

# Quantificação de Benzo(a)Pireno [B(a)P] por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação

## *Measurement of Benzo(a)Pyrene [B(a)P] by GC-MS in soils next to thermoelectric plants using biorremediation processes*



**Priscila Santos Marques Possamai**

Graduação em Química Bacharelado (Unilasalle)  
[pri\\_unisinos@yahoo.com.br](mailto:pri_unisinos@yahoo.com.br)

**Matheus Souza Spagiari**

Graduação em Química (Unilasalle)  
[souzaspa@hotmail.com](mailto:souzaspa@hotmail.com)

**Dafne Quintas Waszak**

Mestrado em andamento em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (UFRGS). Graduação em Química Unilasalle)  
[dafnequintas@hotmail.com](mailto:dafnequintas@hotmail.com)

**Delmar Bizani**

Doutor e mestre em Ciências Veterinárias (UFRGS). Professor dos cursos da área da saúde e do PPG em Avaliação de Impactos Ambientais (Unilasalle). Consultor - Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Rio Grande do Sul (Sebrae/RS).  
[delmar@unilasalle.edu.br](mailto:delmar@unilasalle.edu.br)

**Ana Cristina Borba da Cunha**

Doutora em Química (UFRGS). Mestre em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (UFRGS). Professora e coordenadora do curso de graduação em Química e professora PPG em Avaliação de Impactos Ambientais (Unilasalle).  
[aanacunha@hotmail.com](mailto:aanacunha@hotmail.com)

Recebido para publicação em dezembro de 2010.

Aprovado para publicação em junho de 2011.

### Resumo

Com a consolidação e crescimento da consciência ecológica em nível mundial, a pressão pela gestão racional e ambientalmente adequada dos recursos e do espaço natural estendeu-se ao setor privado, que passou a desenvolver, de forma complementar aos instrumentos de gestão pública, instrumentos de adoção voluntária como a auditoria ambiental e o sistema de gestão ambiental. Nesse trabalho foi estudado de forma exploratória o potencial da utilização dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *B. subtilis* na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's - Benzo(a)Pireno).

**Palavras-chaves:** Termelétrica; solo; Benzo(a)Pireno; biorremediação.

### Abstract

With further building of the ecological awareness within a worldwide perspective, the pressure for rational and adequate environmental management of resources and natural spaces extended to the private sector, which has developed voluntary adoption management tools such as environmental auditory and environmental management system. This paper studied in a exploratory perspective the potentiality of use of the micro-organisms *Pseudomonasaeruginosa* and *B. Subtilis* in relation to the degradation of aromatic polycyclic hydrocarbonets (HPA's - Benzo(a)Pyrene).

**Keywords:** Thermoelectric; soil; Benzo(a)Pyrene; bioremedy.

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

*Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.*

**Introdução**

As preocupações com a preservação e a recuperação do meio ambiente, ganharam forças nos anos 1960 e 1970 e vêm crescendo desde então, principalmente em países industrializados, devido à conscientização desenvolvida nessas sociedades sobre a importância da qualidade ambiental para a preservação da vida. A partir de então, as leis de combate à poluição começaram a ser sistematizadas em alguns países. As primeiras eram de caráter corretivo e voltavam-se essencialmente, para o controle da poluição decorrente das atividades de produção industrial. O reconhecimento de que a qualidade do solo também pode significar um problema para a saúde pública, além de poder apresentar riscos aos ecossistemas, só se consolidou muito depois, quando comparado à poluição das águas e do ar (DEOTTI, 2005).

Com a consolidação e crescimento da consciência ecológica em nível mundial, a pressão pela gestão racional e ambientalmente adequada dos recursos e do espaço natural estendeu-se ao setor privado, que passou a desenvolver, de forma complementar aos instrumentos de gestão pública, instrumentos de adoção voluntária como a auditoria ambiental e o

sistema de gestão ambiental. O termo poluição do solo é normalmente associado à presença de substâncias que, de alguma forma, alteram negativamente a sua qualidade. Podendo assim afetar a qualidade das águas subterrâneas, a fauna e a flora da região ou, ainda, representar risco à população que tem contato, direto ou indireto, com o mesmo (DEOTTI, 2005).

