



**KAROLINE DUARTE CANESTRI**

**MÉTODOS ANALÍTICOS NA INVESTIGAÇÃO DA  
DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL NO SOLO**

**Lavras - MG  
2021**

**KAROLINE DUARTE CANESTRI**

**MÉTODOS ANALÍTICOS NA INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO  
DIESEL NO SOLO**

Monografia apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Química, para a obtenção do título de Licenciado.

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2021**

**KAROLINE DUARTE CANESTRI**

**MÉTODOS ANALÍTICOS NA INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ÓLEO  
DIESEL NO SOLO**

**ANALYTICAL METHODS IN THE INVESTIGATION OF DIESEL OIL  
DEGRADATION IN SOIL**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Licenciado.

Aprovada em 10 de junho de 2021.  
Dr. Marcio Pozzobon Pedroso  
Dr. Wilder Douglas Santiago UFLA  
Msc. Letícia Fagundes Pereira UFLA

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me protegido, me guiado, me dado forças e por me fazer entender que Seus planos para mim sempre foram ainda maiores que os meus.

Agradeço a minha companheira, amiga e mãe Cristina por ter sido minha maior fonte de inspiração e por nunca me deixar desistir dos meus objetivos. Se eu sou essa mulher que me tornei e estou aqui é por você, minha rainha. Ao meu pai que mesmo com as diferenças nunca deixou de me apoiar e sempre esteve presente.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade de formação acadêmica.

Em especial ao Dr. Guilherme Max, que foi muito mais que só um professor na minha graduação, foi um verdadeiro Doutor ao me ensinar a arte do saber. A Dra. Josefina, Dr. Mario Guerreiro, Dr Mateus, Dr Marlon do Dex e ao Joel por terem marcado minha graduação com boas lembranças de professores que me viram como um ser humano além de somente uma aluna.

Ao Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso por ter aceitado me orientar mesmo quando me senti pequena demais para ter esse privilégio e por ser um professor que eu admiro tanto. Por ter compartilhado tanto conhecimento e principalmente por ter ajudado, há alguns anos a reconhecer que eu precisava de ajuda, quando criei um bloqueio no curso.

Ao Prof. Dr. Wilder Douglas Santiago por se mostrar disponível a participar da banca examinadora deste trabalho.

À Msc. Letícia Fagundes Pereira, por ser minha banca, mas, além disso, por ser minha bússola durante boa parte da graduação, por acreditar em mim até mesmo quando eu pensei em desistir. Por ser uma das únicas pessoas na universidade que pegou na minha mão e me mostrou que eu era capaz. Fica nessas páginas o registro da minha gratidão eterna a você.

À toda minha família, mas em especial aos que estiveram por perto durante a graduação, com um carinho especial ao meu avô João. A Jaqueline por ter sido companheira, amiga e doce, quando foi possível. A Luana e Bruna por muitas vezes terem sido minhas irmãs mais velhas. Ao Lorenzo por ser meu ponto de paz. Em especial a Glória e José Pacheco que de onde estiverem torceram e mandaram boas energias para que eu completasse mais essa etapa.

E, por fim, e não menos importante, meus amigos. A Lara por ter se tornado a minha pessoa durante a graduação. A Elisângela, Thaianni, Milena, Lucas, Luiz e minha família postixa do Sobrado por ter feito da trajetória um momento mais especial e mais leve. A Vitória e Giovanna por todo apoio e amizade durante o desenvolvimento do TCC. A Yasmin, que apesar de estar longe fisicamente nunca deixou de ser presente e de me motivar a ser melhor e por me mostrar que sou capaz de conquistar o mundo se assim eu quiser. Eu amo vocês e muito obrigada.

