

### 3

## Materiais e Métodos

No presente capítulo são descritos os materiais utilizados e as metodologias adotadas nas análises químicas e microbiológicas deste programa experimental. Além da metodologia adotada para amostragem de solo indeformado e como foi realizada sua contaminação.

### 3.1. Projeto Experimental

O projeto experimental consiste na análise comportamental da degradação e do contaminante em blocos não saturados indeformados de solo arenoso e siltoso, oriundos do município de Duque de Caxias – RJ, submetidos a um pulso de contaminante.

Foram preparadas duas soluções distintas: uma contendo 2% de benzeno, 4% de tolueno em heptano (BT) e a mesma solução adicionada etanol 20% (BTE). Para cada bloco foi preparado 1L de solução. Os blocos EA e ES receberam solução com etanol e os blocos BA e BS a sem etanol.

Para preparação da solução BT utilizou-se uma proveta de vidro (500 mL) que foi preenchida com 497 mL de heptano e em seguida, foram adicionados através de pipetador 1 mL de benzeno e 2 mL de tolueno. Da mesma forma, para preparação da solução BTE utilizou-se uma proveta de vidro (500 mL) que foi preenchida com 397.6 mL de heptano, 100 mL de etanol, além de 0.8 mL de benzeno e 1.6 mL de tolueno.

A contaminação dos blocos de solo indeformado se deu de cima para baixo com um único pulso de 1L de contaminante. Um anel metálico com cerca de 20 cm de diâmetro foi cravado na superfície superior do bloco a fim de delimitar a entrada de contaminante e evitar eventuais efeitos de borda (Figura 9).



Figura 9: Contaminação dos blocos indeformados utilizando anéis metálicos.

Todos os blocos de solo indeformado foram contaminados em um mesmo dia, representando o tempo inicial zero. Após a contaminação os blocos foram devidamente parafinados para que não houvesse maiores perdas dos contaminantes por volatilização.

Esta etapa de contaminação foi executada de modo a proporcionar a melhor distribuição do contaminante ao longo da altura dos blocos.

A contaminação e monitoramento dos blocos ao longo do tempo foram realizados na área experimental externa do Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio. Trata-se de uma área coberta que está a temperatura ambiente.

Foram realizados ensaios de caracterização física contemplando análise granulométrica, densidade específica dos grãos, matéria orgânica, limites de consistência e permeabilidade nos solos oriundos dos quatro blocos. Além de análises químicas, microbiológicas, de carbono disponível (C disp), umidade (w) a partir da constante dielétrica ( $K_a$ ) e concentração dos contaminantes.

### **3.2.Caracterização dos Solos**

Como citado no item anterior, foram estudados dois tipos de solo. Houve a coleta de quatro amostras de solo representativas de duas feições silto-arenosas (ES e BS) e de duas areno-siltosa (EA e BA).

Os quatro blocos de solo indeformados foram obtidos com auxílio de técnicos do Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente. As dimensões dos blocos foram de 30 cm x 30 cm x 30 cm.



Figura 10: Moldagem dos blocos em campo.

Ao final da amostragem os blocos foram envoltos com filme de PVC e papel laminado para manutenção da umidade e integridade dos blocos. Após dois dias da retirada dos blocos, eles foram levados à câmara úmida do Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio, onde ficaram por um dia até serem levados à área experimental externa do laboratório e enfim serem parafinados para maior manutenção das condições naturais encontradas no solo do campo experimental.

### 3.2.1. Caracterização Física

O solo da região de Duque de Caxias-RJ já é objeto de estudos anteriores do Laboratório de Geotecnia da PUC-Rio, as feições arenosas e siltosas desse local já foram definidas anteriormente. A partir dessa informação, foram retirados os blocos de cada feição.

A caracterização física dos solos oriundos dos quatro blocos indeformados foi realizada no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio por meio de ensaios usuais da geotecnia que permitem a descrição das propriedades índice dos solos.

Foram executados ensaios de granulometria por peneiramento e por sedimentação, densidade específica dos grãos, matéria orgânica e limites de

consistência a partir de solo deformado. Todos os ensaios foram regidos de acordo com as seguintes recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- NBR 7181/1984 – Análise Granulométrica.
- NBR 6459/1984 – Determinação do Limite de Liquidez.
- NBR 7180/1984 – Determinação do Limite de Plasticidade.
- NBR 6508/1984 – Massa Específica Real dos Grãos.
- NBR 13600/1996 – Determinação do Teor de Matéria Orgânica por Queima a 440 °C.

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados dos ensaios de caracterização geotécnica e índices físicos e na Figura 11 encontram-se as curvas granulométricas.

Tabela 1: Caracterização geotécnica dos solos oriundos dos blocos EA, ES, BA e BS.

Bloco	Gs (g/m <sup>3</sup> )	MO (%)	Granulometria (%)				Limites de Atterberg (%)		
			Argila	Silte	Areia	Pedreg	LL	LP	IP
EA	2.76	0.20	21.5	23.7	53.1	1.7	55.9	43.7	12.2
BA	2.69	0.40	42.3	36.2	21.0	0.5	64.5	42	22.5
ES	2.61	0.40					55.4	37.7	17.8
BS	2.77	0.38					58.3	40.8	17.5

Gs – Densidade relativa dos grãos; MO – Matéria orgânica; LL – Limite de Liquidez; LP – Limite de Plasticidade; IP- Índice de Plasticidade.