A recuperação de áreas degradadas vem se configurando como um desafio, uma vez que experimentos com remediação têm mostrado que a recuperação total destas áreas, na maioria dos casos, não é possível de ser alcançada por limitações técnicas, por demandar muito tempo e necessitar, muitas vezes, de recursos financeiros não disponíveis para tal reabilitação. A denominação “técnicas de remediação” engloba todas as técnicas que preveem a recuperação de uma área contaminada pelo bloqueio parcial ou total do caminho do contaminante ou pela sua remoção, diminuição ou eliminação do potencial tóxico do contaminante (DEOTTI, 2005).

Existem algumas tecnologias que permitem a recuperação ou remediação de solos contaminados ou degradados. Tais tecnologias se baseiam nas propriedades

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.

químicas de substâncias ou processos físicos que serão utilizados para retenção, mobilização ou destruição de um determinado contaminante presente no solo. Estas tecnologias podem ser aplicadas *in situ*, isto é, no local da contaminação, ou *on/off-site*, isto é, primeiramente removendo o material contaminado para outro local. (AMBIENTEBRASIL, 2010).

Desde o início do século XX são conhecidas espécies de bactérias e fungos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono aerobicamente. Somente no fim da década de 1980, foram identificados organismos que realizam este processo em condições anaeróbias.

A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes em formas menos tóxicas, as quais passam a ser integradas aos ciclos bioquímicos, é chamada de biodegradação. (MIRANDA, 2008).

Como técnica derivada, a biorremediação é uma tecnologia de grande efetividade, de baixo custo e, algumas vezes, logisticamente favorável, que visa acelerar o processo natural de biodegradação de contaminantes pela otimização dos fatores que limitam este

fenômeno, fazendo uso de microorganismos vivos e de enzimas. Porém, a biorremediação apresenta algumas limitações como o tempo e, além disso, não é uma solução imediata. (LIMA, 1994).

O uso da técnica de biorremediação já está regulamentada, conforme a resolução 314/2002 do CONAMA, que visa disciplinar o registro de produtos com a finalidade de biorremediar solos afetados por vazamentos de petróleo e seus derivados. Esta resolução estabelece que os remediadores devem ser registrados no IBAMA, para que possam ser produzidos, importados, comercializados e utilizados, ficando dispensados de registro aqueles que se destinam a pesquisa e experimento necessitando da aprovação do órgão (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2010).

Esse trabalho teve como objetivo, avaliar de forma exploratória o potencial da utilização dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *B. subtilis* na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's - benzo(a)pireno) em solos contaminados nas vizinhanças de usinas termelétricas. O benzo(a)pireno foi selecionado por estar listado como contaminante classe I na NBR 10004, por

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.

possuir mais de 3 anéis benzênicos, possuir pressão de vapor baixa 0,00002 Pa (HPAs com mais de 4 anéis não permanecem muito tempo no ar como molécula gasosa, devido sua baixa pressão de vapor condensam e tornam-se absorvidos nas superfícies e partículas de fuligens e cinzas) apresentar uma meia vida longa no sedimento (aproximadamente 6 anos), possuir log Kow 6,04 (log Kow entre 5,8 e 8,0 indica a maior probabilidade do contaminante ser encontrado em sedimento) (NBR 10004/2004) e por haver padrão e metodologia disponível.

**Matérias e Métodos****Amostragem do Solo**

As amostras de solos estudados no presente trabalho foram provenientes de uma área da cidade de Charqueadas (RS) onde há uma termelétrica desativada. A principal operação realizada por este setor é a queima de carvão.

As amostras foram coletadas e divididas em três recipientes que caracterizam três localidades da usina termelétrica. Os locais foram denominados em relação a sua estrutura física e apresentaram as seguintes características em relação a sua estrutura:

- a) Ponto 1: 50 m da entrada da Estação de Transbordo de carvão da empresa Copelmi Mineradora Ltda. E entrada da Usina Termelétrica de Charqueadas (Tractebel Suez) – Rua Geólogo White, s/n°. A região é próxima à entrada da administração da usina termelétrica e apresenta um duto grande de ar, que constantemente lança jatos de gás para fora do seu recipiente de envasamento, que dependendo do gás, poderá poluir o meio ambiente de uma forma agressiva ou não. O solo possuía muitas raízes e alto índice de plantas, havia uma caixa de esgoto juntamente localizada ao solo. O asfalto apresentava grande concentração de resíduos de carvão, em função da passagem de caminhões de transporte do mesmo;
- b) Ponto 2: Estrada lateral, amostra de solo foi coletada cerca de 200m do ponto 1. O local 2 apresenta-se próximo das operações da usina, com grande área de arbustos e plantas juntamente localizadas com o solo coletado. Possuía uma torre de energia ao lado do solo, apresentava também dutos de ar