## RESUMO

O óleo diesel é um produto tóxico que apresenta em sua composição substâncias com potencial carcinogênico. Esse óleo é utilizado em grandes quantidades no mundo todo, principalmente como combustíveis para meios de transporte de grande porte. Porém, há um grande número de acidentes que envolvem esse produto, acarretando sérios danos ao meio em que foi exposto, quando não é tratado adequadamente, gerando perda severa da biodiversidade. Logo, pesquisadores buscam desenvolver diferentes técnicas de biorremediação das áreas contaminadas, sendo a biodegradação uma das técnicas que vem sendo utilizada. Essa técnica utiliza microrganismos ou outros seres vivos para degradar o óleo presente no solo contaminado. Ao degradar uma substância ocorre a formação de novos produtos, sendo necessário um estudo detalhado desse processo, buscando analisar se a biorremediação é eficaz e, além disso, identificar os produtos gerados, a fim de avaliar a toxicidades destes. Assim, faz-se necessário a análise química do solo contaminado antes e após o processo de remediação, sendo que uma análise química realizada de forma incorreta pode levar à interpretação equivocada do processo de remediação. Neste trabalho, foi feito um levantamento dos métodos de extração utilizados para amostras de óleo diesel em solo, o objetivo principal é fazer o levantamento dos trabalhos encontrados que versam sobre a decomposição ou degradação do óleo diesel no solo e que empregaram análise por cromatografia gasosa. Os parâmetros utilizados para a comparação das pesquisas já realizadas foram: os fatores que indicaram a degradação efetiva do óleo, identificação de compostos presentes no contaminante durante o experimento, identificação dos produtos formados após a degradação e tempo de análise. Observou-se então que, apesar do grande número de substâncias constituintes do óleo diesel, as mais comuns a serem identificadas foram os hidrocarbonetos aromáticos e os alifáticos através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), enquanto o método de extração mais comum é o de Soxhlet, sendo os solventes mais utilizados o hexano e o diclorometano. Ao longo dessa pesquisa, foram propostas duas metodologias de análise, uma utilizando SPME e GC-MS e, a outra usando EPA 3540 e GC-MS. É importante ressaltar que, no geral, obteve-se um resultado positivo nas biorremediações aplicadas. Por outro lado, a identificação dos subprodutos gerados na biorremediação e o uso de ferramentas analíticas mais atuais da química, como a quimiometria, não foram observadas na maioria dos trabalhos.

**Palavras-chave:** Cromatografia gasosa. Hidrocarbonetos alifáticos. HPAs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - HPAs prioritários .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 2- Partes de um equipamento de cromatografia. ....	21
Figura 3 - Equipamento usado na metodologia de Soxhlet. ....	25
Figura 4 - PC1 vs. PC2 de amostras de solo.....	39
Figura 5 - Cromatogramas (GC-FID).....	41

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Análise dos trabalhos que envolvem a investigação da degradação do óleo diesel no solo, usando GC.....	33
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores orientadores para concentração de compostos presentes no diesel em solo (mg kg <sup>-1</sup> peso seco) no estado de São Paulo.....	19
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, do inglês <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>	HPAs
Sistema Nacional de Emergências Ambientais	Siema
Instituto Brasileiro de Meio Ambiente	IBAMA
União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	IUPAC
Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da America	USEPA
Companhia Ambiental do Estado de São Paulo	CETESB
Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>	GC
Espectrometria de massas, do inglês <i>Mass spectrometry</i>	MS
Detector de ionização em chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>	FID
Cromatografia gasosa bidimensional abrangente, do inglês <i>Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography</i>	GC×GC
Extração assistida por Ultrassom, do inglês <i>ultrasound-assisted extraction</i>	USE
Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid extraction</i>	LLE
Extração sólido-líquido, do inglês <i>Solid-Liquid extraction</i>	SLE
Extração com fluido supercrítico, do inglês <i>supercritical fluid extraction</i>	SFE
Microextração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>	SPME
Extração sortiva em barra magnética, do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>	SBSE
Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>	SPE
Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>	DLLME
Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>	PCA
Análise discriminante linear, do inglês <i>Linear Discriminant Analysis</i>	LDA
Método dos vizinhos mais próximos, do inglês <i>K-Nearest Neighbor</i>	KNN
Análise discriminante mínimos quadrados parciais, do inglês <i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>	PLS-DA
Modelagem de software independente da Analogia de Classe, do inglês <i>Soft-Independent Modeling of Class Analogy</i>	SIMCA
Análise de agrupamento hierárquico, do inglês <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>	HCA

Espectrometria de Massas por tempo de voo, do inglês <i>Time-of-flight mass spectrometry</i>	TOFMS
Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry analyzer</i>	HRMS
Tetracloroeto de carbono	CCl <sub>4</sub>
Análise de variância	ANOVA
Mistura complexa não resolvida, do inglês <i>unresolved complex mixture</i>	UCM

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Óleo diesel .....	14
2.2	Problemática ambiental.....	15
2.3	Biorremediação .....	16
2.4	Legislação ambiental .....	18
2.5	Problemática analítica.....	19
2.6	Cromatografia gasosa .....	20
2.6.1	Preparo de amostra .....	23
2.6.2	Extração por SLE.....	24
2.7	Extração por SPME .....	28
3	METODOLOGIA .....	30
4	RESULTADOS .....	32
5	DISCUSSÃO.....	44
5.1	Proposta de metodologia.....	49
6	CONCLUSÃO .....	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo bruto e seus subprodutos vêm se destacando ao longo dos anos por desempenhar inúmeras funções na sociedade. Por outro lado, esses produtos vêm comprometendo cada vez mais o meio ambiente, seja ele aquático ou terrestre, o que ocasiona a contaminação e redução da biodiversidade. Um dos produtos derivados do petróleo que é responsável por essa contaminação, que pode ocorrer tanto no solo quanto na água, é o óleo diesel. Este produto é composto principalmente por hidrocarbonetos saturados, insaturados e compostos aromáticos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Embora todos esses compostos sejam tóxicos, deve-se dar uma atenção maior aos HPAs, já que alguns compostos desta classe apresentam propriedades cancerígenas e mutagênicas (CZARMY, 2020).

