração f_e representa a parte do doador de elétrons que é transferida para o receptor de elétrons (produção de energia) e f_s representa a parte do doador de elétrons destinada à formação das células microbianas (síntese celular). Também estão envolvidas três meias-reações: a do receptor de elétrons (R_r), a de síntese celular (R_c) e a do doador de elétrons (R_d), que podem ser visualizadas na TABELA C.1.

Os valores de f_e e f_s podem ser determinados com o emprego da seguinte equação:

$$f_s = 1 - f_e = \frac{1}{1+A}, \quad (C.2)$$

Em que A representa a quantia de equivalentes de elétrons do doador a serem oxidados para produzir energia por equivalentes de células formadas, e é representado matematicamente por:

$$A = - \frac{\frac{\Delta G_p}{\varepsilon^n} + \frac{\Delta G_{pc}}{\varepsilon}}{\varepsilon \Delta G_r}, \quad (C.3)$$

Em que ΔG_p representa a energia requerida para converter a fonte de carbono em um intermediário orgânico e é calculada pela diferença entre as energia das meias-reações do intermediário e do doador de elétrons. Como intermediário representativo, geralmente, utiliza-se o piruvato. Conforme o sinal de ΔG_p , o expoente n assume diferentes valores. Para um ΔG_p positivo, n é igual a +1, e para o caso contrário, n

vale -1. A energia necessária para transformação do piruvato em carbono celular é ΔG_{pc} . Deve-se levar em conta que parte da energia é perdida nas transferências de elétrons, sendo esta perda considerada pelo termo ϵ , que representa a eficiência na transferência de energia. Normalmente, adota-se um valor de 0.6 para ϵ . O termo ΔG_r representa a energia liberada por equivalente do doador oxidado e é obtida pela diferença das energias livres das meias-reações do doador de elétrons e do receptor de elétrons (RITTMANN e MCCARTY, 2001⁶).

TABELA C.1 – Meias-reações de síntese celular (R_c), dos receptores de elétrons (R_r) e dos doadores de elétrons (R_d).

<i>MEIAS-REAÇÕES</i>	<i>ΔG° (kJ por elétron equivalente)</i>
Reações para a síntese celular (R_c)	
Amônio como fonte de nitrogênio $1/5 \text{ CO}_2 + 1/20 \text{ HCO}_3^- + 1/20 \text{ NH}_4^+ + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/20 \text{ C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 9/20 \text{ H}_2\text{O}$	*
Reações para os receptores de elétrons (R_r)	
Oxigênio $1/4 \text{ O}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	-78,72
Nitrato $1/5 \text{ NO}_3^- + 6/5 \text{ H}^+ + \bar{e} = 1/10 \text{ N}_2 + 3/5 \text{ H}_2\text{O}$	-72,20
Fe (III) $\text{Fe}^{3+} + \bar{e} = \text{Fe}^{2+}$	-74,27
Sulfato $1/8 \text{ SO}_4^{2-} + 19/16 \text{ H}^+ + \bar{e} = 1/16 \text{ H}_2\text{S} + 1/16 \text{ HS}^- + 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	20,85
Dióxido de carbono $1/8 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/4 \text{ H}_2\text{O}$	23,53
Reações para os doadores de elétrons (R_d)	
Acetato $1/8 \text{ CO}_2 + 1/8 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 3/8 \text{ H}_2\text{O}$	27,40
Piruvato $1/5 \text{ CO}_2 + 1/10 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \bar{e} = 1/10 \text{ CH}_3\text{COCOO}^- + 2/5 \text{ H}_2\text{O}$	35,09

Nota: *Reação sem ΔG° porque as espécies reduzidas não são quimicamente definidas.

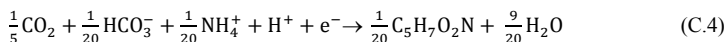
FONTE: Rittmann e McCarty (2001).

⁶ RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental Biotechnology: Principles and Applications**. New York: McGraw-Hill, 2001.

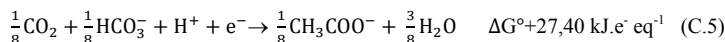
CÁLCULOS

Respiração aeróbia:

- Reação de síntese celular utilizando o amônio como fonte de nitrogênio (R_c):



- Reação para o doador de elétrons íon acetato (R_d):



- Reação para produção de energia utilizando o oxigênio como receptor de elétrons (R_r):



- Cálculo de A :

- $\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (35,09) - (27,40) = +7,69 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\Delta G_{pc} = +18,8 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$, quando a fonte de nitrogênio é amônia;
- $\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(oxigênio)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (-78,72) - (27,40) = -106,12 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\varepsilon = 0,6$;
- $n = +1$ ($\Delta G_p > 0$).

