# 3.
# Testes preliminares para definição de metodologia analítica

## 3.1
## Metodologias para a quantificação de diferentes espécies de ferro

Devido à ampla variedade de metodologias para a determinação de ferro biodisponível e $Fe^{+2}$ divulgadas na literatura, duas delas foram testadas. Na primeira, a extração foi procedida com diferentes concentrações de HCl e a segunda com uma solução contendo, entre outros, um agente quelante (DTPA) para ferro.

### 3.1.1
### Determinação de ferro em água a partir da extração por HCl

Este método teve como objetivo determinar a quantidade de Fe biodisponível e Fe total presentes nas amostras de solo.

#### 3.1.1.1
#### Abertura de $Fe^{+2}$ e Fe total

A técnica empregada para a extração de ferro do solo foi baseada no trabalho de Heron *et al.* (1994). Todo o procedimento de extração foi feito em condições aeróbias.

*Amostra:*

A metodologia de extração de ferro com soluções de HCl foi testada com amostras de um ensaio anterior. Para este ensaio, o solo foi coletado de forma

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

indeformada em colunas e saturado com água contaminada sem oxigênio. Após diferentes tempos de incubação as colunas foram sendo abertas e as amostras retiradas em anaerobiose. O solo e a solução contaminante foram os mesmos utilizados nos ensaios deste trabalho e suas descrições estão apresentadas no capítulo 4.

*Reagentes:*

Ácido Clorídrico (Isofar)

*Soluções:*

- Solução HCl 0,5M – 4,2mL de HCl concentrado foram diluídos em água deionizada para 100ml de solução.
- Solução HCl 5M – 42mL de HCl concentrado foram diluídos em água deionizada para 100ml de solução.

*Procedimento prévio:*

Em um vidro de relógio foram pesados 5g de solo úmido e levados à estufa a 100ºC por toda a noite ou até que atingisse peso constante. Em seguida a amostra foi macerada, armazenada em recipientes plásticos descartáveis e tampada com papel alumínio.

*Extração de Fe biodisponível*

Em um béquer de 100mL pesou-se 1g de solo previamente seco e macerado e a ele foram adicionados 5mL de HCl 0,5M. Após 24h de agitação, a mistura foi transferida para um tubo plástico com tampa de rosca e avolumada com água deionizada para 40mL. A solução foi centrifugada por 10 minutos (min.) em 3000rpm. O sobrenadante foi utilizado nas análises de determinação fotométrica de Fe(II) iônico e de Fe(II) total através das técnicas de espectrometria de absorção de UV-Vis (Evolution 300-Vision Pro) e de absorção atômica (EAA) (VARIAN SpectrAA 200) respectivamente.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

*Extração de Fe total*

O procedimento de extração de Fe total foi similar ao anterior, diferenciando-se apenas quanto à utilização da solução de HCl 5M. O sobrenadante também foi utilizado nas análises de determinação fotométrica de Fe(II) iônico e de Fe total através das técnicas de espectrofotometria de UV-Vis (Evolution 300-Vision Pro) e de espectrometria por absorção atômica (EAA) (VARIAN SpectrAA 200) respectivamente.

### 3.1.1.2
### Determinação de Fe biodisponível e Fe total por espectrometria de absorção atômica (EAA)

A técnica empregada para a determinação de Fe biodisponível e total por espectrometria de absorção atômica foi baseada no Método A da norma ASTM D1068-03.

*Determinação de Fe biodisponível*

Uma alíquota do extrato de Fe biodisponível (proveniente da abertura com HCl 0,5M) foi atomizada diretamente no aparelho. A concentração de ferro foi determinada por espectrometria de absorção atômica em equipamento VARIAN SpectrAA 200. Foi usada lâmpada de catodo oco específica para determinação de ferro.

*Determinação de Fe total*

O mesmo procedimento citado anteriormente foi executado, apenas que, desta vez com uma alíquota do extrato de Fe total (proveniente da abertura com HCl 5M).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.1.1.3
### Determinação fotométrica de ferro reativo à batofenantrolina e ao HCl

A técnica empregada para a determinação fotométrica de Fe(II) foi baseada no Método D da norma ASTM D1068-03.

Algumas alterações foram feitas para melhor adaptação do método:

- Os volumes das soluções e, consequentemente, massas dos respectivos solutos foram adaptados à capacidade volumétrica da vidraria utilizada.
- Após a execução de uma varredura do $Fe^{+2}$ no espectrofotômetro, concluiu-se que o melhor comprimento de onda para a absorção para tais amostras seria 545nm.

*Reagentes:*

Hidróxido de amônio PA (Isofar)

Batofenantrolina (BPA): 4,7-difenil 1,10-fenantrolina (Vetec)

Sulfato ferroso amoniacal hexaidratado (Merck)

Ácido sulfúrico PA 95-97% (Vetec)

Ácido clorídrico (Isofar)

N-hexanol (Vetec)

Etanol PA 95% (Vetec)

*Soluções:*

- Solução tampão pH 4 de acetato de sódio diluída (Micronal).
- Solução-estoque de $Fe^{+2}$ 10µg/mL – Foram dissolvidos 0,0243g de sulfato ferroso amoniacal hexaidratado em 170 mL de água deionizada. Adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico concentrado e o volume foi completado para 250ml com água deionizada. A solução foi renovada após 48 horas e mantida em frasco vedado e embrulhado em papel alumínio na geladeira, fora do alcance da luz solar.
- Solução de BPA 0,668g/L – Foram dissolvidos 0,0668g de batofenantrolina em 100ml de álcool etílico 95%. Validade da solução: 30 dias mantido em geladeira e envolvido em papel alumínio.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

*Procedimento:*

*Determinação de $Fe^{+2}$*

Foram transferidos 2mL de tampão acetato para um funil de separação de 125mL limpo e 20mL do extrato de Fe biodisponível (proveniente da abertura com HCl 0,5M) foram pipetados diretamente dentro do tampão, evitando o contato com o $O_2$. A solução foi homogeneizada com movimentos circulares. Foram adicionados 4mL da solução de BPA no funil. Após uma agitação vigorosa por 30 segundos, foram adicionados 4mL de n-hexanol e outra agitação vigorosa foi feita também por 30 segundos. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos na intenção de que as fases orgânica e aquosa se separassem. A fase aquosa foi drenada e descartada. A fase orgânica recebeu 2mL de etanol, foi transferida para um erlenmeyer, tampada e mantida no escuro por 20 minutos. Sua absorbância foi medida através da técnica de espectrofotometria de UV-Vis a 545nm (Evolution 300-Vision Pro).