O Sistema Nacional de Emergências Ambientais (Siema), do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), fez um levantamento de acidentes em território nacional, do ano de 2017 até o ano de 2019, envolvendo petróleo e seus derivados. O que chama atenção nesse documento é o número expressivo de acidentes, que varia de 869 a 1018 ao ano, sendo a maior parte deles no estado de Minas Gerais. Esses acidentes incluem ocorrências que foram registradas em rodovias, plataformas, ferrovias, indústrias, portos, postos de combustíveis, refinarias, armazenamentos entre outros. Outra informação que chama atenção é que, entre todos os ambientes atingidos, tais como o mar, atmosfera, rios (entre outros), o solo é o que traz maior número de reincidentes, variando entre 290 a 447 casos ao ano. Através desses dados, reafirma-se a importância de se estudar a remediação do solo contaminado com óleo diesel na UFLA, já que Minas Gerais é o estado que apresenta maior número de acidentes (Ibama, 2019).

O óleo diesel quando entra em contato com solo causa contaminação. A partir disso, surge a necessidade de desenvolver, pesquisar e evoluir técnicas para remediação desses solos contaminados. Além disso, torna-se de grande importância que sejam utilizadas técnicas que envolvam a química analítica, para que seja caracterizado o nível da contaminação e também avaliar se as técnicas de biorremediação que foram empregadas foram, de fato, eficazes (OSINOWO, 2020).

As técnicas analíticas que têm sido utilizadas nesses tipos de análises, normalmente, já são bem conhecidas, porém o uso dessas técnicas exige conhecimento prévio do analista responsável, além de, algumas vezes, precisar de adaptação em cada experimento, tal como o

uso do solvente que seja mais adequado a cada analito na etapa de preparo da amostra inicial, que ocorre previamente à análise instrumental. Essa falta de conhecimento prévio se dá muitas vezes porque o pesquisador não é da área de química e por isso não tem o conhecimento necessário para fazer uma aplicação de uma técnica mais elaborada. Uma das principais técnicas utilizadas em análise de óleo diesel é a cromatografia gasosa (GC), que se fundamenta na partição diferenciada dos analitos entre uma fase estacionária e outra fase móvel, ocasionando a separação de centenas de constituintes de uma amostra (DUARTE, 2015).

É importante ressaltar que antes de injetar as amostras no equipamento de GC, é necessária uma etapa prévia de extração dos compostos do óleo da matriz da amostra, já que tratam-se de matrizes, em sua maioria, com altas concentrações de matéria orgânica e sólidos, que não pode ser injetada diretamente no cromatógrafo. Citam-se quatro técnicas de extração que são mais utilizadas de modo geral: a extração com fluido supercrítico (SFE), a extração em fase sólida (SPE) ou microextração em fase sólida (SPME) e a extração líquido-líquido (LLE). Essas técnicas, quando comparadas, podem apresentar vantagens e desvantagens, umas sobre as outras, e o que as diferencia em cada análise são as propriedades de cada analito e qual técnica pode fornecer melhor resultado, disponibilidade de equipamentos e solventes, custo tempo de análise e capacidade de pré-concentração de cada método. Na presente pesquisa, por envolver a extração de compostos presentes em amostras de solo, a SLE, a extração assistida por ultrassom e extração por Soxhlet, foram técnicas mais utilizadas (BARRIONUEVO, 2001).

A presente pesquisa tem como objetivo principal apontar a melhor metodologia para avaliar a degradação de óleo diesel no solo através da cromatografia gasosa. Além disso, fazer o levantamento dos trabalhos encontrados que versam sobre a decomposição ou degradação do óleo diesel no solo e que empregaram análise por cromatografia gasosa; verificar o preparo de amostra prévio à análise cromatográfica, comparando as vantagens e desvantagens de cada metodologia; observar as diferenças entre trabalhos que empregam os detectores de ionização em chama (FID) e de espectrometria de massas (MS) no que tange a identificação dos compostos presentes nas amostras e os produtos de degradação; comparar as diferentes formas de avaliar a degradação associada aos dados obtidos; propor uma metodologia eficiente para investigar a degradação de diesel no solo que seja possível de ser realizada na

UFLA, aplicando métodos que sejam efetivos e economicamente viáveis. Para isso, construiu-se primeiramente um referencial teórico.