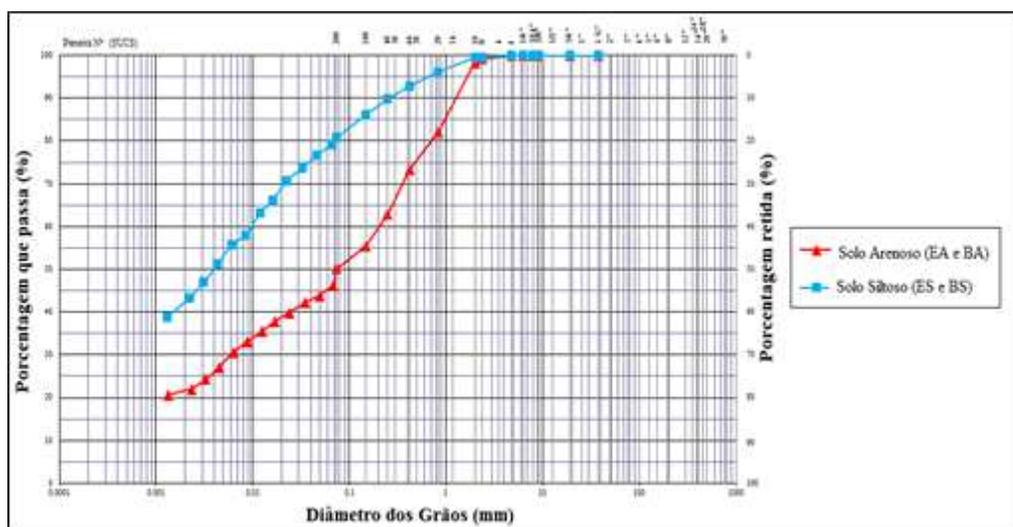


Figura 11: Curva granulométrica do solo dos blocos EA, ES, BA e BS.

### **3.2.2. Caracterização Microbiológica**

#### **3.2.2.1. Atividade Degradadora Total**

A maior parcela da atividade enzimática no solo vem da atividade enzimática degradadora de plantas e microrganismos. O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto reconhecido e hidrolisado pela maioria das endo- e exoenzimas; sua degradação forma fluoresceína, uma molécula colorida mensurável por espectrofotometria. Como uma capacidade significativa de hidrolisar FDA é encontrada em fungos e bactérias, a hidrólise de FDA, portanto, nos fornece uma medida precisa da atividade degradadora total da microbiota (Österreicher-Cunha et al., 2007).

O método adotado foi descrito por Adam & Duncan (2001) e Green et al. (2006) e modificado por Österreicher-Cunha et al. (2007). Ele nos fornece uma indicação da biodegradabilidade intrínseca da amostra, correspondendo à atividade degradadora de bactérias e fungos existentes essencialmente devido à natureza da microbiota do solo utilizado.

#### **Metodologia do Ensaio**

Todo o material utilizado no ensaio foi esterilizado em autoclave (Sieger) a 121 °C com pressão de 1,1 atm durante 12 min. A esterilização do material garante que os resultados mostrarão os efeitos da ação microbiana no solo e não terão interferência de agentes externos. As análises microbiológicas foram feitas em ambiente estéril (fluxo laminar).

As amostras dos quatro blocos de solo indeformado foram analisadas em triplicatas e um branco. Um controle de hidrólise química permitiu analisar a hidrólise ocasionada pela própria reação entre tampão e solução FDA, que deve ser desconsiderada na análise da hidrólise ocasionada pela ação das bactérias do solo.

Foram adicionados 15 mL de solução tampão fosfato em cada tubo Falcon, esterilizados em autoclave. Já estéreis e no interior do fluxo laminar, alíquotas de 2 ou 3 g de solo (Figura 12) foram adicionados a cada tubo Falcon.

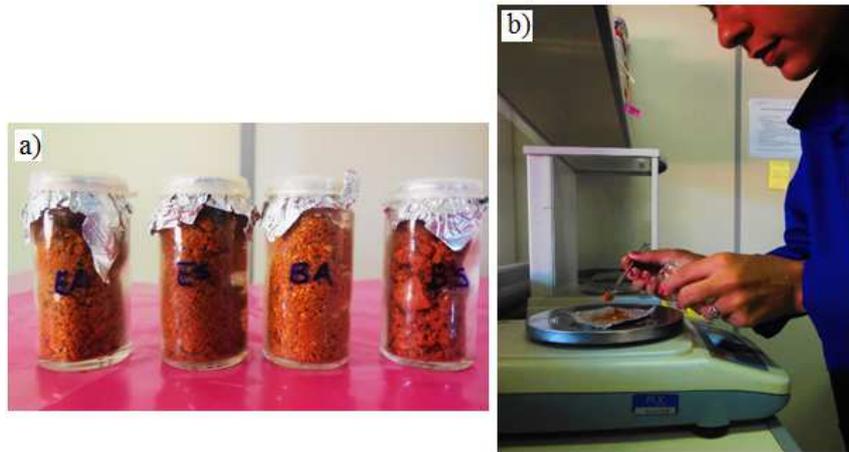


Figura 12: a) Amostras de solo de cada um dos quatro blocos indeformados (EA, ES, BA e BS) e; b) pesagem das alíquotas para o ensaio.