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.

não muito próximo a região de coleta;

- c) Ponto 3: Estrada beira rio Jacuí (antigo atracadouro), no local ocorre um resquício de mata ciliar, muito alterada, coleta de solo ao lado da estrada, cerca de 700m do ponto 1. Nesta região existe o Rio Jacuí, aonde chega o carvão, a ser utilizado nas operações da usina termelétrica, também é o local de armazenamento do carvão, que fica exposto sem nenhuma proteção. O local apresenta um aterro sanitário sem nenhum cuidado, há vários tipos de dejetos presente, como: matéria orgânica em decomposição, móveis de casa, roupas, vidros e em geral muitos objetos que demorarão anos a serem degradados pelo ambiente. O porto da região apresenta-se em um estado ruim de preservação, os materiais da construção apresentam-se em estado de oxidação.

**Planejamento fatorial**

Foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> em quadruplicata, contabilizando 16 amostras, que permite a combinação de todas as variáveis em todos os níveis,

obtendo-se assim uma análise completa das variáveis.

As variáveis e níveis utilizados foram os seguintes:

- a) Temperatura de incubação (25 °C e 32°C);
- b) Tipo de microrganismo (*B. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

**Incubação das bactérias***Preparação dos frascos*

Vinte frascos de compota foram lavados com água, sabão e água deionizada, para que não ocorresse nenhuma interferência com o meio externo. Após a lavagem, os frascos foram para aquecimento sob uma temperatura de 105°C por um intervalo de 4 horas. Transcorrido o período de aquecimento na estufa, os frascos foram retirados e colocados num local em ambiente adequado, para evitar contaminação com microorganismos presentes no ar.

*Preparação das amostras*

Amostras de aproximadamente 30 g de solo contendo como contaminantes HPA's foram acrescentadas nos frascos.

*Incubação*

Duas espécies de bactérias foram utilizadas: *B. subtilis* e *P. aeruginosa*.

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.

*Monitoramento das amostras*

As amostras foram monitoradas constantemente em duas temperaturas para ser observado o rendimento de trabalho das espécies de bactérias. A tabela a seguir apresenta a relação das bactérias, condição e frasco.

**Contagem das bactérias**

As contagens das bactérias foram realizadas no laboratório da microbiologia do UNILASALLE. *P. aeruginosa* os *B.*

*subtilis* são bactérias que estão normalmente presentes no solo e tem característica de putrefação de matéria orgânica em decomposição. São bactérias patogênicas na maioria das vezes.

Foram utilizadas as iniciais, onde BT (*B. subtilis* a temperatura de 32°C), PT (*P. aeruginosa* a temperatura de 32°C), BA (*B. subtilis* a temperatura ambiente) e PA (*P. aeruginosa* a temperatura ambiente), foi pesado aproximadamente 0,1g de solo em eppendorf conforme tabela 1.

Tabela 1: Massa de solo para contagem das bactérias

<i>ID</i>	<i>Massa de solo (g)</i>
1BT	0,100
2PT	0,099
3BA	0,103
4PA	0,102

Após essa etapa, iniciou-se a diluição de cada uma destas alíquotas, adicionou-se 100 µL na original. Repetiu-se 3 vezes em

cada, trocando a alíquota do pipetador automático a cada troca de amostra.

**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

*Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak; Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.*

Em cada diluição, levou-se cada alíquota para o misturador, para melhor solubilização.

Após este processo, a solução das alíquotas foi transferida para uma placa de Petry com PCA (Plate Count Agar), para contagem das bactérias. Foi utilizada uma alça de platina flambada para espalhar a solução na placa.

As placas foram colocadas em estufa à 37°C por 48 h em aerobiose, após foram contadas as colônias utilizando-se do equipamento Contador de Colônias Mecânico CP602.

**Preparação da amostra para análise de benzo(a)pireno B(a)P por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**

Para homogeneização do solo foi utilizada uma peneira de 2 mm. Foi pesada uma massa de  $1,0000 \pm 0,0050$  g de solo para cada experimento, adicionou-se 500 mL da solução de padrão interno de benzo(a)pireno dodecadeuterado (aproximadamente 200 ng/mL). Essa

amostra foi submetida à extração com 5 mL de diclorometano (DCM) em ultra-som por 3 vezes de 20 minutos, com intervalos de 5 min para descansar. Em seguida o extrato foi filtrado e lavado para retirar restante de amostra retida. O extrato foi levado à secura em rota-evaporador sob vácuo, à temperatura de aproximadamente 50°C. Em seguida reconstituído em 1 mL de DCM sob agitação em mixer. Após transferiu-se uma alíquota para um vial de cromatografia o qual foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), utilizando o modo de impacto de elétrons (EI) e a técnica de monitoramento seletivo de íons (SIM).