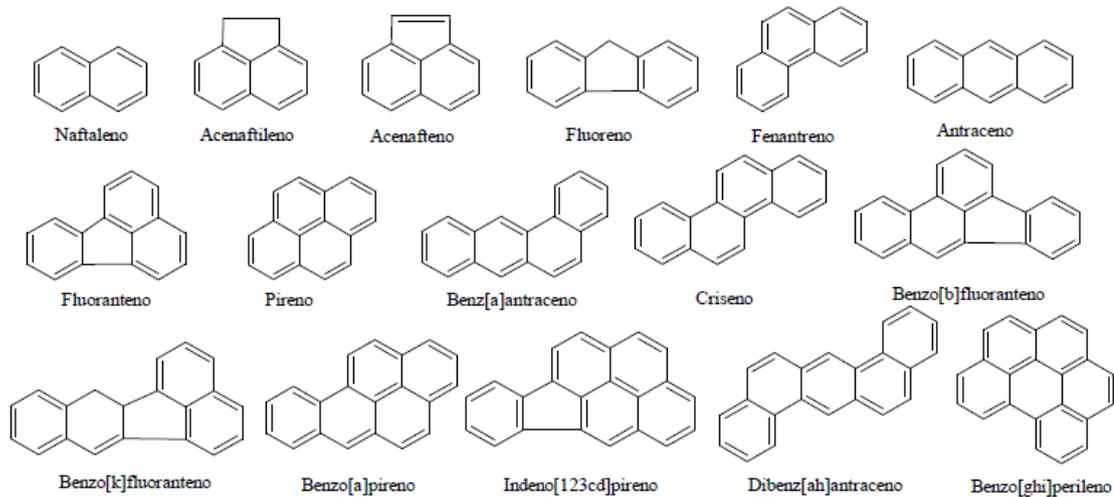
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Óleo diesel

O óleo diesel é um combustível fóssil, derivado do petróleo, formado por uma combinação de substâncias tais como: diesel leve e pesado, frações de querosene, gasóleos, parafinas, ciclo alcanos, nafta pesada, aditivos, hidrocarbonetos e por uma parte menor de compostos contendo oxigênio, nitrogênio ou enxofre. Possui uma faixa de destilação entre 220-380 °C e pode ser comercializado com adição de uma fração de biodiesel que, por sua vez, tem como característica ser menos poluente. É um produto tóxico que apresenta potencial para desenvolver câncer, leucopenia ou algum dano no sistema nervoso ao ser humano que for exposto diretamente a esse combustível em um prazo de tempo considerável. Dos componentes formadores do óleo diesel, os que apresentam maior risco de comprometimento da qualidade de vida são os HPAs e os hidrocarbonetos monoaromáticos como: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (DA SILVA, 2013; SARAIVA, 2018).

Os HPAs são constituídos por anéis aromáticos condensados, contendo variações no arranjo de átomos de carbono e hidrogênio. Atualmente, cerca de cem HPAs são reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Entretanto, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) classificou 16 dos HPAs, que estão representados na **Figura 1**, como aqueles que apresentam maiores fatores de risco à saúde humana e contaminação ao meio ambiente. Esses compostos não são solúveis em água, apenas em solventes orgânicos ou lipídeos, e são absorvidos pelos seres vivos através da inalação ou até mesmo do contato com a pele. Ao se metabolizar, os HPAs formam epóxidos que apresentam características mutagênicas e carcinogênicas, podendo atingir fígado, intestino, pele, pâncreas e pulmão no ser humano. Além de seres vivos, a substância também pode contaminar solo, subsolo e águas subterrâneas, o que agrava ainda mais seu potencial toxicológico, já que estará presente por vários anos no ambiente, podendo gerar uma contaminação em cadeia muito grave, principalmente, quando se trata do HPA antraceno, que apresenta características que tendem a sorção ao solo, tornando-se altamente duradouro no ambiente (JACQUES, 2007).

Figura 1 - HPAs prioritários



Fonte: MEIRE (2007).

No Brasil, existe uma resolução da Agência Nacional do Petróleo, ANP Nº 65, de 9 de dezembro de 2011 que classifica os óleos diesel de uso rodoviário em dois tipos, A e B. O óleo diesel tipo A é produzido a partir do refino do petróleo bruto e não há adição de biodiesel, este deve ser previamente autorizado pela ANP para ser comercializado. Já o tipo B é o óleo diesel do tipo A com adição de biodiesel, que deve seguir um teor de biodiesel pré-definido pela legislação, conforme a lei nº 13.263, de 23 de março de 2016 (SARAIVA, 2018).

Além disso, os hidrocarbonetos alifáticos, que também são um dos principais constituintes do diesel, podem ser compostos de cadeia simples, como os alcanos; ramificados, como os isoprenóides; e de cadeia cíclica, como os naftalenos (OLIVEIRA, 2012; LOURENÇO, 2003).