Na sequência, adicionaram-se 200 $\mu$ L de solução FDA a cada tubo Falcon com exceção dos brancos (Figura 13). A incubação variou de 30 a 40 minutos a uma temperatura de 30 °C em estufa.

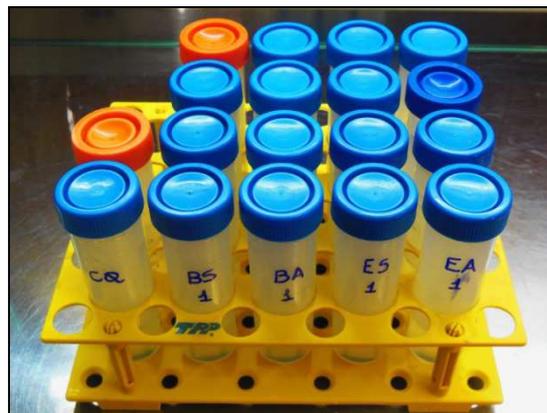


Figura 13: Tubos Falcon esterilizados contendo 15 mL de solução tampão fosfato utilizados para o ensaio de FDA.

A reação foi interrompida em capela de exaustão com a adição de 15 mL de solução Clorofórmio-Metanol 2:1 a cada tubo Falcon, ligeiramente agitados (Figura 14). As suspensões de solo foram filtradas com filtro quantitativo (filtro C42 faixa azul) e o volume de filtrado medido.



Figura 14: Processo de filtragem no interior da capela de exaustão

Com o volume de filtrado conhecido, a fluoresceína formada durante a incubação foi quantificada em espectrofotômetro a 490 nm (Kasuari) em cubetas de quartzo. Os resultados são dados em função da curva padrão pré-estabelecida.

### Preparo de Soluções e Reagentes

- Solução Clorofórmio-Metanol 2:1:

Uma parte de metanol P.A. (Vetec) com duas partes de clorofórmio P.A. (Vetec).

- Solução Tampão Fosfato:

8.7 g de  $K_2HPO_4$  (Vetec) e 1.3 g de  $KH_2PO_4$  (Vetec) em 1000 mL de água destilada.

- Solução FDA:

0.1 g de FDA em 100 mL de acetona P.A. (Vetec).

### Curva Padrão do Espectrofotômetro

A curva padrão do equipamento foi feita a partir de concentrações crescentes de sal de fluoresceína, preparadas a partir de uma solução padrão. As concentrações estipuladas foram 0.3; 0.6; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0; 4.0  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ . A solução padrão foi preparada por duas vezes a partir da mesma solução estoque e

foram medidas duas absorvâncias para cada concentração estipulada, sendo a média utilizada para construção do gráfico. Na Figura 15 a seguir estão dispostos os resultados das absorvâncias médias e a equação da reta encontrada.

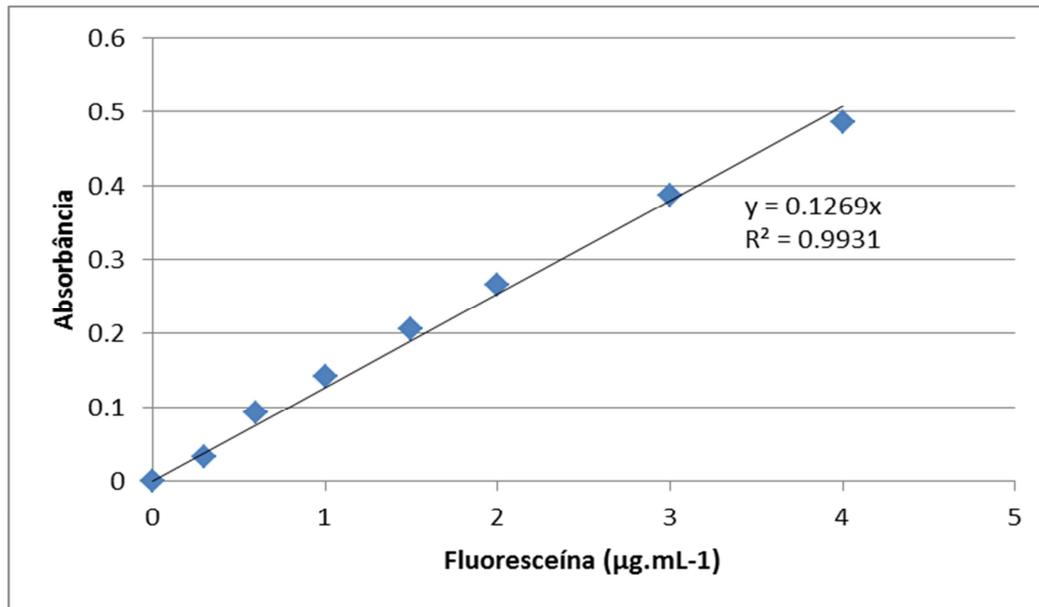


Figura 15: Curva padrão do espectrofotômetro.

### Preparo de Soluções

Todas as soluções e reagentes utilizados foram preparados seguindo especificações técnicas que serão descritas a seguir.

- Fluoresceína  $2000 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  (Solução estoque):  
São dissolvidos 0.2265 g de sal de fluoresceína em 80 mL fosfato de potássio (60 mM) em pH 7.6. Completa-se para 100 mL.
- Fluoresceína  $20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  (Solução padrão):  
A solução estoque é diluída em 100 mL de fosfato de potássio (60 mM).