**Condições GC-MS**

Para ambos os métodos foram utilizados as mesmas condições de equipamento. Estas condições estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 2: Condições GC-MS para quantificação de benzo(a)pireno

<b>INJETOR</b>	
Temperatura	330 oC
Modo de Injeção	“Splitless” pulsado
Tempo de válvula fechada	1 min
Pressão na coluna	Inicial de 25 psi e constante de 7 psi após 1 min de corrida
Volume de injeção	2 mL
<b>Coluna</b>	
Descrição	DB – 5, 30 m
Temperatura	60°C(0,5') - 100°C/min - 230°C - 5°C/min - 285°C - 10°C/min - 325°C
<b>Detector</b>	
Temperatura da linha	
de transferência	320 oC
Temperatura da fonte de íons	250 oC
Temperatura do quadrupolo	150 oC
Modo de Ionização	EI
Técnica de monitoramento	SIM
Íons selecionados	252 e 250 para o BaP 264 e 265 para o BaP D12

### Resultados e discussão

Para os resultados obtidos após análise de benzo(a)pireno por GC-MS foi

aplicado o Test Q, calculado a média, desvio padrão e a incerteza tipo A expandida com 95% de confiança. Os resultados estão apresentados na tabela 3.



**Quantificação de Benzo(a)Pireno B(a)P por GC-MS  
em solos próximos de termelétricas utilizando processos de biorremediação**

Priscila S. M. Possamai; Matheus S. Spagiari; Dafne Q. Waszak;  
Delmar Bizani; Ana Cristina B. da Cunha.

Tabela 3: Resultados das concentrações médias de B(a)P em  $\text{ng g}^{-1}$  nos três locais de amostragem com seus desvios padrão e incertezas tipo A expandidas.

	Local 1	Local 2	Local 3
Média	73,67	50,05	9,62
Desvio Padrão Incerteza Tipo A	7,76	3,12	3,23
Expandida	1,55	0,98	1,00

Para a incubação dos microrganismos foi utilizado o solo do local 2 que apresentou concentração intermediária de Benzo(a)pireno.

Foram realizadas três contagens dos microrganismos no solo do local 2 durante o processo. Os resultados das contagens encontram-se nas tabelas 4,5 e 6.

Tabela 4: Resultados da primeira contagem de UFC/mL para *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em condições de temperatura ambiente e a 32°C

Microrganismo	Temperatura Ambiente	Temperatura 32°C
<i>P. aeruginosa</i> 5,6 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	3,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	4,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<i>B. subtilis</i>	3,6 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	5,6 x 10 <sup>6</sup> UFC/g

Tabela 5: Resultados da segunda contagem de UFC/mL para *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em condições de temperatura ambiente e a 32°C

Microrganismo	Temperatura Ambiente	Temperatura 32°C
<i>P. aeruginosa</i> 9,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	2,1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	3,0 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<i>B. subtilis</i>	1,7 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	9,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g

Tabela 6: Resultados da terceira contagem de UFC/mL para *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em condições de temperatura ambiente e a 32°C

Microrganismo	Temperatura Ambiente	Temperatura 32°C
<i>P. aeruginosa</i> 9,2 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	1,3 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	2,3 x 10 <sup>6</sup> UFC/g
<i>B. subtilis</i>	7,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	9,2 x 10 <sup>6</sup> UFC/g

Fonte: autoria própria, 2010

Através destes resultados foi possível plotar uma curva de crescimento dos microrganismos. A figura 1 seguir

apresenta a curva de crescimento dos microrganismos utilizados.