## 2.2 Problemática ambiental

Desde a Revolução Industrial o problema de poluição ambiental vem se agravando cada vez mais e uma das fontes de contaminação que vem crescendo é a causada por hidrocarbonetos derivados de petróleo. Essa contaminação acontece por meio de falhas humanas e mecânicas no transporte ou em operações de descarga do mesmo, ocasionando o vazamento em reservatórios e, até mesmo, em descarte de combustíveis feitos em locais inadequados. O crescimento do uso de derivados do petróleo pode ser observado no aumento

do número de veículos, visto que, no Brasil, a venda de óleo diesel subiu de 221.094.773 barris, no ano de 2000, para 360.396.349 barris, em 2019 (ANP, 2020). Esse fator é diretamente proporcional ao crescimento do número de acidentes envolvendo essas substâncias (MENEGETTI, 2007).

Todavia, torna-se importante ressaltar que os impactos gerados por contaminações de derivados do petróleo podem afetar o meio ambiente em áreas distintas, tais como: rios, solos, manguezais, recursos hídricos subterrâneos e mares. O solo vem se destacando como uma das áreas mais recorrentes em pequenos acidentes, como vazamentos em postos. O mesmo possui funcionalidades econômicas, sociais e principalmente ecológicas, destacando o habitat dos seres vivos, manutenção do ciclo da água e dos nutrientes, proteção da água subterrânea, conservação das reservas minerais e de matérias-primas e a produção de alimentos. A contaminação do solo ocorre pela adição de substâncias que comprometem a atuação dos componentes do ecossistema e, conseqüentemente, comprometendo sua função e sustentabilidade. Assim, a poluição do solo está associada à atividade humana e é vinculada à concentração de resíduos acrescentados ao solo por acidente ou intencionalmente. Essa contaminação do solo resulta na aniquilação de algumas funções e pode resultar também na contaminação da água subterrânea (BARROS, 2010).

Devido ao alto índice de vazamentos em postos de combustíveis, como já citado, o número de pesquisas nessa área tem crescido na última década e vem sendo um grande desafio aos profissionais da área. Os casos geoquímicos e bioquímicos que envolvem o óleo diesel são processos altamente complexos, além dos componentes serem tóxicos e apresentarem alta capacidade de atingirem as águas subterrâneas. O combustível, ao entrar em contato com o solo, se fragmenta, sendo que uma parte pequena da solução dissolve-se no lençol freático, a segunda fração líquida se retém entre os espaços porosos do solo e outra parte evapora e contamina a atmosfera (MARIANO, 2006).

### **2.3 Biorremediação**

Uma das técnicas utilizadas no tratamento de solos contaminados com compostos tóxicos é a biorremediação, na qual ocorre a transformação de substâncias contaminantes em outras, inertes ou menos tóxicas. Essa técnica apresenta baixo custo e alta eficiência e, por esse motivo, vem sendo utilizada até mesmo em escala comercial em áreas de remediação de solo contaminado (JACQUES, 2007). Ela se fundamenta na degradação bioquímica das

substâncias tóxicas através da ação de microrganismos, existindo duas variações dessa técnica, *in-situ* ou *ex-situ*. No caso da *in-situ*, o procedimento é realizado no local da contaminação e tem como características o baixo custo e o baixo impacto ambiental. Já a *ex-situ* se faz necessária a extração do solo contaminado para outro local, onde será feito o tratamento, o que torna o procedimento mais caro. Contudo, ao se extrair o solo e levá-lo para outro local torna-se possível fazer a manipulação dos fatores que podem influenciar a biodegradabilidade dos contaminantes, que são de suma importância nesse tipo de bioremediação (JARDIM, 2010).

Além disso, a biorremediação *in-situ* pode ser passiva ou intrínseca. A passiva pode ser um processo demorado e exigir a complementação com outros tipos de técnicas, além disso, pode comprometer a saúde do responsável por fazer o acompanhamento local do procedimento, já que se trata de uma área contaminada. Por outro lado, a intrínseca ocorre por processos naturais, tais como biodegradação, diluição ou outras técnicas que têm como principal objetivo a descontaminação do ambiente (JACQUES, 2007).

Para a biorremediação é necessário se atentar aos fatores que devem ser corrigidos como: condições físicas e químicas do solo a ser tratado; características do agente decompositor que será usado na biodegradação; e conhecimento prévio do teor de matéria orgânica. Esses fatores podem influenciar diretamente na taxa de degradação da substância no solo (JARDIM, 2010).