### Resultados

Para essas amostras de solo, oriundas de cada um dos quatro blocos, foram obtidas quatro dias após retirada dos blocos indeformados do talude de corte em

Duque de Caxias. A manipulação das amostras de solo para essa análise foi realizada com materiais estéreis.

Os resultados obtidos para a caracterização dos solos antes da contaminação, que se encontram na Tabela 2 a seguir, mostraram, em geral, baixa atividade. Essa primeira análise microbiológica detectou que as atividades já se apresentavam abaixo dos níveis geralmente encontrados para esses solos no mesmo período do ano, em torno de  $0.20 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  para o solo siltoso e  $0.30 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  para o arenoso (Österreicher et al, 2012).

Tabela 2: Atividade Microbiana dos diferentes blocos quatro dias após a retirada do campo experimental de Duque de Caxias.

<b>Bloco</b>	<b>Atividade Microbiana</b> ( $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ )	<b>Desvio</b> <b>Padrão</b>
<b>EA</b>	0.0000	$\pm 0.0000$
<b>ES</b>	0.0983	$\pm 0.0518$
<b>BA</b>	0.0060	$\pm 0.0104$
<b>BS</b>	0.0317	$\pm 0.0337$

### 3.2.2.2. Carbono Disponível

O carbono disponível é a fonte de carbono mais acessível para a microbiota, assim sendo, sua quantificação auxilia na análise de sua relação com a manutenção da atividade celular.

#### Metodologia do Ensaio

A determinação do carbono disponível é realizada através da reação de oxidação com permanganato de potássio, segundo protocolo desenvolvido por Tirol-Padre & Ladha (2004), modificado da metodologia original de Blair et al. (1995).

## Resultados

Amostras de solo, de cada um dos quatro blocos, foram obtidas um dia antes da contaminação dos blocos indeformados. A manipulação das amostras de solo para essa análise foi realizada com materiais estéreis. Os resultados obtidos para a caracterização dos solos antes da contaminação quanto à quantificação de carbono disponível, se encontram na Tabela 3 a seguir. A coluna contaminante é apenas para indicar o tipo de contaminante que foi utilizado posteriormente naquele bloco.

Tabela 3: Carbono disponível dos diferentes blocos um dia antes da contaminação.

<b>Contaminante</b>	<b>Arenoso</b> (mg x g <sup>-1</sup> )	<b>Siltoso</b> (mg x g <sup>-1</sup> )
<b>BTE<sup>1</sup></b>	0.109	0.213
<b>BT<sup>2</sup></b>	0.106	1.133

<sup>1</sup>mistura benzeno, tolueno e etanol; <sup>2</sup>mistura benzeno e tolueno.

Os blocos arenosos apresentam concentração de carbono disponível semelhantes entre si enquanto um dos blocos siltosos apresenta concentração superior aos outros.

### 3.2.2.3. Perfil Metabólico

As comunidades microbianas reagem aos seus ambientes, logo à quantidade de água, pH, fontes de carbono entre outros. O consumo de fontes disponíveis apresenta um perfil de utilização, sendo assim, o padrão de utilização dos nutrientes do meio determinam o perfil metabólico daquela população. Quando há alguma mudança no meio, diversas atividades dessa população podem mudar, por isso, uma das formas de se avaliar o impacto na comunidade microbiana é avaliando o perfil metabólico dessas (CLPP - Community Level Population Profiling). Nesse estudo foram utilizadas as fontes de carbono de interesse descritas na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Fontes de carbono de interesse utilizadas para traçar o perfil metabólico da microbiota dos solos estudados.

<b>Fontes de Carbono</b>	<b>Sigla</b>	
<b>Aminoácidos</b>	L-iso-leucina	F1
	L-leucina	F2
	L-alanina	F3
	L-arginina	F4
<b>Açúcares</b>	D-manose	F5
	Dextrose	F6
<b>Ácidos Orgânicos</b>	Acetato de Sódio	F7
<b>Triptona</b>		F8

Esse experimento foi realizado com objetivo de entender melhor as comunidades de bactérias do solo estudado, já que durante toda a pesquisa as atividades microbianas foram consideradas muito baixas quando comparadas com estudos do solo daquela mesma região.

A análise de CLPP é baseada na detecção fluorométrica do consumo de oxigênio das amostras pelo uso de fontes de carbono com incubação prévia. A taxa e extensão das respostas das amostras incubadas com fontes específicas foram medidas pela limitação, através da colocação de um adesivo impermeável sobre a boca dos poços, de oxigênio disponível nos poços da microplaca de cultura de células.

O sistema de biossensores de oxigênio é baseado em um  $O_2$  – fluoróforo sensível, 4,7-difenil-1 e 10-fenantrolina rutênio (II) cloreto, absorvidos em uma matriz de silicone que é permeável a  $O_2$ . A fluorescência ocasionada pelo rutênio é extinta pela presença de  $O_2$ , logo o sinal vindo do complexo de gel fluoróforo colocado no fundo dos poços da microplaca aumenta em resposta a respiração da amostra sobrejacente.

O esquema do experimento consistiu em dispor de solos do mesmo bloco em fileiras consecutivas e as oito fontes foram dispostas em oito colunas (Figura 16), na nona coluna foi colocada água estéril (controle) junto ao solo e a décima coluna também foi analisada para fins de normalização dos resultados, já que se trata de uma fileira vazia.