Assim:

$$A = -\frac{\frac{7,69}{0,6^1} + \frac{18,80}{0,6}}{0,6 \cdot (-106,12)} \Rightarrow A = 0,69$$

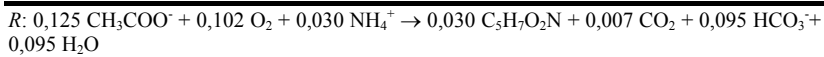
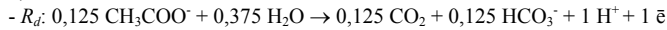
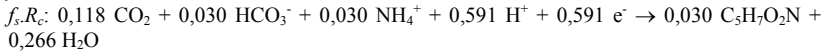
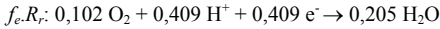
- Para o cálculo de f_s e f_e :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 0,69} \Rightarrow f_s = 0,59$$

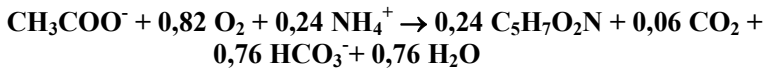
$$f_s = 1 - f_e \Rightarrow f_e = 0,41$$

- Cálculo de R :

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d$$

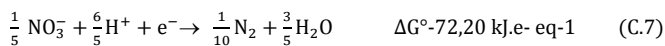


Reação geral de biodegradação do íon acetato via respiração aeróbia com formação de biomassa:



Nitrato Redução:

- R_c e R_d são as mesmas utilizadas na respiração aeróbia (C.4 e C.5, respectivamente).
- Reação para produção de energia utilizando o nitrato como receptor de elétrons (R_r):



- Cálculo de A :

- $\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (35,09) - (27,40) = +7,69 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\Delta G_{pc} = +18,8 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$, quando a fonte de nitrogênio é amônia;
- $\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(nitrato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (-72,20) - (27,40) = -99,60 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\epsilon = 0,6$;
- $n = +1$ ($\Delta G_p > 0$).

Assim:

$$A = - \frac{\frac{7,69}{0,6^1} + \frac{18,80}{0,6}}{0,6 \cdot (-99,60)} \Rightarrow A = 0,74$$

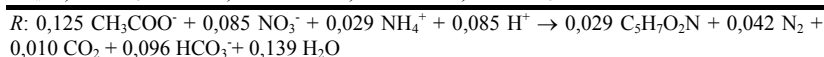
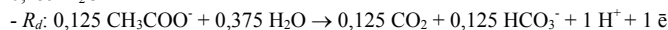
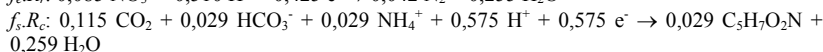
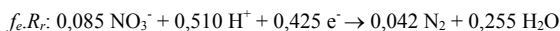
- Para o cálculo de f_s e f_e :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 0,74} \Rightarrow f_s = \mathbf{0,58}$$

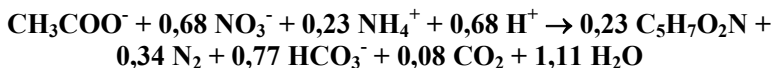
$$f_s = 1 - f_e \Rightarrow f_e = \mathbf{0,42}$$

- Cálculo de R :

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d$$

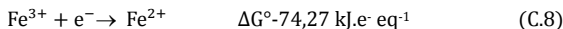


Reação geral de biodegradação do íon acetato via nitrato redução com formação de biomassa:



Ferro Redução:

- R_c e R_d são as mesmas utilizadas na respiração aeróbia (C.4 e C.5, respectivamente).
- Reação para produção de energia utilizando o ferro III como receptor de elétrons (R_r):



- Cálculo de A :

- $\Delta G_p = \Delta G^\circ_{(\text{piruvato})} - \Delta G^\circ_{(\text{acetato})} = (35,09) - (27,40) = \mathbf{+7,69 \text{ kJ.e}^{-1}}$;
- $\Delta G_{pc} = \mathbf{+18,8 \text{ kJ.e}^{-1}}$, quando a fonte de nitrogênio é amônia;
- $\Delta G_r = \Delta G^\circ_{(\text{ferro III})} - \Delta G^\circ_{(\text{acetato})} = (-74,27) - (27,40) = \mathbf{-101,67 \text{ kJ.e}^{-1}}$;
- $\varepsilon = 0,6$;
- $n = +1$ ($\Delta G_p > 0$).