Morais Filho, detalha a biorremediação feita em diferentes partes do mundo. Na Antártida foi preciso microrganismos capazes de se adaptarem a temperaturas extremamente baixas, no caso as bactérias psicrófilas e as psicrotolerantes, para que houvesse, de fato, um resultado na biorremediação do solo contaminado com diesel, sob temperaturas que variaram de 0 °C a 10 °C. Já nos Estados Unidos e na China houve uma comparação entre métodos na recuperação de solos contaminados, denominados atenuação monitorada, bioestímulo e bioaumento. O bioaumento consiste em adicionar microrganismos específicos no solo contaminado, o qual pode ser feita *in situ* e *ex situ*. Já no caso do bioestímulo, microrganismos degradadores pré-selecionados são manipulados no solo contaminado, o qual deve ser preparado com condições específicas de temperatura e pH. A atenuação monitorada, por sua vez, baseia-se no monitoramento da capacidade de biodegradação dos microrganismos nativos, evitando qualquer alteração ao ambiente. Nesse caso, os microrganismos usam o contaminante como fonte de carbono. No estudo em questão, realizado nos EUA, a técnica de bioestímulo foi a

que apresentou maior nível de degradação. Na China, a atenuação monitorada foi a que obteve resposta mais significativa. Com isso, foi possível notar que o sucesso da biorremediação procede do estado de adaptação metabólica e genética das populações microbianas ao seu ambiente. No Brasil, onde a técnica de biorremediação ainda não é comumente usada, houve uma comparação entre bioaumento e bioestímulo em solos brasileiros contaminados. Ambas as técnicas apresentaram resultados positivos, porém notou-se que é importante realizar uma otimização das técnicas para que sejam mais eficazes (MORAIS, 2016).

#### **2.4 Legislação ambiental**

A partir de alguns estudos, feitos de dados existentes na literatura científica internacional, foram calculados valores para que se faça o controle da contaminação tanto do solo quanto das águas subterrâneas. Criou-se, então, um valor de referência de qualidade, que define a pureza da água, e um valor de prevenção, para garantir que as substâncias tóxicas estejam abaixo do valor que é prejudicial tanto à fauna quanto à flora. Além disso, foi realizada a criação do valor de intervenção, que é a concentração da substância prejudicial, que já apresenta risco ao meio ambiente e à saúde do ser humano. Quando houver a confirmação de uma área contaminada, onde os valores encontrados forem maiores ou iguais os valores de intervenção, devem ser realizadas ações que resguardem os receptores de risco. Os dados de valor de referência, valor de prevenção e valor de intervenção estão descritos na **Tabela 1**:

Tabela 1 - Valores orientadores para concentração de compostos presentes no diesel em solo ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) no estado de São Paulo.

Substância	Valor de prevenção (VP) Geral	Valor de intervenção (VI)			
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Hidrocarbonetos aromáticos voláteis	Benzeno	0,002	0,02	0,08	0,2
	Estireno	0,5	50	60	480
	Etilbenzeno	0,003	0,2	0,6	1,4
	Tolueno	0,9	5,6	14	80
	Xilenos	0,03	12	3,2	19
HPAs	Antraceno	0,3	2300	4600	10000
	Benzo(a)antraceno	0,2	1,6	7,0	22
	Benzo(b)fluoranteno	0,7	2,0	7,2	25
	Benze(k)fluoranteno	0,8	27	75	240
	Benzo(g,h,i)perileno	0,5	-	-	-
	Benzeno(a)pireno	0,1	0,2	0,8	2,7
	Criseno	1,6	95	600	1600
	Dibenzo(a,h) antraceno	0,2	0,3	0,8	2,9
	Fenantreno	3,6	15	40	95
	Indeno(1,2,3-c,d) pireno	0,4	3,4	8,0	30
	Naftaleno	0,7	1,1	1,8	5,9

Fonte: CETESB Adaptado (2007).

Já o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), considerando a necessidade de prevenção, publicou que a partir de critérios de qualidade do solo com presença de contaminantes e estabeleceu metodologias para fiscalização e gerenciamento ambiental, conforme a Resolução nº420, de 27 de Dezembro de 2009.

## 2.5 Problemática analítica

Considerando a problemática de ocorrer acidentes recorrentes de contaminação, no solo ou em águas subterrâneas, e a necessidade de tratar o meio contaminado, torna-se indispensável que se compreenda melhor as técnicas que podem ser utilizadas no tratamento do solo. É preciso conhecer as substâncias presentes para saber como tratar esse solo, fazer o

monitoramento para saber se o tratamento está sendo eficaz e quais subprodutos são formados a partir das reações que foram propostas (MARIANO, 2006).