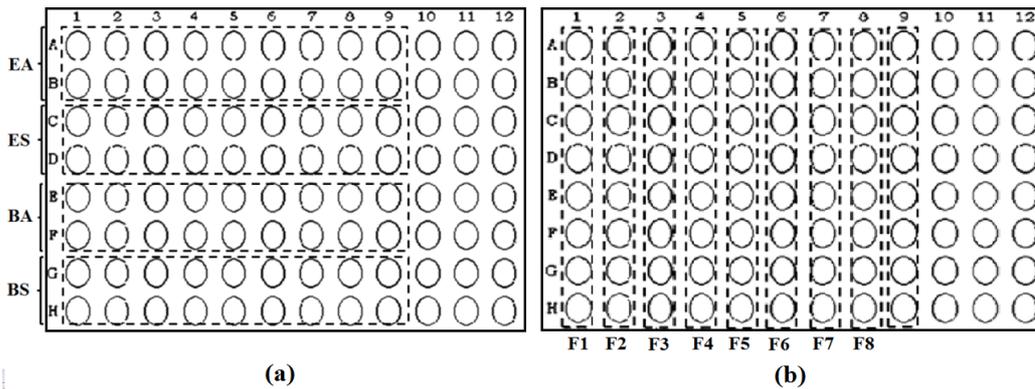


Figura 16: Esquema da disposição dos solos e das fontes na microplaca de cultura de células. (a) Disposição dos solos oriundos dos blocos EA, ES, BA e BS. (b) Disposição das fontes de carbono, sendo a última coluna pontilhada preenchida por água destilada estéril (controle).

### Metodologia do Ensaio

Inicialmente foram preparados 100 mL de cada solução de fonte de carbono em água estéril (100 mg/L) e esterilizado mediante filtração com membrana de 0.20  $\mu\text{m}$ .

Para cada amostra, foi preparado um tubo Falcon com 25 mL de tampão fosfato (10 mM) e aproximadamente 5 mL de esferas de vidro que foram na sequência autoclavados. Após a autoclavagem, cada tubo recebeu uma quantidade de solo de aproximadamente 5 g oriunda das amostras de solo de cada um dos quatro blocos previamente umedecidos com 10% de água, em relação à quantidade de solo, e incubado por 48 horas na estufa a 30°C.

Em uma placa de diluição estéril (poços de 2 mL), como indicado na Figura 17, foram preenchidas duas linhas com o mesmo solo de cada uma das quatro soluções (tampão + solo) preparada nos tubos Falcon citados acima, totalizando um total de oito poços preenchidos.

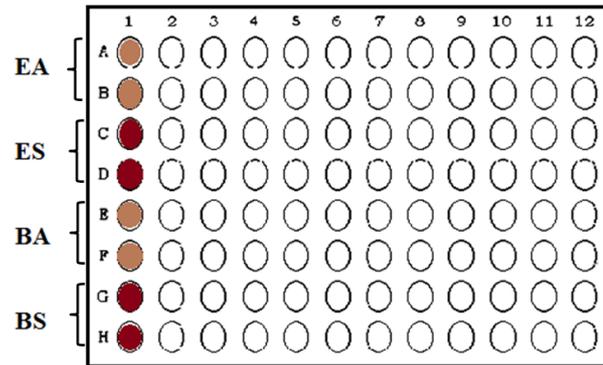


Figura 17: Esquema de disposição dos solos na placa de diluição estéril, com poços de 2 mL, antes dos solos serem pipetados para microplaca BDOS.

No fluxo laminar, foram preparadas as microplacas preenchendo cada poço das oito colunas com 50  $\mu$ L de cada fonte de carbono e a última com água destilada estéril (Figura 16 (b)).

Com o pipetador multicanal, foram transferidos 160  $\mu$ L da coluna da placa de diluição para as colunas preenchidas com fontes de carbono da microplaca BDOS. Por fim, a placa foi colocada para incubar a 30 °C no fluorímetro (PerkinElemer Victor X2) por 24 a 72 horas (em função da evolução) com leituras pelo fundo das placas a cada hora (excitação 485/20 nm, emissão 600/40 nm).

## Resultados

O perfil metabólico dos blocos foi caracterizado para que se pudesse ter um parâmetro comparativo entre as duas fases do ensaio, antes e após a contaminação.

A Figura 18 ilustra em forma de gráficos o perfil metabólico de cada bloco um dia antes da contaminação dos mesmos através dos níveis de estabilização de cada fonte de carbono atingidos durante a análise. Na Figura 19 estão dispostos os tempos, em forma de horas, em que cada fonte de carbono se estabilizou para cada bloco.