*Determinação de Fe(II)*

Foram transferidos 1,6mL de HCl 1:1 para o funil de separação e 20mL do extrato de Fe total (proveniente da abertura com HCl 5M) foram pipetados diretamente dentro do ácido. A solução foi homogeneizada com movimentos circulares e mantida em repouso por 10 minutos. O pH da solução foi ajustado entre 4 e 4,5 com hidróxido de amônio 1:1 e 2mL de tampão acetato foram adicionados. Após homogeneização, adicionou-se 4mL da solução de BPA no funil e este foi agitado vigorosamente por 30 segundos. Depois, 8mL de n-hexanol foram adicionados e mais uma agitação vigorosa foi feita por 30 segundos. A mistura ficou em repouso por 5 minutos para que ocorresse a separação das fases. A fase aquosa foi drenada e descartada. A fase orgânica recebeu 4mL de etanol, foi transferida para um erlenmeyer, tampada e mantida no escuro por 5 minutos. Sua absorbância foi medida através da técnica de espectrofotometria de UV-Vis. a 545nm (Evolution 300-Vision Pro).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

*Curva padrão de calibração:*

Uma curva padrão de calibração de $Fe^{+2}$ foi preparada a partir de soluções de concentrações crescentes de sulfato ferroso amoniacal. Primeiramente foi feita uma solução-estoque de $Fe^{+2}$ a 10mg/L e em seguida, diluições do padrão para 0,1, 0,3 e 0,5mg/L em balões volumétricos de 25mL.

Os procedimentos para as determinações de Fe(II) iônico e total dos padrões foram executados como descrito anteriormente, sendo o extrato substituído por cada solução padrão da curva de calibração.

Tanto para leitura das amostras quanto dos padrões foram feitos amostras controle (branco). Para o preparo do branco, não foram utilizadas nenhuma das soluções de ferro. No lugar da amostra foi adicionada somente água deionizada.

A metodologia empregada para determinação espectrofotométrica por UV-Vis é capaz de obter quantidades de Fe(II) iônico, uma vez que a batofenantrolina reage somente com este tipo, ou seja, com o $Fe^{+2}$.

A partir dos valores de absorbância por UV-Vis obtidos na leitura das soluções padrão de $Fe^{+2}$, foi possível plotar uma curva padrão de calibração.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.1.1.4
### Resultados

A curva de calibração gerou uma equação ideal para o cálculo da concentração das amostras analisadas.

Com o objetivo de obter o valor de Fe(III) biodisponível, os valores de Fe(II) iônico, obtidos através da extração com HCl 0,5M e determinação espectrofotométrica de UV-Vis, foram descontados dos valores de Fe (II) e (III) biodisponíveis obtidos através da extração com HCl 0,5M e determinação espectrofotométrica de absorção atômica.

Como o Fe(II) seria totalmente ionizado pelo HCl 5M, os valores de Fe(II) iônico determinados através de espectrofotometria UV-Vis. foram descontados dos valores de Fe total também obtidos pela absorção atômica, com o objetivo de se obter o valor de Fe(III) total.

Tabela 3 – Resultados da concentração de Fe biodisponível e total.

| Amostra | Fe total | | Fe biodisponível ($\mu g.g^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| | Fe II ($\mu g.g^{-1}$) | Fe III ($\mu g.g^{-1}$) | |
| 30- Não contaminada (inicial) | 1,3 | 46699 | 2400 |
| 31- Não contaminada (inicial) | 1,4 | 31499 | 1900 |
| 32- Não contaminada (10º dia) | 1,5 | 53299 | 1500 |
| 33- Não contaminada (20º dia) | 1,5 | 48299 | 2000 |
| 34- Não contaminada (30º dia) | 1,6 | 54998 | 1600 |
| 35- Não contaminada (40º dia) | 1,5 | 44999 | 1800 |
| 36- Contaminada (inicial) | 1,6 | 31998 | 1600 |
| 37- Contaminada (inicial) | 1,8 | 15998 | 1600 |
| 38- Contaminada (10º dia) | 1,3 | 39999 | 1600 |
| 39- Contaminada (20º dia) | 1,3 | 69999 | 1700 |
| 40- Contaminada (30º dia) | 1,3 | 44199 | 2000 |
| 41- Contaminada (40º dia) | 2,0 | 46298 | 1700 |

Os valores de Fe II disponível encontrados nas amostras apresentaram-se muito baixos, sendo, por este motivo, considerados desprezíveis. Oxidação do Fe(II) eventualmente formado durante o ensaio feito ao ar.

### 3.1.1.5
### Conclusão

O método não se mostrou adequado para a análise, pois os valores de $Fe^{+2}$ mostraram-se extremamente baixos. Uma razão para tal ocorrência pode ter sido a realização da metodologia em presença de oxigênio, o que certamente causou a oxidação do $Fe^{+2}$, possivelmente presente, a $Fe^{+3}$.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Estima-se que a utilização de HCl 0,5M para a extração de Fe biodisponível do solo não seja uma técnica confiável, pois a solução ácida somente irá solubilizar o ferro facilmente trocável e parte do Fe na matéria orgânica.

Também não seria adequado considerar tal técnica ideal para a determinação de ferro total do solo, visto que o HCl 5M não é capaz de extrair eficientemente todos os tipos de ferro de todas as formas de óxidos (siderita e magnetita) (Heron *et al.*, 1994). É comum a maioria dos métodos de digestão não dissolver o conteúdo total dos metais nos solos, sendo necessária a utilização de um ácido mais forte. As aberturas envolvendo HF são mais efetivas na dissolução de silicato e liberam para a solução os metais ligados ao retículo cristalino. Muitos autores sugerem a utilização de solução de água régia para a solubilização de matrizes contendo qualquer tipo de metal com exceção do Si (Saldanha *et al.*, 1997).

E, dependendo da forma do óxido de Fe(III), nem mesmo é possível garantir ter Fe(II) e (III) disponibilizados e Fe(II) iônico pela ação do ácido, uma vez que nem mesmo as bactérias foram capazes de fazê-lo (Hyacinthe *et al.*, 2006). Há controvérsias na literatura sobre qual dos dois tem maior acesso ao Fe não disponível em um cristal.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.1.2
### Determinação de $Fe^{+2}$ e Fe biodisponível total em amostras de solo a partir de extração com ligante (DTPA)

A fim de quantificar os teores de $Fe^{+2}$ provenientes da redução microbiana em amostras de solo, de forma a impedir qualquer possível interferência da quantidade presente de Fe(III), uma nova metodologia foi testada. Desta vez o Fe biodisponível foi extraído do solo a partir de uma solução contendo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), cloreto de cálcio e trietanolamina em pH 7.3.

Segundo Muir & Andersen (1977), a presença de orto-fenantrolina atribui valor excessivo à quantidade de Fe(II) quando o Fe(III) representa mais que 50% do ferro total no meio. Isto ocorre devido à reação de redução de Fe(III) a Fe(II)

causada pela o-fenantrolina e catalisada pela luz do sol. Para que não ocorressem erros como este durante a determinação de $Fe^{+2}$ deste trabalho, o DTPA foi usado com o intuito de complexar o Fe(III) e, assim, eliminar a interferência na quantificação de $Fe^{+2}$.

O DTPA é um agente quelante e foi utilizado porque dentre os amino carboxilatos, ele é o que forma o complexo mais forte com o Fe(III), podendo assim extrair efetivamente Fe(III) do solo (Cabelli *et al.*, 1989; Lindsay & Norvell, 1978). Ele combina com os íons livres de Fe em solução, formando complexos solúveis e em resposta, os íons de Fe dessorvem da superfície do solo ou se dissolvem da fase sólida para restabelecer o equilíbrio no meio (Silva, 1999).