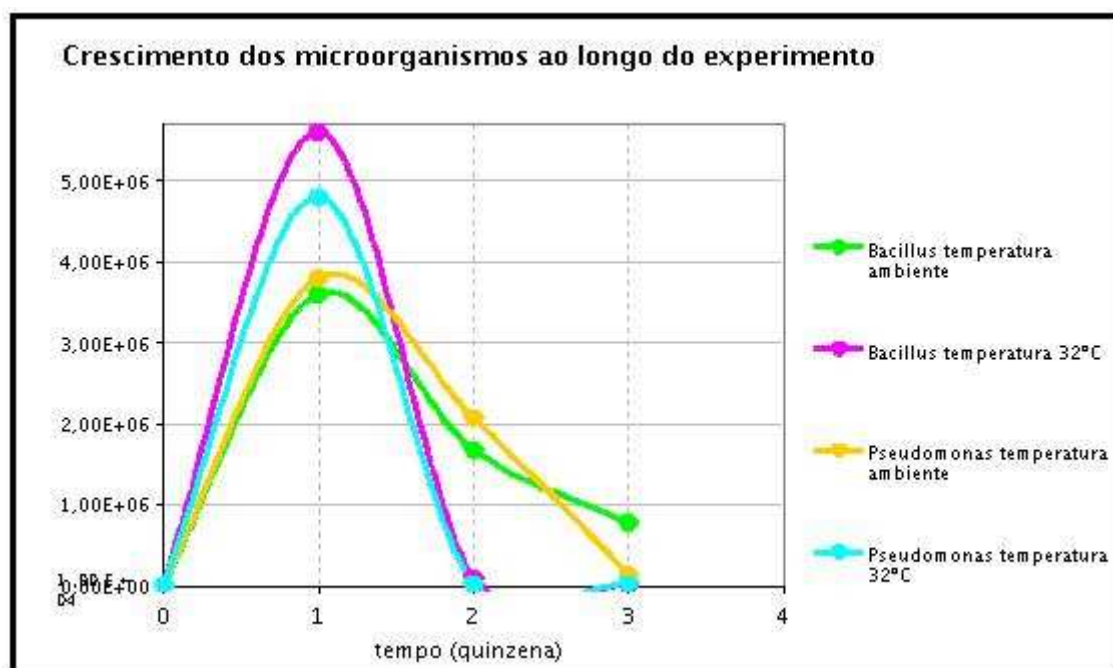


Figura 1: Curva de crescimento microbiano, na temperatura de 32°C e em temperatura ambiente para *P. aeruginosae* os *B. subtilis*.

Quando uma cultura microbiana se desenvolve em um sistema fechado, pode-se confeccionar uma curva de crescimento mais estável, porém o que se verificou neste experimento, foi uma diferença gradual nas fases exponenciais de crescimento e de declínio bacteriano.

Durante o experimento três situações poderiam justificar tal achado: (a) os

microrganismos morrerem (devido a presença e a toxicidade de HPA's); (b) os microrganismos não crescerem (não encontrarem fonte de carbono passivo de síntese); e ou (c) os microrganismos crescerem (encontrarem um fonte de carbono para seu metabolismo).

## Conclusão

Através da curva de crescimento bacteriano pode-se notar uma variação significativa no comportamento das bactérias testadas neste experimento em meios contendo B(a)P.

Sob temperatura de 32°C pode-se verificar que houve uma atividade bacteriana mais intensa, para ambos os microrganismos, mostrando que mesmo na presença dos compostos contendo B(a)P, a temperatura foi um fator relevante para o crescimento e desenvolvimento microbiano.

Nas condições de temperatura ambiente a taxa de crescimento foi inferior às condições de temperatura de 32°C, porém a fase estacionária e a fase de declínio bacteriano se estenderam por mais tempo, mantendo-se com células viáveis em condições detectáveis até após a segunda quinzena do experimento.

Portanto, conclui-se que em vista das taxas de crescimento, as variações verificadas neste experimento estão relacionadas às condições dos fatores físicos de incubação dos microrganismos e não em função da presença dos contaminantes químicos B(a)P, os quais poderiam ser considerados inicialmente

como substância interferente no metabolismo dos microrganismos testados neste trabalho.

## Referências

AMBIENTEBRASIL. Disponível em: <[www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br)>. Acesso em: 29 mar. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. *Resolução 314 de outubro de 2002*. Disponível em: <[www.mma.gov.br/port/conama](http://www.mma.gov.br/port/conama)>. Acesso: 29 mar. 2010.

DEOTTI, L. O. G. *Controle de pH na técnica de biorremediação eletrocinética*. 2005. Tese de pós graduação de engenharia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, C.A. *Quantificação do decréscimo de risco associado a biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo*. 2004. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro/EQ, Rio de Janeiro.

MIRANDA, V. J. M.. *Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos*. 2008. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.