Para a avaliação do nível de contaminação do solo e para acompanhar o processo de remediação, a seleção da técnica analítica que será utilizada é tão importante quanto a aplicação da mesma. Além disso, é de extrema importância tanto o manuseio da amostra quanto a preparação. O preparo de amostra é caracterizado por ser a primeira etapa da análise química e também por ser uma importante fonte de grande parte dos erros de análises. O preparo da amostra é feito com o objetivo de possibilitar a extração, selecionar o analito na amostra, remover interferentes ou até mesmo realizar a pré-concentração do analito quando o mesmo se encontra em uma concentração muito baixa para que o equipamento seja capaz de detectar ou, ainda, pode ser necessária a extração de um meio para outro. Em alguns casos, se faz necessário o uso de um solvente de extração e a seleção desse solvente também é importante, quando se trata de matrizes com compostos orgânicos, pode-se utilizar solventes do tipo polar, apolar ou até mesmo outras variações, dependendo da amostra inicial e de suas características físico-químicas.

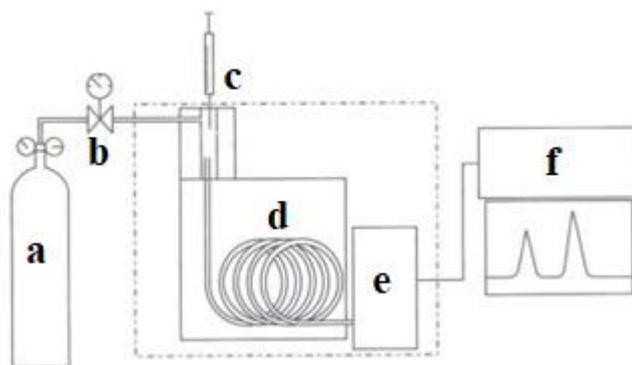
Para realizar a extração do analito, pode ser necessário realizar a pré-concentração, que pode ser feita usando diversas técnicas, tais como: SLE, SPME, LLE, USE, extração por Soxhlet ou outras. Depois da obtenção do extrato, é necessário fazer a análise instrumental por técnicas como: cromatografia líquida ou gasosa (acopladas ou não à espectrometria de massas), espectrometria no infravermelho, entre outras. Essas técnicas permitem detectar os compostos presentes no extrato da amostra e, quando associadas às técnicas espectrométricas, permitem a identificação de compostos, dando suporte ao analista para que ele caracterize e avalie se o experimento realizado obteve resultados aceitáveis ou não. No caso da análise do óleo diesel, é mais comum o uso da cromatografia a gás do que a líquida, por ela ser mais eficaz no quesito de separação, além de ser mais simples de operar (STRELAU, 2006).

## **2.6 Cromatografia gasosa**

A cromatografia é um método físico-químico de separação. No caso da cromatografia gasosa, a amostra a ser analisada deve estar na forma líquida ou gasosa para que, após ser injetada no equipamento, seja aquecida e passe para sua fase de vapor. E se faz necessário que ocorra a separação de duas fases distintas, a fase estacionária e a fase móvel. Os compostos a serem separados passam por ambas as fases, e ao longo da coluna do GC, cada substância

apresenta interações diferenciais com a fase estacionária, fazendo com que a velocidade de eluição ao longo da coluna seja diferente para cada uma, de forma que, em geral, os tempos de retenção sejam distintos para cada composto que compõe a amostra. Ao final da coluna cromatográfica há um detector acoplado ao equipamento, o que gera um sinal (cromatograma) em função do tempo. Um esquema do equipamento pode ser visto na **Figura 2** (McNair, 2019).

Figura 2- Partes de um equipamento de cromatografia.



Legenda: a- Fonte do gás de arraste; b- Controlador de vazão e pressão; c- Sistema de injeção de amostra; d- Coluna cromatográfica; e- Sistema de detecção; f- Sistema de registro e tratamento de dados.

Fonte: Adaptado de COLLINS, 2006.

Para que a amostra se mova dentro da coluna é necessário que haja um gás de arraste, este deve ser inerte, e a amostra deve ser parcialmente solúvel no gás para que ele exerça sua função. Os gases mais usados são os de argônio, nitrogênio, hidrogênio e o hélio, que vem sendo mais comumente utilizado para esse tipo de análise (SKOOG, 2005). A interação do analito com a coluna varia de acordo com o ponto de ebulição de cada substância presente na matriz e com a afinidade com a fase estacionária. Assim, os compostos com menores pontos de ebulição e com menor afinidade com a coluna são os primeiros a eluir, enquanto os com maiores pontos de ebulição e maior afinidade eluem gradativamente (AQUINO, 2003.)

As colunas empregadas para GC são colunas capilares, as quais podem ser de diversos materiais, sendo as de sílica mais comumente utilizadas atualmente. O diâmetro interno dessas colunas variam de 0,10 a 0,53 milímetros, o comprimento de 10 a 100 metros e a espessura da fase estacionária varia de 0,1 até 5,0 micrômetros. A escolha da coluna ideal é feita de acordo com as especificações do analista e as limitações da amostra (McNair, 3ª ed, 2019). Para garantir a eficiência da coluna, é necessário que a amostra seja compatível ao equipamento. A injeção deve ser ágil e deve conter volumes pequenos, evitando assim que

gere uma baixa resolução do GC. Outro aspecto importante ressaltar é a temperatura da coluna, essa deve ser minuciosamente monitorada para que se obtenha uma alta precisão. Para isso, deve ser feita a otimização da programação de temperatura da coluna, a qual varia para cada composto (SKOOG, 2005).