A medição da concentração de $Fe^{+2}$ se deu por manutenção com 1,10-fenantrolina seguido de determinação espectrofotométrica de UV-Vis (Evolution 300-Vision Pro).

O teste foi desenvolvido a partir de solo não contaminado, cujas propriedades são apresentadas no capítulo 4. Foram feitos testes comparativos sobre a eficiência de recuperação de $Fe^{+2}$ utilizando soluções padrão com e sem a adição da solução com DTPA em ambiente aeróbio e anaeróbio.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.1.2.1
### Extração de $Fe^{+2}$ e $Fe^{+3}$ do solo

A técnica utilizada para a extração de $Fe^{+2}$ e $Fe^{+3}$ foi baseada na análise de cobre, ferro, manganês e zinco por extração com DTPA encontrada em Silva (1999), que, por sua vez, foi baseada em Lindsay & Norvell (1989).

*Reagentes:*

DTPA (Sigma Aldrich)

Trietanolamina (TEA) (Vetec)

Cloreto de cálcio (Merck)

Ácido clorídrico (Isofar)

*Soluções:*

- Solução extratora – Em um béquer foram dissolvidos 0,98g de DTPA em 100mL de água deionizada e adicionados 7,45mL de trietanolamina mais 0,735g de cloreto de cálcio. A solução foi homogeneizada e avolumada para 500mL com água deionizada.

  Ajustou-se o pH para 7,30 com HCl 4M.
- Solução HCl 4M – 16,7mL de HCl concentrado foram diluídos em água deionizada para 50ml de solução.

*Procedimento:*

Para cada amostra, foram pesadas três replicatas de 20g de solo em erlenmeyers e adicionados, a cada alíquota, 40mL de solução extratora. Em um erlenmeyer à parte foi preparado o branco, sendo adicionado neste somente 40mL de solução extratora. Os érlenmeyers foram agitados por 2 horas a 220 rpm. Em seguida as amostras foram transferidas para os tubos falcon, centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e finalmente filtradas para provetas, onde foi possível medir o volume de filtrado.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.1.2.2
### Determinação espectrofotométrica de $Fe^{+2}$ na presença de $Fe^{+3}$

A metodologia aplicada para a determinação espectrofotométrica de $Fe^{+2}$ foi resultante de um acoplamento dos métodos de Fadrus & Maly (1975) e Nakatani *et al.* (1993).

Algumas modificações foram adotadas quanto a diluições de solventes e método de extração.

- O método de extração de ferro do solo adotado não foi o de Nakatani *et al.* (1993), mas de Silva (1999), com o uso de DTPA;
- Foram preparadas soluções-estoque de concentração igual a 100µg/ml ao invés de 1000 µg/ml, a fim de facilitar a diluição dos padrões

- O ácido nitrilotriacético (NTA) utilizado não foi na forma de sal dissódico. Para se chegar à composição solicitada pelo método, foi adicionado hidróxido de sódio ao NTA disponível.

*Reagentes:*

Sulfato ferroso amoniacal hexaidratado (Merck)

Cloreto férrico hexaidratado (Vetec)

1,10-Fenantrolina (Merck)

Glicina (Vetec)

Ácido clorídrico (Isofar)

Ácido nitrilotriacético (Vetec)

Hidróxido de sódio (Vetec)

*Soluções:*

- Solução-estoque de $Fe^{+2}$ 100µg/mL – foram dissolvidos 0,0702g de sulfato ferroso amoniacal hexaidratado em água deionizada e avolumado com água deionizada para 100ml.
- Solução-estoque de $Fe^{+3}$ (100 µg/ml) – foram dissolvidos 0,0484g de cloreto férrico hexaidratado em água deionizada e avolumado com água deionizada para 100ml.
- Solução tampão:

- 1,10 Fenantrolina 0,025M – dissolveu-se 0,25g de fenantrolina em 50ml de água deionizada. 1ml de de HCl concentrado foi adicionado e a solução foi avolumada para 100ml com água deionizada.

- Glicina 0,5M – foram dissolvidos 3,7535g de glicina em água deionizada e completou-se o volume para 100ml com água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 2,9 com HCl 0,5M.HCl 0,5M – Foi diluido 1,05ml de HCl concentrado em água deionizada para 25ml.

- Ácido Nitrilotriacético (NTA) 0,1M) – dissolveu-se 0,8256g de NaOH em água deionizada. Adicionou-se 1,9022g de ácido nitrilotriacético e a solução foi avolumada com água deionizada para 100ml.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Misturam-se estas soluções na relação volumétrica 5:5:1

*Procedimento:*

Foram transferidos 10ml do filtrado (solo + solução extratora) para frascos de 25ml. Nele foram adicionados 5ml da solução tampão e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi homogeneizada. Para o preparo do branco, não foi adicionado filtrado, somente a solução tampão e água deionizada.

Após 1hora da adição do tampão, a leitura foi feita em um espectrofotômetro em 508nm de comprimento de onda (Evolution 300-Vision Pro).

*Curva padrão de calibração:*

Uma curva padrão foi estabelecida a partir de soluções de concentrações crescentes de sulfato ferroso amoniacal ($Fe^{+2}$) e decrescentes de cloreto férrico ($Fe^{+3}$) em solução tampão.

Foram preparados seis padrões distintos misturando as soluções-estoque de cada íon nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5µg/ml de $Fe^{+2}$ em balões volumétricos de 25ml (Tab. 15).

Tabela 4 – Volumes utilizados de cada solução-estoque para a preparação dos padrões.

| | Br | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 (µg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **$Fe^{+2}$** | 0 | 0 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,00 | 1,25 (ml) |
| **$Fe^{+3}$** | 0 | 1,25 | 1,00 | 0,75 | 0,50 | 0,25 | 0 (ml) |

Foram adicionados 5ml da solução tampão, completou-se o volume com água deionizada para 25ml e a solução foi homogeneizada. Para o preparo da solução controle (branco), não foi utilizada nenhuma das soluções de ferro, somente a solução tampão e água deionizada.

Após 1hora da adição do tampão, fez-se a leitura no espectrofotômetro em 508nm de comprimento de onda (Evolution 300–Vision Pro).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

## 3.1.2.3
## Resultados

### 3.1.2.3.1
### Comparação entre curvas de calibração de $Fe^{+2}$ sob diferentes condições

*Curvas preparadas em anaerobiose*

Foram preparadas em ambiente anaeróbio duas curvas padrão de calibração a partir das mesmas concentrações de $Fe^{+2}$. Em uma delas foi utilizada a solução contendo DTPA e na outra esta solução não foi usada (Tab. 5).

