



Amanda Fabiana Baião Fernando

**Fe(III) como aceptor de elétrons
na biodegradação de gasolina-etanol
em solo tropical residual**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Profa. Maria Isabel Pais da Silva
Co-orientador: Dra. Patrícia Österreicher-Cunha

Rio de Janeiro
Setembro de 2009



Amanda Fabiana Baião Fernando

**Fe(III) como acceptor de elétrons
na biodegradação de gasolina-etanol
em solo tropical residual**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Maria Isabel Pais da Silva

Orientadora

Departamento de Química - PUC-Rio

Dra. Patrícia Österreicher-Cunha

Co-orientadora

Departamento de Engenharia Civil - PUC-Rio

Prof. Eurípedes do Amaral Vargas Jr.

Departamento de Engenharia Civil - PUC-Rio

Prof. Jean Remy Davée Guimarães

UFRJ

Prof. Franklin dos Santos Antunes

Departamento de Engenharia Civil - PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial de Pós-graduação e Pesquisa

Rio de Janeiro, 28 de Setembro de 2009

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Amanda Fabiana Baião Fernando

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) em 2006.

Ficha Catalográfica

Fernando, Amanda Fabiana Baião

Fe(III) como aceptor de elétrons na biodegradação anaeróbia de gasolina-etanol em solo residual tropical / Amanda Fabiana Baião Fernando; orientadora: Maria Isabel Pais da Silva; co-orientadora: Patricia Österreicher-Cunha. – 2009.

143 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Biodegradação. 3. Óxidos de ferro. 5. BTEX-Etanol. 6. Solo tropical. I. Silva, Maria Isabel Pais da. II. Österreicher-Cunha, Patrícia. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

CDD: 540

Aos meus adorados pais Maria Lúcia
(*in memoriam*) e Genuíno, pela dedicação,
amor e carinho.

Agradecimentos

A Deus, por tudo que tenho em minha vida e pela oportunidade de aprender e crescer;

À minha mãe que, mesmo não mais fisicamente presente, me fez amadurecer, inclusive com sua partida e até hoje se faz motivo da minha coragem e evolução;

Ao meu pai e irmãos (cunhado e Pitt também) pelo amor e incentivo;

À minha orientadora pela paciência, credibilidade e conhecimento transmitido;

À minha co-orientadora que, além de acreditar e incentivar meu crescimento profissional, tornou-se pra mim uma grande amiga;

Aos integrantes da minha banca de avaliação por aceitarem meu convite para participar de um dia tão importante na minha vida profissional;

Ao Prof. Daniel Vidal pela ajuda com as amostras e explicações, bem como pela consideração por conceder a mim tanto do seu tempo;

Ao Prof. Franklin pelas suas “aulas” sobre solo, mineralogia e em especial sobre o Ferro;

Ao meu amigo Jhonny, quem me encorajou à seleção de mestrado, auxiliou nos meus estudos e por muitas vezes acreditou mais na minha capacidade do que eu mesma;

Ao Prof. Raul pela disponibilização de uma de suas salas tornando possível a realização dos experimentos;

Ao Prof. Walter pelas conversas construtivas e ao restante do pessoal do Laboratório de Biocorrosão pela ajuda e revezamento quanto ao uso de determinando aparelhos;

À Carla, Isabella, Lillian e Sandra por terem me ajudado muito com os experimentos e com tanta dedicação;

Aos amigos de turma do mestrado que além da ajuda nos estudos, me proporcionaram muitos momentos alegres e verdadeira amizade;

Aos amigos do 3º andar: Felipe, Bernardo, Daniela, Guilherme, Otávio, Danielle, Glorinha, Renato, Rejane, Aline, etc. E também do subsolo: Ana, Glória, Dado e todos os “meninos”, por terem transformado a batalha do dia-a-dia mais suave e até divertida;

Ao Henrique pelos socorros prestados com tanta eficiência e camaradagem;

Ao pessoal do CETUC pela ajuda com a câmara de anaerobiose;

À Viviane da EMBRAPA pelas análises de ICP-AES;

Ao meu amigo Victor pela enorme ajuda na formatação da versão final da dissertação, além das longas conversas construtivas;

Aos amigos de fora da PUC, inclusive meus compadres e afilhado, por compreenderem minha ausência;

À CAPES e PRONEX pela colaboração financeira.