Assim:

$$A = -\frac{\frac{7,69}{0,6^1} + \frac{18,80}{0,6}}{0,6 \cdot (-101,67)} \Rightarrow A = 0,72$$

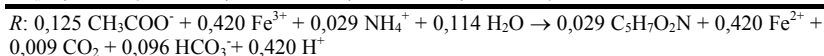
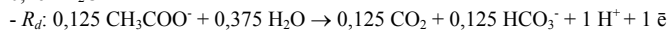
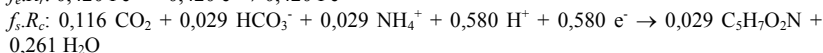
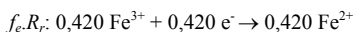
- Para o cálculo de f_s e f_e :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 0,72} \Rightarrow f_s = 0,58$$

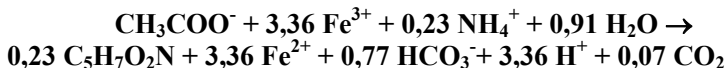
$$f_s = 1 - f_e \Rightarrow f_e = 0,42$$

- Cálculo de R :

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d$$

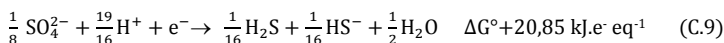


Reação geral de biodegradação do íon acetato via ferro redução com formação de biomassa:



Sulfato Redução:

- R_c e R_d são as mesmas utilizadas na respiração aeróbia (C.4 e C.5, respectivamente).
- Reação para produção de energia utilizando o sulfato como receptor de elétrons (R_r):



- Cálculo de A :

- $\Delta G_p = \Delta G^0_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^0_{\text{(acetato)}} = (35,09) - (27,40) = +7,69 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\Delta G_{pc} = +18,8 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$, quando a fonte de nitrogênio é amônia;
- $\Delta G_r = \Delta G^0_{\text{(sulfato)}} - \Delta G^0_{\text{(acetato)}} = (20,85) - (27,40) = -6,55 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\varepsilon = 0,6$;
- $n = +1$ ($\Delta G_p > 0$).

Assim:

$$A = -\frac{\frac{7,69}{0,6^1} + \frac{18,80}{0,6}}{0,6 \cdot (-6,55)} \Rightarrow A = 11,23$$

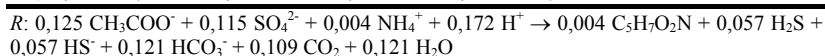
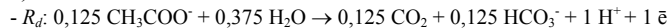
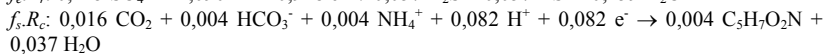
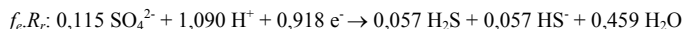
- Para o cálculo de f_s e f_e :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 11,23} \Rightarrow f_s = 0,08$$

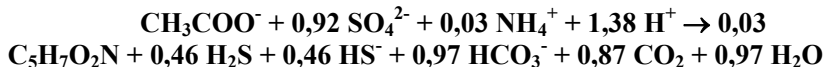
$$f_s = 1 - f_e \Rightarrow f_e = 0,92$$

- Cálculo de R :

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d$$



Reação geral de biodegradação do íon acetato via sulfato redução com formação de biomassa:



Metanogênese:

- R_c e R_d são as mesmas utilizadas na respiração aeróbia (C.4 e C.5, respectivamente).
- Reação para produção de energia utilizando o dióxido de carbono como receptor de elétrons (R_r):



- Cálculo de A :

- $\Delta G_p = \Delta G^\circ_{\text{(piruvato)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (35,09) - (27,40) = +7,69 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\Delta G_{pc} = +18,8 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$, quando a fonte de nitrogênio é amônia;
- $\Delta G_r = \Delta G^\circ_{\text{(dióxido de carbono)}} - \Delta G^\circ_{\text{(acetato)}} = (23,53) - (27,40) = -3,87 \text{ kJ.e}^- \text{ eq}^{-1}$;
- $\varepsilon = 0,6$;
- $n = +1$ ($\Delta G_p > 0$).