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.

| Conc.padrão (mg/L-1) | Absorbância (nm) | |
|---|---|---|
| | com DTPA | sem DTPA |
| 0 | 0,025 | 0,025 |
| 1 | 0,194 | 0,264 |
| 2 | 0,373 | 0,501 |
| 3 | 0,537 | 0,733 |
| 4 | 0,700 | 0,958 |
| 5 | 0,878 | 1,203 |

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

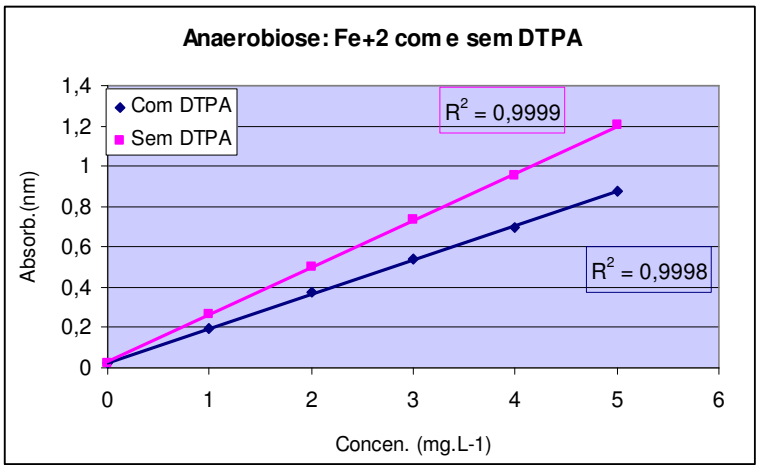


Figura 12 – Curvas padrão de calibração de Fe+2, em presença de Fe+3, feitas em anaerobiose com e sem o uso da solução com DTPA.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

*Curvas preparadas em aerobiose*

Foram preparadas em ambiente aeróbio duas curvas padrão de calibração a partir das mesmas concentrações de $Fe^{+2}$. Em uma delas foi utilizada a solução contendo DTPA e na outra esta solução não foi usada (Tab. 6).

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.

| Conc.padrão (mg/L-1) | Absorbância (nm) | |
|---|---|---|
| | Com DTPA | Sem DTPA |
| 0 | 0,015 | 0,010 |
| 1 | 0,104 | 0,195 |
| 2 | 0,177 | 0,398 |
| 3 | 0,298 | 0,587 |
| 4 | 0,378 | 0,771 |
| 5 | 0,466 | 0,951 |

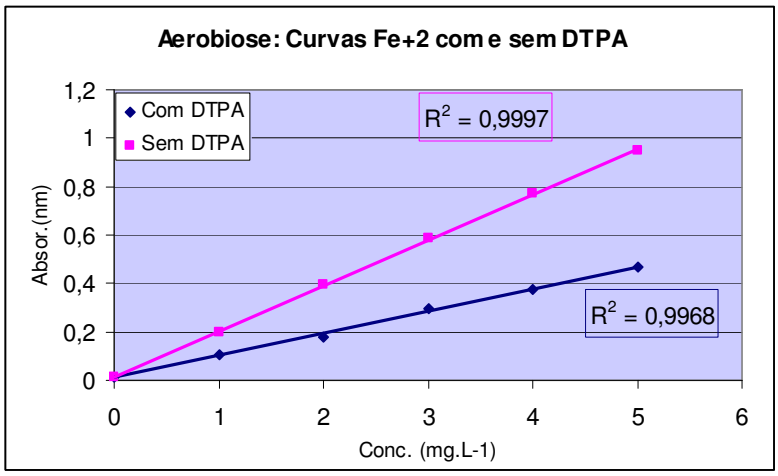


Figura 13 – Curvas padrão de calibração de Fe+2, em presença de Fe+3, preparadas em aerobiose com e sem o uso da solução com DTPA.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

A partir da comparação entre os resultados foi possível perceber que os valores de absorbância do $Fe^{+2}$ obtidos foram muito maiores quando as soluções padrão foram preparadas em anaerobiose e sem o uso da solução com DTPA. Possivelmente a solução com o uso de quelante não deixou todo o Fe(II) livre na solução.

### 3.1.2.3.2
### Análise de amostras de solo não contaminado preparadas em anaerobiose sem o uso da solução com DTPA.

Amostras da feição arenosa (A) e da siltosa (S) de solo não contaminado foram analisadas quanto às suas concentrações de $Fe^{+2}$ com a finalidade de testar a metodologia de extração de $Fe^{+2}$ com o uso de DTPA.

A curva de calibração utilizada foi a mesma obtida em anaerobiose sem a solução com DTPA (Fig. 12).

Tabela 7 – Valores de absorbância e concentração das amostras de solo não contaminado.

| Amostras (não contam.) | Absorbância (nm) | Concentração Fe+2 (mg.L-1) |
|---|---|---|
| A 1.1 | 0,010 | 0,056 |
| A 1.2 | 0,011 | 0,061 |
| A 2.1 | 0,009 | 0,049 |
| A 2.2 | 0,010 | 0,055 |
| S 1.1 | 0,005 | 0,029 |
| S 1.2 | 0,003 | 0,018 |
| S 2.1 | 0,004 | 0,020 |
| S 2.2 | 0,017 | 0,097 |

Os valores de $Fe^{+2}$ obtidos nas amostras de solo através do método com DTPA foram maiores que os valores obtidos nas amostras de solo, contaminado e não contaminado, através do método de extração com HCl.

Uma vez que não se conhecia a concentração de $Fe^{+2}$ nos solos de nenhum dos dois testes, não é possível afirmar que os valores encontrados sejam verdadeiros, mas pode-se garantir que são comparativos.

### 3.1.2.4
### Conclusão

O uso de complexantes se adequa melhor à extração das fases mais biodisponíveis, que são o Fe ligado à fase de troca catiônica (CTC), ligado à materia orgânica e um pouco dos próprios óxidos. Isto pode variar em função da cristalinidade e do envelhecimento do solo. Como visto em Lovley & Anderson (2000), o agente quelante possui maior facilidade para acessar fisicamente o Fe(III) do óxido insolúvel.

A partir dos resultados sobre a realização do método em ambiente aeróbio ou anaeróbio, decidiu-se mantê-la em anaerobiose.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Também foi possível perceber que com a ausência da solução com DTPA nos padrões houve uma melhor recuperação do $Fe^{+2}$. Sendo assim, foi adotada a não adição da solução com DTPA nas soluções padrão.

A eficiência do método pareceu não ter problemas, embora não tenha sido testado com um solo contaminado, possivelmente contendo uma maior quantidade de $Fe^{+2}$. Segundo a literatura, as composições de suas soluções extratoras e solução tampão garantem uma extração, solubilidade e determinação do $Fe^{+2}$ e do Fe disponível mais seguras (Cabelli *et al.*, 1989; Lindsay & Norvell, 1978; Oliveira & Nacimento, 2006).