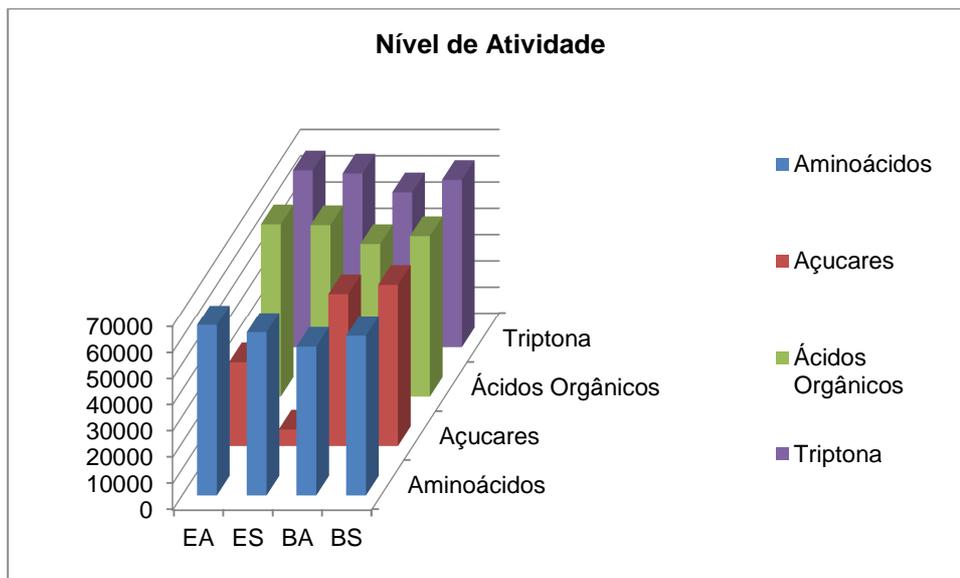


Figura 18: Níveis de atividades atingidos na estabilização para cada fonte de carbono em cada bloco de solo.

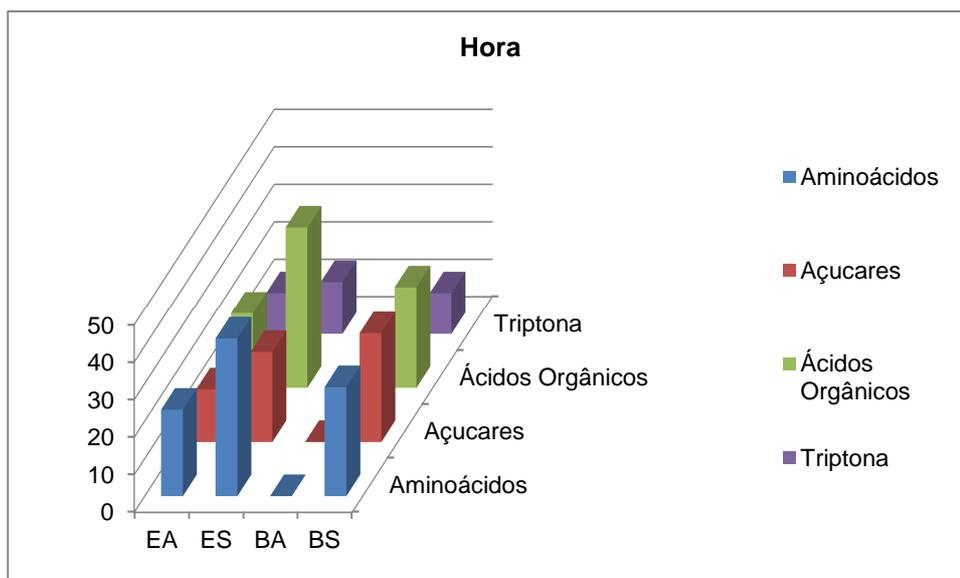


Figura 19: Tempo transcorrido para que os níveis de atividades atingissem a estabilização para cada fonte de carbono em cada bloco de solo.

A partir da análise do perfil de consumo podemos notar que com exceção dos açúcares as outras fontes de carbono tiveram valores de estabilização aproximados, porém com *lag time* distinto. Nesse momento, não conseguimos detectar semelhanças no perfil de consumo entre os blocos com o mesmo tipo solo.

### 3.3.Monitoramento

Após a contaminação (dia 0) se deu início ao período de monitoramento que teve duração de 148 dias, durante os quais houve análises de umidade (TDR), atividade degradadora total (FDA), concentração de contaminantes (Química), carbono disponível (C disp) e perfil metabólico da microbiota (CLPP). Para melhor compreensão, a Tabela 5 abaixo apresenta os dias e as faces das quais foram retiradas amostras para o monitoramento.

Tabela 5: Análises realizadas no período de monitoramento.

Dias	Face	TDR <sup>1</sup>	ADT <sup>2</sup>	Cdisp <sup>3</sup>	CLPP <sup>4</sup>	Química
<b>0</b>	Topo			X		X
<b>1</b>	1		X			
<b>7</b>	3		X			
<b>14</b>	4		X		X	
<b>20</b>	1	X	X			X
<b>26</b>	2		X			
<b>37</b>	3	X	X		X	X
<b>43</b>	4	X	X	X		
<b>50</b>	1	X	X			
<b>64</b>	2	X	X			
<b>71</b>	3	X	X		X	
<b>77</b>	4		X			
<b>96</b>	1	X	X	X		
<b>107</b>	2	X	X			
<b>119</b>	3	X	X			
<b>133</b>	4	X	X	X		
<b>148</b>			X		X	

<sup>1</sup>TDR: Reflectometria no Domínio do Tempo; <sup>2</sup>ADT: Atividade Degradadora Total; <sup>3</sup>Cdisp: Carbono disponível; <sup>4</sup>CLPP: *Community Level Population Profiling*.

### 3.3.1. Reflectometria no Domínio do Tempo (TDR)

O TDR tem sido utilizado como um método para medida da constante dielétrica pela determinação do tempo de trânsito de um pulso eletromagnético lançado ao longo de sondas metálicas paralelas inseridas no solo. Análises teóricas e correlações experimentais mostram que o tempo do pulso é proporcional à constante dielétrica aparente. Esse parâmetro físico é fundamental e está diretamente correlacionado com a umidade do solo.