RESUMO

Fabiana Baião Fernando, Amanda; Silva, Maria Isabel Pais. **Fe(III) como acceptor de elétrons na biodegradação de gasolina-etanol em solo tropical residual**. Rio de Janeiro, 2009. 143p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos constituintes da gasolina (BTEX) têm sido encontrados em aquíferos devido aos vazamentos de tanques de armazenamento e sua consequente dissolução na água subterrânea. No Brasil existe ainda um agravante: o etanol é utilizado como aditivo à gasolina, o que promove um aumento na profundidade de percolação dos poluentes, já que atua como cossolvente e possui degradação preferencial. Alterações nas condições químicas do meio ambiente proporcionam, por consequência, adaptações na dinâmica de sobrevivência da microbiota residente. Em um ambiente redutor com baixo nível de manganês, ausência de nitratos e presença significativa de óxidos de ferro, o Fe(III) passa a ser o receptor de elétrons preferencial para a biodegradação anaeróbia da matéria orgânica. Com o objetivo de avaliar a biodegradação anaeróbia da mistura BTEX-Etanol em aquífero tropical, mediada pela redução de Fe(III), foram desenvolvidos microcosmos anaeróbios, envolvendo solo homogêneo saturado com água não contaminada e água contaminada com mistura de BTEX-Etanol. A partir da quantificação e análise da atividade microbiana degradadora, dos resíduos da contaminação e do teor de Fe^{+2} , foi possível verificar o aumento da disponibilização de ferro oriundo dos respectivos óxidos e também da produção de Fe^{+2} durante o tempo de incubação, bem como o período de adaptação dos microorganismos, variação de sua atividade e a queda dos níveis dos BTEX-Etanol. Estes resultados podem ser um indicativo da ocorrência de uma atenuação natural, porém, estudos mais extensos são necessários, incluindo uma metodologia mais adequada para medir as especiações do ferro.

Palavras-Chave

Biodegradação; Óxidos de Ferro; BTEX-Etanol; Solo Tropical

ABSTRACT

Fabiana Baião Fernando, Amanda; Silva, Maria Isabel Pais (Advisor). **Fe(III) as electron acceptor for gasoline-ethanol biodegradation in tropical residual soil**. Rio de Janeiro, 2009. 143p. MSc. Dissertation – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Gasoline monoaromatic hydrocarbons (BTEX) have been detected in aquifers due to storage tank spills from gas stations that lead to their consequent dissolution on groundwater. An aggravating factor in Brazil is ethanol being used as additive to gasoline, promoting an increase on pollutants percolation in soil since it works as co-solvent and is preferentially degraded. Therefore, changes on environmental chemical conditions promote adaptations of the survival dynamic of native microorganisms. In a reducing environment with low levels of manganese, absence of nitrate and significant presence of iron oxides, Fe(III) becomes the preferential electron acceptor for anaerobic biodegradation of organic matter. In order to evaluate this anaerobic biodegradation of BTEX-Ethanol mixture in a tropical aquifer, mediated by Fe(III) reduction, anaerobic microcosms were developed involving homogeneous soil saturated with non-contaminated and BTEX-Ethanol contaminated water. Quantifying and analyzing microbial activity, contamination residues and Fe^{+2} contents allowed to verify increases of iron availability from the respective oxides and Fe^{+2} production throughout the assay, as well as the period of microbial adaptation, the variation of microbial activity and the decrease of BTEX-Ethanol levels. These results may be indicative of the occurrence of natural attenuation. However, more studies are needed, including a better methodology to measure iron speciation in these experimental conditions.

Keywords

Biodegradation; Iron Oxides; BTEX-Ethanol; Tropical Soil

Sumário

1. Introdução	19
Objetivos	21
Objetivos específicos	21
2. Revisão Bibliográfica	23
2.1 BTEX	23
2.2 Biorremediação	25
2.2.1 Biorremediação Intrínseca ou Atenuação Natural	25
2.2.1.1 Limitações à Atenuação Natural	27
2.2.1.2 Aplicação da Atenuação Natural: Investigação do solo e confirmação da eliminação de hidrocarbonetos	28
2.2.2 Biorremediação Engenhada	31
2.3 Biodegradação da gasolina (BTEX)	35
2.3.1 Aerobiose x anaerobiose	35
2.3.2 Receptores de elétrons	37
2.3.3 Bioaumento/isolamento de microorganismos	39
2.3.4 Tempo de contato contaminante x microbiota	40
2.4 Particularidades da gasolina nacional (BTEX-Etanol)	41
2.4.1 Biodegradação da mistura gasolina-etanol	42
2.5 Óxidos de ferro	45
2.5.1 Disponibilização do Fe(III) proveniente dos óxidos	46
2.5.2 Fe(III) como receptor de elétrons	46
2.5.3 Limitações da redução Fe(III)	50
2.5.3.1 Composição da comunidade microbiana	50
2.5.3.2 Quantidade e forma do Fe(III)	50
2.5.3.3 Acessibilidade física ao Fe(III)	51
2.5.4 Mecanismos de controle para determinadas limitações	53
2.5.4.1 Quelantes sintéticos	53
2.5.4.2 Substâncias húmicas	54