Por ser um solo não contaminado, ou seja, sem introdução de matéria orgânica, supõe-se que os valores encontrados de $Fe^{+2}$ tenham sido originados da solubilização do Fe(II) ou até mesmo redução química do Fe(III) dos óxidos de ferro presentes no solo.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

## 3.2
## Teste de recuperação da mistura BTEX-Etanol através do método de extração adotado.

### 3.2.1
### Teste da eficiência de recuperação do método

A fim de avaliar a recuperação do método de extração adotado, foi realizado um teste, onde o mesmo solo utilizado nos microcosmos foi contaminado separadamente com uma solução de mesma concentração de contaminantes que a utilizada no ensaio (10.000 $mg.L^{-1}$ da mistura BTEX-Etanol em água), extraído pela metodologia de *headspace* e analisado por cromatografia gasosa. A extração foi feita em triplicata.

### 3.2.1.1
### Metodologia

A metodologia empregada para a extração e análise das concentrações de BTEX-Etanol das alíquotas de solo contaminado foi baseada em Melquiades *et al.* (2006). Algumas alterações foram feitas a fim de adaptar o método às condições de trabalho. Os detalhes da metodologia, bem como as alterações adotadas serão descritas no próximo capítulo.

*Reagentes:*

Cloreto de sódio (Proquimios)

Metanol (Isofar)

Terc-butanol (Vetec)

Ácido fosfórico (Vetec)

*Soluções:*

- Solução contaminante – como em Cruz (2002), uma mistura foi preparada a partir de 2% de benzeno (Merck), 4% de tolueno (Vetec), 3,5% de etilbenzeno (Merck), 10% da mistura de xilenos (Vetec) e completado com 80,5% de n-octano (Merck). Em seguida, 20% de etanol (Vetec) foram adicionados à solução-BTEX, seguindo a média das concentrações encontradas na gasolina brasileira. Esta solução foi então diluída em água destilada a 10.000 $mg.L^{-1}$.
- Solução modificadora – Dissolveram-se 18g NaCl em balão volumétrico de 500mL com água deionizada. O pH foi ajustado a 2,0 pela adição de ácido fosfórico concentrado a 85%.
- Metanol – Foram usados 50µL de metanol concentrado.
- Padrão interno – Foram usados 16µL de terc-butanol concentrado.

*Procedimento:*

Em um tubo com tampa de rosca e septo (15mL de capacidade) foi pesado 1g de solo não contaminado. Foi adicionado 1mL da solução contaminante, 5 mL

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

da solução modificadora, 50µL de metanol, 16 µL de padrão interno e um magneto. O tubo foi fechado e sua tampa foi vedada com parafilme. O tubo foi levado ao banho de ultrassom por 2 minutos. A amostra foi aquecida por 50 minutos em banho-maria (água) a 85°C com agitação constante. Durante os 50 minutos do aquecimento da amostra, uma seringa apropriada (gás tight syringe-HAMILTON) foi aquecida em estufa a 60°C. Foram retirados 2mL do gás proveniente do *headspace* e injetados no cromatógrafo a gás. Este procedimento foi feito em triplicata para cada tubo. Após cada corrida de amostra, uma corrida de aquecimento foi realizada para certificar a saída do vapor de água.

*Condições cromatográficas:*

A separação dos componentes BTEX foi otimizada por CG-DIC (SHIMADZU 17A) usando uma coluna Equity-1 [poli(dimetilsiloxano)], 30m x 0,25mm x 0,25lm (Supelco). Estabeleceu-se a melhor condição: temperatura inicial 35,0 ºC por 5 minutos e rampa de aquecimento 7,0 ºC $min^{-1}$ até 75,0 °C e 40,0 ºC $min^{-1}$ até 200 ºC por 2 minutos. Injetor a 200 ºC e detector a 300 ºC. Composição da chama (30:1) (ar sintético: Hidrogênio). Gás de arraste: Hélio a 1,0 mL $min^{-1}$. Split: 100.

*Curvas padrão de calibração:*

Com o objetivo de determinar as concentrações dos compostos a partir das áreas obtidas, foram preparadas soluções padrão em concentrações distintas para cada hidrocarboneto e montada uma curva de calibração. O solvente utilizado foi o mesmo utilizado na solução-mãe contaminante, o n-octano.

Para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos foram preparadas soluções de concentrações iguais a 50, 100, 200 e 500mg.$L^{-1}$. Para o etanol foram preparadas soluções nestes valores e, inclusive, de 1000 e 2000mg.$L^{-1}$.

Todas as injeções foram feitas manualmente. Para que a possível variação do volume injetado não acarretasse erros nos cálculos das concentrações, foram adicionados em cada solução 16µL de padrão interno (terc-butanol). Assim,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

qualquer alteração que ocorresse durante a análise, afetaria todos os picos de modo igual e seria eliminada a partir de uma relação de áreas.

Os padrões foram injetados no cromatógrafo na forma líquida com o uso de uma seringa de 10µL de capacidade (HAMILTON). Cada padrão foi analisado em triplicata. O valor considerado como área do composto analisado foi obtido através da média das áreas encontradas em cada injeção. As áreas dos compostos foram divididas pela área (média) do padrão interno e, em seguida, foram plotadas em curvas de calibração, sendo a abcissa representada pela concentração das soluções e a ordenada pela razão área do composto/ área do padrão interno (Gráficos 2, 3, 4 e 5).

### 3.2.1.2
### Resultado

Foi obtida uma boa resolução para a mistura de BTEX-Etanol nas condições estabelecidas no CG-DIC. Os tempos de retenção e temperatura da coluna foram observados e estão apresentados na tabela abaixo (Tab. 8):

Tabela 8 – Valores aproximados do tempo de retenção dos compostos presentes nas soluções e temperatura da coluna no momento das respectivas detecções.

| **Composto** | **T.R. (min.)** | **Temp. Col. (ºC)** |
|---|---|---|
| Metanol | 2,55 | 35 |
| Etanol | 2,77 | 35 |
| Acetona* | 2,88 | 35 |
| Benzeno | 5,00 | 40 |
| Tolueno | 8,25 | 60 |
| N-octano | 10,10 | 71 |
| Etilbenzeno | 11,42 | 114 |
| Xilenos | 11,62 e 12,10 | 114 |

*Algumas leituras apresentaram resíduo de acetona, a qual foi utilizada para a limpeza da seringa.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

As curvas de calibração obtidas para cada composto foram:

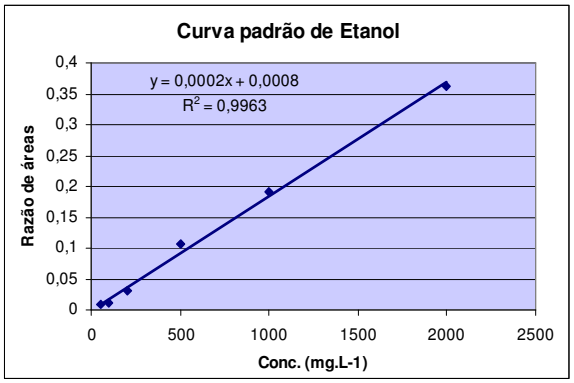


Figura 14 – Curva padrão de calibração do Etanol.