Assim:

$$A = -\frac{\frac{7,69}{0,6^1} + \frac{18,80}{0,6}}{0,6 \cdot (-3,87)} \Rightarrow A = 19,01$$

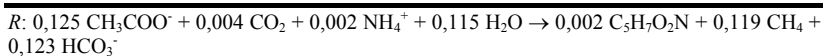
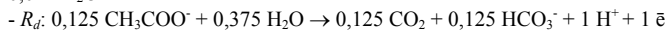
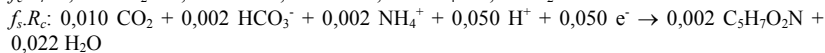
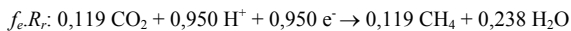
- Para o cálculo de f_s e f_e :

$$f_s = \frac{1}{1 + A} = \frac{1}{1 + 19,01} \Rightarrow f_s = 0,05$$

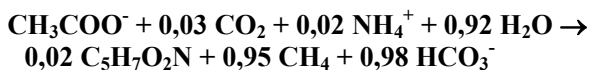
$$f_s = 1 - f_e \Rightarrow f_e = 0,95$$

- Cálculo de R :

$$R = f_e R_r + f_s R_c - R_d$$



Reação geral de biodegradação do íon acetato via metanogênese com formação de biomassa:



APÊNDICE D – Determinação das concentrações de acetato transformadas nos diferentes processos redox.

- Transformação das concentrações mássicas de receptores de elétrons e de produtos formados em concentrações molares:

$$Molaridade_{composto} = Concentração_{composto} \times \frac{1}{MM \times 1000} \quad (D.1)$$

em que:

$$\begin{aligned} Molaridade_{composto} &= \text{Concentração molar do composto [mol.L}^{-1}\text{]}; \\ Concentração_{composto} &= \text{Concentração mássica do composto [mg.L}^{-1}\text{]}; \\ MM &= \text{Massa molar do composto [g.mol}^{-1}\text{]}; \\ 1000 &= \text{Fator de correção [mg.g}^{-1}\text{]}. \end{aligned}$$

- Transformação das concentrações molares dos receptores de elétrons e dos produtos formados em concentração molar de acetato consumido:

$$M_{acetato\ consumido} = M_{composto} \times \frac{n_{acetato}}{n_{composto}} \quad (D.2)$$

em que:

$$\begin{aligned} M_{acetato\ consumido} &= \text{Concentração molar de acetato consumido [mol.L}^{-1}\text{]}; \\ M_{composto} &= \text{Concentração molar do composto [mol.L}^{-1}\text{]}; \\ n_{acetato} &= \text{Número de mols de acetato consumido [mol]}; \\ n_{composto} &= \text{Número de mols de composto [mol]}. \end{aligned}$$

- Porcentagem de participação na biodegradação do acetato atribuída a cada processo redox:

$$\%_{acetato\ consumido\ i} = \frac{M_{acetato\ consumido\ i}}{M_{acetato\ consumido\ total}} \times 100 \quad (D.3)$$

em que:

- $\% \text{ acetato consumido } i$ = Percentual de acetato consumido pelo processo i ;
 $M_{\text{acetato consumido } i}$ = Concentração molar de acetato consumido no processo i [mol.L^{-1}];
 $M_{\text{acetato consumido total}}$ = Concentração molar total de acetato consumido em todos os processos [mol.L^{-1}];

ANEXOS

Incorporam este item os seguintes conjuntos de documentos:

ANEXO A – Laudo analítico do biodiesel puro de soja utilizado nos experimentos.	189
ANEXO B – Laudo técnico das análises qualitativas feitas pelo cenpes para as amostras de combustíveis B100 e B20. .	190

ANEXO A – Laudo analítico do biodiesel puro de soja utilizado nos experimentos.



Produto: Biodiesel (rota metilica)	Volume do Lote: 1.646.000 litros
Número do Lote: B182305081	Data de produção: 18.05.2008 a 23.05.2008