3. Testes preliminares para definição de metodologia analítica	55
3.1 Metodologias para a quantificação de diferentes espécies de ferro	55
3.1.1 Determinação de ferro em água a partir da extração por HCl	55
3.1.1.1 Abertura de Fe^{+2} e Fe total	55
3.1.1.2 Determinação de Fe biodisponível e Fe total por espectrometria de absorção atômica (EAA)	57
3.1.1.3 Determinação fotométrica de ferro reativo à batofenantrolina e ao HCl	58
3.1.1.4 Resultados	60
3.1.1.5 Conclusão	61
3.1.2 Determinação de Fe^{+2} e Fe biodisponível total em amostras de solo a partir de extração com ligante (DTPA)	62
3.1.2.1 Extração de Fe^{+2} e Fe^{+3} do solo	63
3.1.2.2 Determinação espectrofotométrica de Fe^{+2} na presença de Fe^{+3}	64
3.1.2.3 Resultados	67
3.1.2.4 Conclusão	70
3.2 Teste de recuperação da mistura BTEX-Etanol através do método de extração adotado.	71
3.2.1 Teste da eficiência de recuperação do método	71
3.2.1.1 Metodologia	72
3.2.1.2 Resultado	74
3.2.1.3 Conclusão	78
3.2.2 Teste de recuperação de BTEX-Etanol das amostras de solo.	79
3.2.2.1 Metodologia	79
3.2.2.2 Resultado	80
3.2.2.3 Conclusão	82
3.3 Limite de detecção	83
3.3.1 Metodologia	83
3.3.2 Resultado	83
3.3.3 Conclusão	84

4. Metodologia experimental: Estudo em microcosmos	85
4.1 Amostra	87
4.2 Coleta	87
4.4 Preparo da solução BTEX-Etanol	88
4.5 Ensaio Experimental	88
4.5.1 Montagem dos microcosmos	88
4.5.2 Análises biológicas e químicas para caracterização de amostras.	90
4.5.2.1 Determinação da atividade microbiana por hidrólise de FDA	90
4.5.2.2 Medições de pH e potencial de redução	93
4.5.2.3 Determinação de Fe^{+2} e Fe biodisponível total	94
4.5.2.4 Quantificação das concentrações dos BTEX-Etanol em solo contaminado	95
4.6 Ensaio estéril	98
4.6.1 Montagem dos microcosmos estéreis	98
4.6.2 Análises biológicas e químicas para caracterização das amostras estéreis.	99
5. Resultados e Discussão	100
5.1 Ensaio com solo natural (biótico)	100
5.1.1 Atividade Microbiana Degradora	100
5.1.2 Medições de pH e potencial de oxi-redução	107
5.1.3 Determinação de Fe^{+2} e Fe biodisponível total.	109
5.1.4 Quantificação das concentrações dos BTEX-Etanol em solo contaminado	118
5.1.5 Integração dos resultados	123
5.2 Ensaio estéril	125
5.2.1 Atividade Microbiana Degradora	125
5.2.2 Determinação de Fe^{+2} e Fe biodisponível total.	126
5.2.3 Quantificação das concentrações dos BTEX-Etanol em solo contaminado	128
5.2.4 Integração dos resultados do ensaio estéril	132
6. Conclusão	133