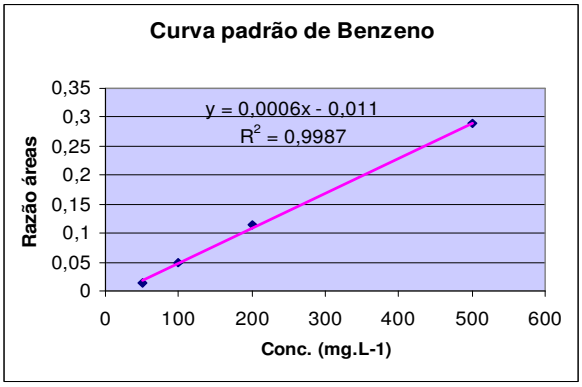


Figura 15 - Curva padrão de calibração do Benzeno.

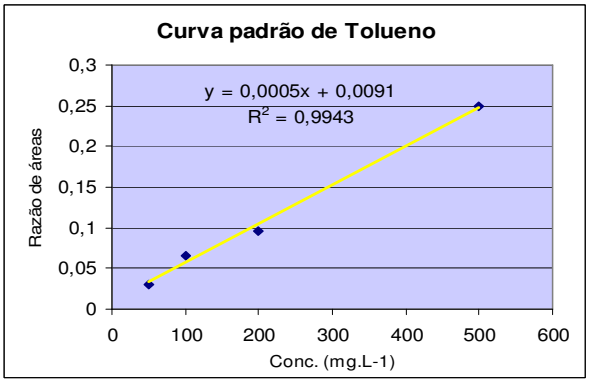


Figura 16 – Curva padrão de calibração do Tolueno.

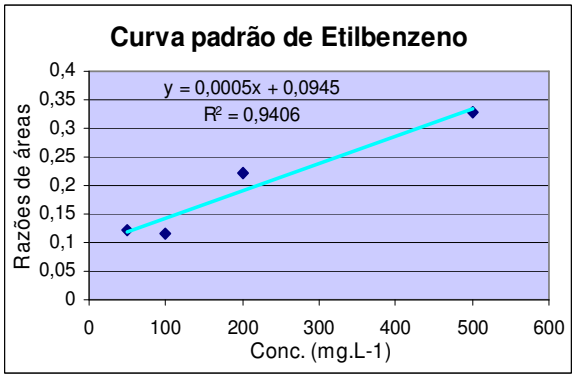


Figura 17 – Curva padrão de calibração do Etilbenzeno.

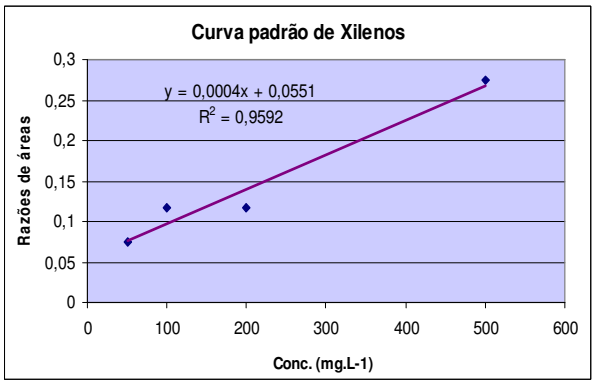


Figura 18 – Curva padrão de calibração da mistura de Xilenos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Tabela 9 – Concentrações dos contaminantes encontradas na fase gasosa após repetidas extrações da mesma amostra de solo.

| | **Etanol** | | | **Benzeno** | | | **Tolueno** | | | **Etilbenzeno** | | | **Xilenos** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $mg.L^{-1}$ | méd. | d.p. | $mg.L^{-1}$ | méd. | d.p. | $mg.L^{-1}$ | méd. | d.p. | $mg.L^{-1}$ | méd. | d.p. | $mg.L^{-1}$ | méd. | d.p. |
| **Amos.** | 92 | 94 | ±7 | 155 | 133 | ±19 | 250 | 203 | ±41 | 170 | 104 | ±58 | 302 | 221 | ±71 |
| | 102 | | | 116 | | | 170 | | | 60 | | | 166 | | |
| | 88 | | | 128 | | | 191 | | | 83 | | | 197 | | |

Foi observado na tabela 9 que, a cada injeção do conteúdo volatilizado de uma mesma amostra, havia um decréscimo nos valores de áreas obtidos, ou seja, o teste mostrou que as concentrações não se mantiveram constantes após cada uma das injeções. Isto indica que não houve tempo suficiente para se atingir o equilíbrio após a retirada de cada alíquota.

As primeiras injeções foram feitas após 50 min. de aquecimento, mas para as injeções seguintes não foi aguardado o mesmo tempo, foram processadas após o término de cada corrida anterior (aproximadamente 25min.).

Devido à ocorrência de tal fenômeno, foram consideradas, a partir de então, somente as primeiras injeções de todas as amostras analisadas. As segunda e terceira injeções passam a ter utilidade como confirmatórias do resultado da primeira, visto permanecerem dentro de uma faixa de aproximadamente 30% de diferença.

As concentrações não foram expressas em mg/Kg pois valores presentes na fase gasosa extraída não representam os teores absolutos presentes no solo, mas somente indicativos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Tabela 10 - Valores das concentrações dos BTEX-E no decorrer da análise, valores esperados, obtidos e porcentagem de recuperação.

| Compostos | BTEX % | BTEX-E 80 e 20% | Água Cont. 1% | Em 0,975g sol. (m/m) | Diluição (+5,1mL) | Conc.Esp. ($mg.L^{-1}$) | Conc.Obt. ($mg.L^{-1}$) | Recup. (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Benzeno | 2,0 | 1,6 | 0,016 | 0,0156 | 0,0031 | 3100 | 155 | 5,0 |
| Tolueno | 4,0 | 3,2 | 0,032 | 0,0312 | 0,0061 | 6100 | 250 | 4,0 |
| Etilbenz. | 3,5 | 2,8 | 0,028 | 0,0273 | 0,0054 | 5400 | 170 | 3,0 |
| Xilenos | 10,0 | 8,0 | 0,080 | 0,0780 | 0,0153 | 15300 | 302 | 2,0 |
| Etanol | 0,0 | 20,0 | 0,200 | 0,1950 | 0,0382 | 38200 | 92 | 0,2 |

Como observado na tabela 10, a recuperação dos BTEX mostrou-se baixa. Embora tenham sido utilizados solução salina e aumento de temperatura a fim de induzir a dissociação e volatilização dos compostos da água, esta baixa recuperação pode ser exacerbada pela maior retenção dos BTEX na solução em relação à fase gasosa extraída, visto que sua solubilidade em água é aumentada pelo efeito de co-solvência do etanol. A temperatura utilizada também possa ter sido insuficiente para volatilizar completamente todos os compostos, uma vez que alguns deles possuem pontos de ebulição muito mais altos que 85ºC.