Como a água tem constante dielétrica relativa (81) bem maior que a dos materiais do solo (3 a 5), do ar (1), benzeno (2.3) e tolueno (2.38), quanto maior o conteúdo de água do solo, maior será a sua constante dielétrica aparente. A grande disparidade do valor da constante dielétrica da água em relação aos materiais do solo e contaminantes estudados aqui permite a sua determinação através desta técnica, uma vez que a maior parte do efeito do retardamento do pulso na antena é decorrente do conteúdo de água do solo (Tommaselli et al., 2011).

As constantes dielétricas ( $K_a$ ) e umidades volumétricas ( $w$ ) foram determinadas com o Theta Probe<sup>TM</sup> (Delta Instruments) - TDR. O instrumento foi inserido nos locais de coleta, e anteriormente a ela, para amostragens de solo para análise de FDA (Figura 20). Foram feitas medições antes e após à contaminação.



Figura 20: Uso do TDR antes da amostragem de solo.

### Calibração do TDR

A umidade do solo foi determinada a partir dos valores de constante dielétrica aparente. Para sua determinação, foi realizada a calibração do TDR (relação entre o conteúdo de água e a constante dielétrica aparente do solo) para cada um dos dois tipos de solo utilizados no experimento. A calibração consistiu em medidas com TDR periódicas em blocos de solo siltoso e arenoso concomitantemente à coleta para verificação do peso seco das amostras que foram mensuradas com TDR. As curvas de calibração para solo siltoso e arenoso podem ser verificadas nas Figuras 21 e 22.

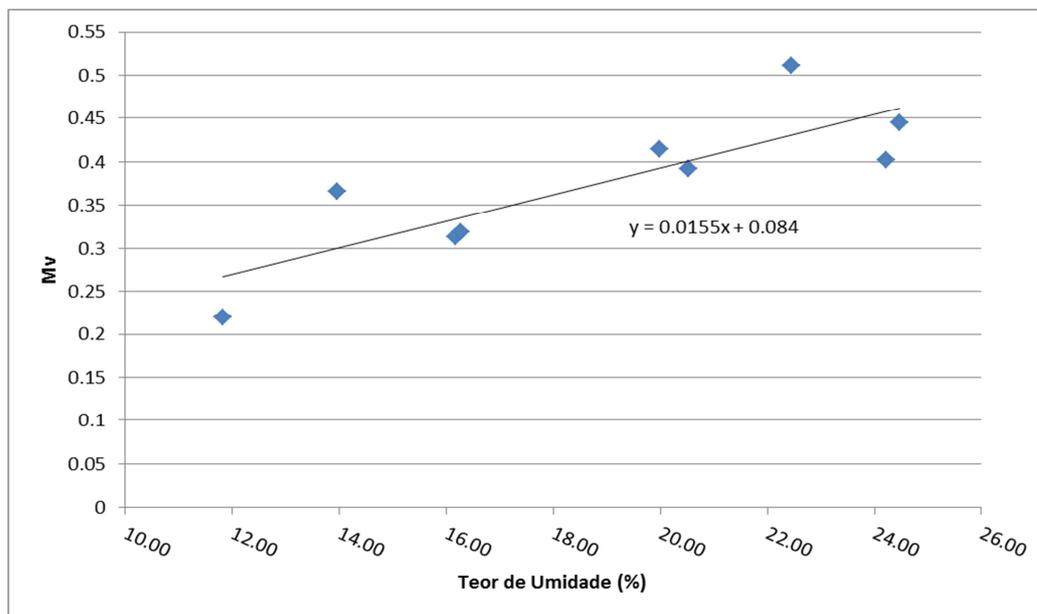


Figura 21: Curva de calibração do TDR para o solo siltoso.

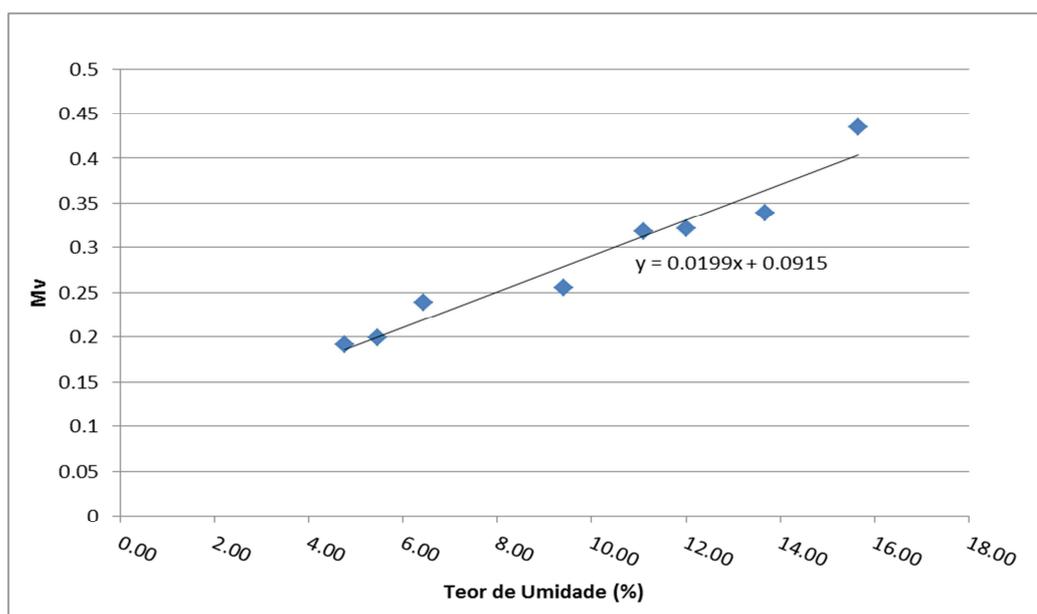


Figura 22: Curva de calibração do TDR para o solo arenoso.