7. Sugestões	135
8. Referências Bibliográficas	136

Lista de figuras

Figura 1 – Tanques de gasolina com problemas de corrosão (Mainier & Leta, 2001).	20
Figura 2 - Fórmulas estruturais de alguns compostos monoaromáticos do petróleo (Vieira, 2004).	23
Figura 3 – Esquema da degradação de uma substância orgânica por um microorganismo (Silva, 2002).	26
Figura 4 - Constituintes da gasolina e do óleo diesel (Marchal <i>et al.</i> , 2003).	30
Figura 5 - Biorremediação de um solo contaminado com óleo diesel por 88 dias. (1) solo controle; (2) solo infértil; (3) solo + N ± P ± K fertilizantes; (4) solo+ nitrato de cálcio amoniacal; (5) solo + nitrato de cálcio amoniacal + K ₂ HPO ₄ ; (6) solo + uréia; (7) solo + uréia +K ₂ HPO ₄ (Margesin <i>et al.</i> , 2000).	32
Figura 6 - (a) Biotransformação do benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), <i>o</i> -xileno (<i>o</i> -X), <i>m</i> -xileno (<i>m</i> -X) e <i>p</i> -xileno (<i>p</i> -X) individualmente por uma cultura mista (densidade da cultura = 270 mg L ⁻¹); (b) biotransformação de uma mistura de benzeno (B), tolueno (T), etilbenzeno (E), <i>o</i> -xileno (<i>o</i> -X), <i>m</i> -xileno (<i>m</i> -X) e <i>p</i> -xileno (<i>p</i> -X), <i>n</i> -propilbenzeno (<i>n</i> -PB) e 1,2,4-trimetilbenzeno (TMB) por uma cultura mista (densidade da cultura = 220 mg L ⁻¹) (Deeb e Alvarez-Cohen, 2000).	33
Figura 7 - Demonstração da percolação do tolueno através do material do aquífero em duas velocidades: V=1.75 cm h ⁻¹ (tr=7.15 h); V=2.68 cm h ⁻¹ (tr=4.66 h). A: Colunas estéreis, e B: Colunas biológicas (Zheng <i>et al.</i> , 2002).	40
Figura 8: Atividade enzimática durante o ensaio (valores final/ inicial, µg fluoresceína×min ⁻¹ ×g ⁻¹ solo). Controles não contaminados (♦ C	

não ventilado, ◊ CV ventilado) solos contaminados (▪ B não

ventilado, contaminado com BTEX, • E não ventilado, contaminado com BTEX-etanol, □ BV ventilado, contaminado com BTEX, ○ EV ventilado, contaminado com BTEX-etanol) (Österreicher-Cunha *et al.*, 2007).

43

Figura 9 – Fluxo de massa do etanol e do nitrato na região da fonte, 397 dias após o derramamento controlado de gasolina (Costa *et al.*, 2006).

44

Figura 10 – Imagens de microscopia de força atômica (MFA) de (a) ferridrato original fotografado logo após a formação de precipitado, (b) agregado de grãos de hematita com ferridrato em volta e (c) vários cristais de goetita. As imagens (b) e (c) foram obtidas após o envelhecimento por algumas semanas (Stipp *et al.*, 2002).

46

Figura 11: Concentrações de benzeno em água subterrânea e Fe(III) de sedimentos coletados em local distante ao do derramamento de petróleo, próximo a Bemidji, Minnesota, EUA.

48

Figura 12 – Curvas padrão de calibração de Fe+2, em presença de Fe+3, feitas em anaerobiose com e sem o uso da solução com DTPA.

68

Figura 13 – Curvas padrão de calibração de Fe+2, em presença de Fe+3, preparadas em aerobiose com e sem o uso da solução com DTPA.

69

Figura 14 – Curva padrão de calibração do Etanol.

75

Figura 15 - Curva padrão de calibração do Benzeno.

75

Figura 16 – Curva padrão de calibração do Tolueno.

75

Figura 17 – Curva padrão de calibração do Etilbenzeno.

75

Figura 18 – Curva padrão de calibração da mistura de Xilenos.

75

Figura 19 – Curva padrão de Etanol

80

Figura 20 – Curva padrão de Benzeno

81

Figura 21 – Curva padrão de Tolueno	81
Figura 22 – Curva padrão de Etilbenzeno	81
Figura 23 – Curva padrão dos Xilenos	81
Figura 19 – Foto do talude.	88
Figura 20 – Microcosmo C: solo saturado com água destilada.	90
Figura 21 – Curva padrão de calibração de fluoresceína.	93
Figura 22 – Variação de atividade microbiana entre diferentes condições do solo: aeróbio insaturado, anaeróbio insaturado, anaeróbio saturado com água e anaeróbio saturado com água contaminada. Os números indicam a quantidade de replicatas. Cada microcosmo está representado no gráfico por “C” e “E”.	102
Figura 23 – Atividade microbiana degradadora no microcosmo C e E avaliada durante o ensaio, através da hidrólise de FDA e consequente produção de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ de solo úmido $\times \text{min}^{-1}$).	105
Figura 24 – Diagrama de especiação de ferro no solo sob diferentes condições de pH e Eh (potencial redox) (USEPA, 2003).	108
Figura 25 – A foto do lado esquerdo mostra as soluções resultantes da extração de Fe com DTPA misturadas à fenantrolina. A foto do lado direito mostra as soluções resultantes da extração de Fe com CaCl_2 misturadas à fenantrolina em comparação com o padrão de $3\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.	112
Figura 26 – Representação das concentrações de Fe^{+2} e Fe biodisponível total encontradas no microcosmo C.	113
Figura 27 - Representação das concentrações de Fe^{+2} e Fe biodisponível total encontradas no microcosmo E.	114
Figura 28 - Razão $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+2} + \text{Fe}^{+3}$ nos microcosmos C e E ao longo do ensaio.	117
Figura 29 – Cromatograma da mistura de BTEX-Etanol a 10.000ppm em água, por CG-DIC nas condições citadas no capítulo 3.	118
Figura 30 – Níveis de BTEX-E presentes na fase gasosa extraída do	