Por se tratar de um solo fino, ou seja, com alto valor de área superficial específica, mesmo com baixos níveis de matéria orgânica, é esperado que parte desses compostos contaminantes seja adsorvida aos grãos de solo. Entretanto, esta justificativa não se aplica ao resultado do teste, pois nele, os contaminantes estiveram presentes em excesso. Foi adicionado 1mL da mistura de BTEX-Etanol a 10.000$mg.L^{-1}$ em água a 1g de solo natural, ou seja, o solo não foi simplesmente umedecido, mas sim inundado com a solução contaminante, na tentativa de aumentar a sensibilidade do aparelho Por mais que parte dos compostos tenha se adsorvido ao solo, este procedimento provavelmente gerou um excesso de compostos na solução, os quais ficaram em fase livre, podendo ser facilmente extraídos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.2.1.3
### Conclusão

As baixas recuperações mostram que este tipo de extração não é capaz de extrair grandes quantidades de compostos para a análise, visto que a maior parte dele fica retida na solução através da geração de um equilíbrio entre as fases ou até mesmo no solo. Consequentemente, isto gera um valor recuperado também proporcional ao conteúdo absoluto de BTEX-E na amostra. Esta dificuldade de quantificação pode indicar que o método não é adequado para analisar este tipo de amostras de solo. Para que a metodologia possa ser aceita para tal, faz-se necessário preparar uma curva de calibração nas condições do ensaio e comparar o percentual recuperado com o valor inserido, tanto em um branco quanto em amostra de solo.

O fato do teste procedido neste trabalho ter recuperado uma determinada porcentagem da concentração inicial de BTEX-E e, até mesmo, de seu resultado ter demonstrado valores percentuais numericamente similares ao do teste feito no artigo, pode estar simplesmente associado à grande quantidade de compostos que se mantiveram livres na água e não, exatamente, à extração dos mesmos da amostra de solo, o que seria o objetivo. Isto pode indicar ou que as modificações introduzidas na metodologia do teste do artigo não foram adequadas, ou até que este teste não é apropriado para avaliar amostras contendo etanol e água.

É bem provável que alguma diferença esteja ligada ao uso do etanol e grande quantidade de água na amostra analisada neste trabalho, pois o etanol aumenta a solubilidade dos BTEX em água.

Quanto à técnica de injeção da mesma amostra em triplicata, é sugerido que se aguarde o mesmo tempo de aquecimento da amostra (50 min.) na mesma temperatura (85ºC) para que haja tempo suficiente para se restaurar o equilíbrio entre as fases.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.2.2
### Teste de recuperação de BTEX-Etanol das amostras de solo.

Com o objetivo de verificar a influência do solo na extração de BTEX-Etanol na fase gasosa da amostra, bem como a das diferentes concentrações da mistura contaminante, um teste foi realizado onde foram quantificadas: a concentração de BTEX-Etanol possível de ser extraída da solução contaminante e o total possível de ser extraído em presença de solo. Todas as amostras foram extraídas três vezes consecutivas sob as mesmas condições, a fim de avaliar a repetitibilidade das concentrações extraídas.

#### 3.2.2.1
#### Metodologia

Uma curva padrão foi realizada com concentrações crescentes de BTEX-Etanol: 10.000, 2.000, 1.000, 500, 100, 50, 20mg/L. Foram analisadas amostras com solo e uma sem solo (branco). O preparo das amostras com solo foi similar ao da amostra do teste anterior, embora tenham sido utilizados apenas 300µL da água contaminada, a fim de que o solo fosse simplesmente saturado e não fosse gerado excesso de contaminante. Após a adição da solução contaminante no solo, foram aguardados 20 min. antes de iniciar o processo de extração. O branco foi preparado da mesma forma que a amostra mais concentrada, sendo que não recebeu solo.

A metodologia empregada tanto para a extração quanto para a quantificação dos compostos foi a mesma da adotada no teste anterior.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

### 3.2.2.2
### Resultado

A tabela abaixo mostra a média e o desvio padrão dos valores das concentrações relativas (área do composto/ área do padrão interno) dos BTEX-Etanol presentes na fase gasosa das amostras-padrão analisadas.

Tabela 11 – Valores de média e desvio padrão das concentrações ralativas dos BTEX-Etanol encontradas nas amostras.

| Amostras | Etanol | | Benzeno | | Tolueno | | Etilbenzeno | | Xilenos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Média | d.p. | Média | d.p. | Média | d.p. | Média | d.p. | Média | d.p. |
| Água con. | 0,0052 | ±0,0002 | 0,0011 | ±0,0001 | 0,0019 | ±0,0004 | 0,0014 | ±0,0003 | 0,0016 | ±0,0004 |
| 10.000ppm | 0,0050 | ±0,0010 | 0,0008 | ±0,0001 | 0,0016 | ±0,0002 | 0,0012 | ±0,0002 | 0,0015 | ±0,0002 |
| 2.000ppm | 0,0013 | ±0,0001 | 0,0002 | ±0,0004 | 0,0004 | ±0,0001 | 0,0002 | ±0,0001 | 0,0003 | ±0,0001 |
| 1.000ppm | 0,0007 | ±0,0002 | 0,0001 | ±0,0000 | 0,0003 | ±0,0001 | 0,0001 | ±0,0000 | 0,0002 | ±0,0001 |
| 500ppm | 0,0006 | ±0,0002 | 0,0001 | ±0,0004 | 0,0003 | ±0,0001 | 0,0002 | ±0,0001 | 0,0002 | ±0,0000 |
| 100ppm | 0,0003 | ±0,0000 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0001 | ±0,0000 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0001 | ±0,0000 |
| 50ppm | 0,0003 | ±0,0002 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0001 | ±0,0000 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0001 | ±0,0000 |
| 20ppm | 0,0005 | ±0,0003 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0001 | ±0,0000 | 0,0000 | ±0,0000 | 0,0000 | ±0,0000 |

As curvas padrão obtidas para cada composto foram:

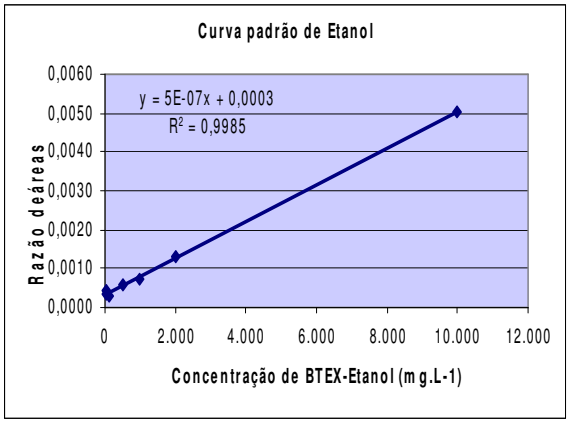


Figura 19 – Curva padrão de Etanol

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

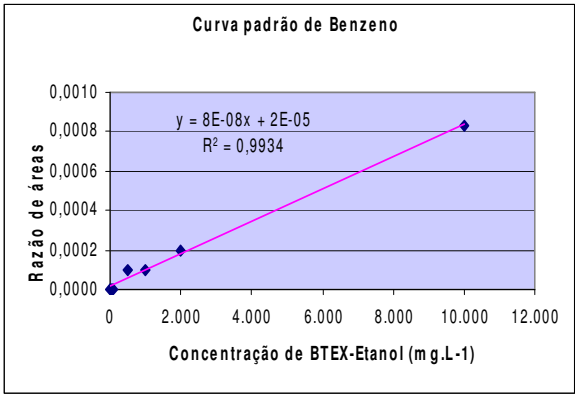


Figura 20 – Curva padrão de Benzeno

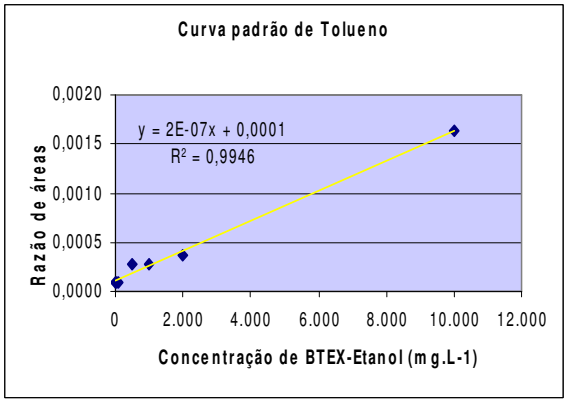


Figura 21 – Curva padrão de Tolueno

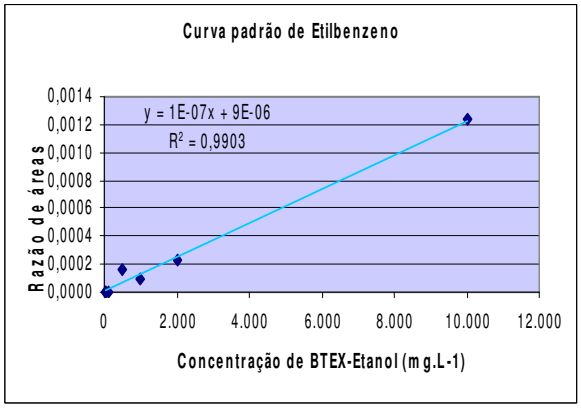


Figura 22 – Curva padrão de Etilbenzeno

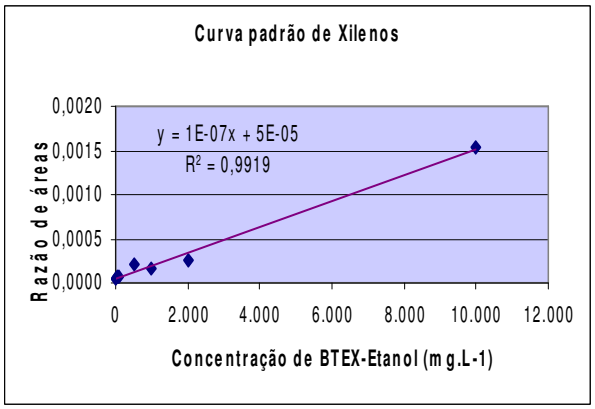


Figura 23 – Curva padrão dos Xilenos

A partir dos resultados pode-se perceber que a recuperação foi um pouco mais eficiente a partir da extração da amostra sem solo. Em relação aos valores extraídos da amostra sem solo, os percentuais recuperados da amostra com solo foram: 96% de etanol, 73% de benzeno, 84% de tolueno, 86% de etilbenzeno e 94% de xilenos.

Também foi possível verificar que o etanol teve uma maior recuperação em comparação à dos BTEX.

Os baixos valores do desvio padrão entre as triplicatas mostraram que a variação entre os resultados foi pequena.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

Foi observado que desde a concentração de 10.000mg.$L^{-1}$ até a de 500mg.$L^{-1}$ da solução contaminante a proporção da recuperação dos compostos se manteve linear, mas daí a concentrações mais baixas, a recuperação de todos os compostos deixou de ser linear e passou a ser maior que o esperado.

Em baixas concentrações de BTEX-E não foi possível detectar picos. Vale lembrar que as concentrações dos BTEX variam entre si na composição da solução contaminante.

### 3.2.2.3
### Conclusão

As concentrações dos BTEX-Etanol extraídas da água contaminada foram ligeiramente maiores que as extraídas da amostra com solo. Isto indica que pode ter ocorrido alguma adsorção dos compostos no solo.

O etanol teve maior recuperação (96%), pois dentre os compostos analisados, este é o que tem a menor possibilidade para se adsorver no solo, ficando livre na solução aquosa. Os hidrocarbonetos monoaromáticos, em geral, possuem maior afinidade para se adsorverem ao solo e menor solubilidade na água que o etanol, embora a presença deste facilite sua solubilização. Vale lembrar que as concentrações obtidas foram referentes à fase gasosa da extração das amostras, o qual mantém suas concentrações proporcionalmente ligadas à fase aquosa através de um equilíbrio físico-químico entre as fases.

Não houve grandes variações nas concentrações extraídas de uma mesma amostra quando analisadas três vezes sob as mesmas condições.

Nas extrações de amostras com concentração igual ou menor que 500mg.$L^{-1}$ de BTEX-Etanol, quanto menor a concentração presente, menor foi a retenção dos compostos na solução. Não é possível confirmar tal resultado devido à utilização de concentrações numa faixa de baixa precisão de detecção do método.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

## 3.3
## Limite de detecção

A fim de avaliar a sensibilidade do aparelho de cromatografia gasosa (GC-FID) e verificar até que ponto as medidas são confiáveis, um teste simples de detecção foi aplicado.

### 3.3.1
### Metodologia

Por duas vezes, soluções de etilbenzeno e n-octano, nas concentrações de 500, 200, 100 e 50mg.$L^{-1}$, foram preparadas com padrão interno (terc-butanol) e injetadas no cromatógrafo a gás. Cada padrão foi analisado em triplicata de injeções.

### 3.3.2
### Resultado

A partir das injeções de aproximadamente 50 mg.$L^{-1}$, os valores das áreas do etilbenzeno passaram a não se comportar de forma esperada. Alguns valores apresentavam-se iguais ou até maiores que os valores das áreas obtidas da solução de 100 mg.$L^{-1}$ (Tab. 12).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA

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.

| | | | **50mg.L$^{-1}$** | **100mg.L$^{-1}$** | **200mg.L$^{-1}$** | **500mg.L$^{-1}$** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Razão: Etilbenz./pad. interno** | 1º teste | 1ª inje. | 0,1215 | 0,1124 | 0,2430 | 0,3055 |
| | | 2ª inje. | 0,1375 | 0,1229 | 0,2412 | 0,3006 |
| | | 3ª inje. | 0,1181 | 0,1261 | 0,2515 | 0,3050 |
| | | | | | | |
| | 2º teste | 1ª inje. | 0,1235 | 0,1147 | 0,2132 | 0,3263 |
| | | 2ª inje. | 0,1207 | 0,1132 | 0,2290 | 0,3235 |
| | | 3ª inje. | 0,1241 | 0,1165 | 0,2211 | 0,3325 |

## 3.3.3
## Conclusão

Uma vez que não eram mais confiáveis os valores de áreas resultantes da injeção de 50mg. L$^{-1}$ de etilbenzeno, esta concentração foi estabelecida como limite de detecção, considerando-se não confiáveis os valores inferiores a este.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0710732/CA