### 3.3.2. Microbiologia

#### 3.3.2.1. Atividade Degradadora Total

A atividade degradadora total da microbiota foi determinada pelo método de medida de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito no item 3.2.2.1.

#### 3.3.2.2. Carbono Disponível

O carbono disponível da microbiota foi determinado segundo método descrito no item 3.2.2.2.

#### 3.3.2.3. Perfil Metabólico

Os perfis metabólicos das microbiotas dos solos foram realizados segundo método descrito no item 3.2.2.3.

#### 3.3.3. Concentração de Contaminantes

As amostras de solo para determinação da concentração dos contaminantes, assim como as análises microbiológicas, foram coletadas segundo um ordenamento de faces. A sequência de amostragem respeitou a sequência numérica das faces. As faces dos blocos foram numeradas de 1 a 4 (Figura 23) e, para evitar maiores perturbações à microbiota do solo, as coletas sequenciais seguiram essa ordem crescente.

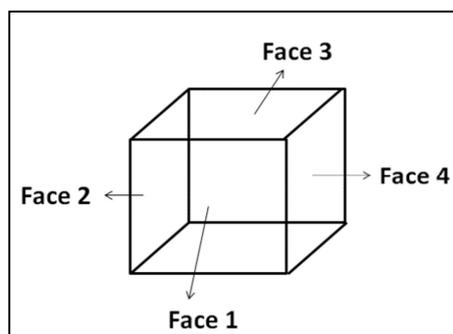


Figura 23: Sequência de amostragem seguindo o número sequencial das faces.

### 3.3.3.1. Metodologia para extração do BTE

Tarar em uma balança um tubo de rosca com 15 mL de capacidade com um magneto inserido e pesar 1 g de solo contaminado. Adicionar 50 µL de metanol ao solo e, em seguida, 5 mL de solução modificadora.

#### Preparo de Soluções e Reagentes

Para realizar a extração de BTE do solo foram utilizados a solução modificadora e o metanol, o preparo e quantidades utilizados estão descritos na sequência.

- Solução Modificadora:  
Dissolver 18 g de NaCl em balão volumétrico de 500 mL com água deionizada. O pH deve ser ajustado a 2.0 pela adição de ácido fosfórico concentrado a 85%
- Metanol:  
Utilizar 50 µL de metanol concentrado.

### 3.3.3.2. Análise de Benzeno, Tolueno e Etanol (BTE)

As concentrações dos compostos benzeno, tolueno e etanol no solo ao longo do período do experimento são fundamentais para que sejam comparadas aos valores de atividade degradadora da microbiota do solo. Assim pode-se ter uma melhor avaliação da real condição de biodegradação do contaminante no solo. O método de extração e de análise por cromatografia gasosa adotado foi descrito por Fernando (2009) a partir de Melquíades et al. (2006) e consiste, resumidamente, na separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido) e uma fase móvel (gás). A cromatografia gasosa é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300 °C e que termicamente estáveis.

### 3.4. Abertura dos Blocos

A abertura dos blocos se deu através da segmentação do solo indeformado, primeiramente no meio, dividindo faces 1 e 3 em duas partes e posteriormente as faces 2 e 4 em mais duas partes gerando ao final 4 blocos de cada bloco principal (Figura 24). Essa metodologia de segmentação do bloco permitiu acesso para a retirada de amostras de cada bloco em sua parte central.

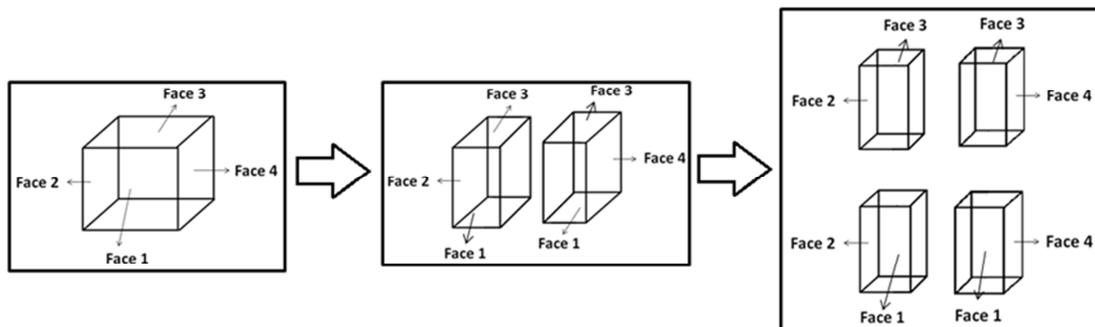


Figura 24: Metodologia adotada para segmentação dos blocos de solo indeformados.