solo ao longo do ensaio.	120
Figura 31 - Concentrações de etilbenzeno e xilenos obtidas da fase gasosa durante as extrações das amostras de solo.	121
Figura 32 - Concentrações do etanol, benzeno e tolueno obtidas da fase gasosa durante as extrações das amostras de solo.	121
Figura 33 – Concentração dos BTEX-E presentes na fase gasosa da extração das amostras de solo estéril.	129
Figura 34 – Curva normalizada dos valores das concentrações de BTEX-E presentes na fase gasosa extraída das amostras de solo estéril.	130
Figura 35 – Curva normalizada das concentrações de BTEX-E presentes na fase gasosa da extração das amostras de solo biótico em escala de tempo comparativa à do ensaio estéril.	131

Lista de tabelas

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos componentes da mistura BTEX-Etanol.	24
Tabela 2 - Taxas de degradação das principais classes de hidrocarbonetos da gasolina (Marchal <i>et al.</i> , 2003).	30
Tabela 4 – Volumes utilizados de cada solução-estoque para a preparação dos padrões.	66
Tabela 5 – Valores de absorbância obtidos através das curvas padrão de calibração de Fe^{+2} , em presença de Fe^{+3} , preparadas com e sem a utilização da solução com DTPA. Ambas preparadas em anaerobiose.	67
Tabela 6 – Valores de absorbância obtidos através das curvas padrão de calibração de Fe^{+2} em presença de Fe^{+3} preparadas com e sem a utilização da solução com DTPA. Ambas preparadas em aerobiose.	68
Tabela 7 – Valores de absorbância e concentração das amostras de solo não contaminado.	70
Tabela 8 – Valores aproximados do tempo de retenção dos compostos presentes nas soluções e temperatura da coluna no momento das respectivas detecções.	74
Tabela 9 – Concentrações dos contaminantes encontradas na fase gasosa após repetidas extrações da mesma amostra de solo.	76
Tabela 10 - Valores das concentrações dos BTEX-E no decorrer da análise, valores esperados, obtidos e porcentagem de recuperação.	77
Tabela 11 – Valores de média e desvio padrão das concentrações relativas dos BTEX-Etanol encontradas nas amostras.	80
Tabela 12 – Razões entre os valores das áreas de etilbenzeno e as áreas do padrão interno obtidas através de injeções de soluções com diferentes concentrações.	84

Tabela 13 - Tabela demonstrativa da caracterização da feição siltosa (Österreicher-Cunha <i>et al.</i> , 2004).	86
Tabela 14 – Valores das concentrações de fluoresceína resultantes da análise em triplicata da hidrólise de FDA em aerobiose e anaerobiose relativas aos microcosmos C e E.	101
Tabela 15 – Resultado da análise de hidrólise de FDA dos microcosmos C e E referente a todo o tempo do ensaio.	104
Tabela 16 - Valores de potencial de redução e pH dos microcosmos C e E obtidos durante todo o tempo de ensaio.	107
Tabela 17 – Concentrações de Fe biodisponível total nos microcosmos C e E ao longo do ensaio.	109
Tabela 18 – Concentrações de Fe ⁺² nos microcosmos C e E ao longo do ensaio.	110
Tabela 19 – Concentrações dos BTEX-Etanol presentes na fase gasosa extraída de cada amostra e determinadas durante todo o tempo do ensaio. Alguns valores não foram possíveis de serem detectados.	119
Tabela 20 – Concentrações de fluoresceína resultantes da análise em triplicata da hidrólise de FDA em anaerobiose relativas aos microcosmos Ce e Ee estéreis.	126
Tabela 21 – Concentrações de Fe biodisponível total em amostras de solo dos microcosmos Ce e Ee ao longo do ensaio estéril.	127
Tabela 22 - Concentrações de Fe ⁺² em amostras de solo dos microcosmos Ce e Ee ao longo do ensaio estéril.	127
Tabela 23 – Concentrações dos BTEX-Etanol presentes na fase gasosa extraída de cada amostra analisada durante todo o tempo do ensaio estéril.	129