Item Analítico	Unidade	Resultado BSBIOS	ANP nº 42	ASTM D6751-06	EN 14214:2003
Densidade a 15°C	g/cm3	0,885	-	-	0,86 - 0,90
Densidade a 20°C	g/cm3	0,881	-	-	-
Viscosidade a 40°C	Mm2/s	4,116	-	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
Destilação (90%)	°C	353,7	máximo 360	máximo 360	-
Ponto de Fulgor	°C	150	mínimo 100	mínimo 130	mínimo 120
Ponto de Congelamento	°C	-2	-	-	-
Enxofre	ppm	27,6	-	máximo 15	máximo 10
Resíduo de Carbono	%	0,017	-	-	máximo 0,3
Cinzas Sulfatadas	%	0,0041	máximo 0,02	máximo 0,02	máximo 0,02
Água	ppm	0,032	-	-	máximo 0,05
Água + Sedimentos	ppm	0	máximo 0,05	máximo 0,05	-
Contaminação total	ppm	8	-	-	máximo 24
Corrosividade ao cobre - 3 horas/50°C	-	1b	máximo 1	máximo 3	máximo 1
Estabilidade oxidativa	horas	7,31	mínimo 6	mínimo 3	mínimo 6
Índice de acidez	mg KOH/g	0,53	máximo 0,80	máximo 0,5	máximo 0,5
Metanol	%	0,17	máximo 0,50	-	máximo 0,20
Teor de ésteres	%	***	-	-	mínimo 96,5
Monoglicerídeo	%	0,7539	-	-	máximo 0,8
Diglicerídeo	%	0,2251	-	-	máximo 0,20
Triglicerídeo	%	0,1439	-	-	máximo 0,20
Glicerol livre	%	0,0095	máximo 0,02	máximo 0,02	máximo 0,02
Glicerol total	%	0,2534	máximo 0,38	máximo 0,24	máximo 0,25
Índice de iodo	-	130,8	-	-	máximo 120
Ácido linolênico	%	6,66	-	-	máximo 12
Ésteres insaturados (Cx:4)	%	0,2	-	-	máximo 1
Fósforo	ppm	< 0,001	-	máximo 10	máximo 10
Na + K	ppm	5,16	máximo 10	máximo 5	máximo 5
Ca + Mg	ppm	0,124	-	-	máximo 5

VERIFICADO
 Controle de Qualidade
BSBIOS


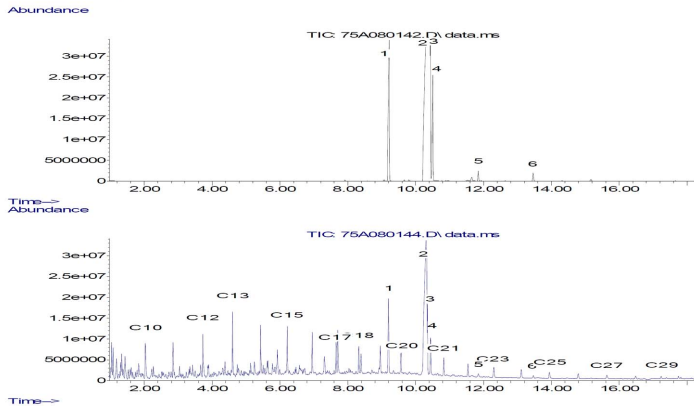
Larisse Garibotti
 Larisse Garibotti

Laudo emitido em: 23.05.2008

CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D

Controle de Qualidade - BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A

BR 285, km 174, s/nº - Distrito Industrial - Passo Fundo - Rio Grande do Sul - (0xx54)2103-7100 - www.bsbios.com

 PETROBRAS PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO LEOPOLDO A. WIGUEZ DE MELLO (CENPES)	LABORATÓRIO DE ESPECTROMETRIA MOLECULAR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	Nº 321/2008
GERÊNCIA GERAL DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENERGIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL QUÍMICA	LAUDO TÉCNICO	FOLHA 02/02
RESULTADOS		
<p>A Figura 1 apresenta os cromatogramas de íons obtidos para as amostras nas condições de análise utilizadas. Foram identificados os compostos majoritários presentes nas amostras B100 e B20. No cromatograma da amostra B100, enumeramos os ésteres metílicos presentes. No cromatograma da amostra B25, destacamos as parafinas associadas ao diesel bem os ésteres metílicos oriundos do B100.</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Figura 01 – Cromatograma total de íons- Superior: B100, Inferior: B20</p> <p style="text-align: center;">(1)- MeC16:0 (2) MeC18:1+MeC18:2 (3)- MeC18:3 (4)- MeC18:0 (5)- MeC20:0 (6)- MeC22:0</p>		
DÚVIDAS E SUGESTÕES FAVOR CONTACTAR O RESPONSÁVEL PELA EXECUÇÃO DESTE SERVIÇO, NO TELEFONE PARA CONTATO Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949 - 900 – Rio de Janeiro - RJ - Brasil Tel.: (021) 3865-6175 - FAX : (021) 3865-6296		