Em relação ao detector, no caso da GC acoplada ao detector de espectrometria de massas (GC-MS), os picos cromatográficos que foram gerados pela separação das substâncias presentes na amostra são inseridos na fonte de ionização do MS para que haja a formação dos íons a serem, em seguida, separados no analisador e encaminhados para detecção e quantificação. Um software apropriado instalado em um computador efetua os cálculos, gera os espectros de massas a serem identificados pelo analista ou pelo próprio software (LANÇAS *et al.*, 2009). Outro detector que é muito utilizado em cromatografia gasosa é o detector de ionização em chama (FID), no qual o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar e hidrogênio. A detecção desse aparelho baseia-se no monitoramento da corrente produzida a partir dos compostos orgânicos que produzem íons quando passam pela chama. Entre a ponta do queimador e um eletrodo é aplicado volts, que servem para coletar íons e elétrons, e a corrente que se resulta é medida por um picoamperímetro (SKOOG, 2005).

A cromatografia pode ser usada, por exemplo, na avaliação da degradação e formação de novos compostos no processo de decomposição do óleo diesel. Quando se usa o GC-MS, por exemplo, pode-se identificar os hidrocarbonetos alifáticos através da comparação dos espectros de massa dos compostos do óleo diesel com os disponíveis na biblioteca do software utilizado (ARRUDA, 2015).

Em relação a metodologia que deve ser usada na análise de solo contaminado, recomenda-se que utilize o método EPA 8270D, que se refere a análise de compostos orgânicos semivoláteis por GC-MS. Para isso, deve ser feita a calibração do equipamento de GC com os seguintes parâmetros: a temperatura do injetor deve ser na faixa de 250 a 300 ° C, a temperatura da coluna cromatográfica deve ser programada para rampas de aquecimento com temperatura inicial de 40 °C por 4 min, aquecimento de 40 - 270 ° C a 10 ° C por minuto, e a temperatura final de 270 °C que deve ser mantida cerca de quinze minutos. As análises devem ser feitas usando a mesma programação, sendo injetando de 1 a 2 µL, no modo splitless, onde não há divisão do fluxo (USEPA, 1998.).

Além disso, há uma variante da GC que difere da cromatografia convencional, por ser necessário o uso de duas colunas cromatográficas ligadas por um modulador, denominada cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). No modulador, o efluente da primeira coluna passa por um procedimento de amostragem e reinjeção na segunda coluna, na qual os compostos coeluídos na primeira coluna serão separados na segunda. Como vantagens, a GC×GC promove o aumento da capacidade do pico, maior estruturação na distribuição dos picos, maior seletividade e sensibilidade. Portanto, torna-se útil na análise em diversas áreas tais como: petroquímicas, forenses, perfumes, óleos essenciais, entre outras (MORAES, 2011).

### **2.6.1 Preparo de amostra**

Na maior parte das análises feitas em laboratório, é necessário a utilização do preparo de amostras. E, com o passar dos anos, essas metodologias de preparo vem sofrendo modificações a fim de aperfeiçoar as técnicas analíticas e seguir a demanda da evolução dos equipamentos com alta eficiência. Com isso, busca-se sempre fazer melhorias na produtividade analítica, ao mesmo tempo, minimizando a geração de resíduos (DIONÍSIO, 2010).

Comumente em análises químicas, nas quais os analitos a serem estudados na amostra se apresentem em uma quantidade muito pequena, ou no caso de a amostra ser limitada, torna-se necessário que essa amostra seja tratada antes de passar pela análise instrumental. Essa preparação deve ser realizada de forma cuidadosa por se tratar de um procedimento mais oneroso, por demandar maior parte do tempo da análise e, principalmente, por ser um procedimento que apresenta facilidade de ocorrer contaminação da amostra ou perdas dos analitos. O preparo que é feito tem como objetivo possibilitar a extração, promover a concentração dos analitos que serão determinados ou, ainda, remover interferentes. É importante ressaltar que caso os interferentes não sejam removidos a análise pode apresentar falso resultado (JARDIM, 2010).

Os procedimentos de preparo de amostra variam de acordo com as características físicas e químicas de cada substância. Os procedimentos mais usuais para análise por cromatografia gasosa são: (i) LLE, técnica que é caracterizada por consumir grande quantidade de solvente orgânico, ter um custo considerável e ser um processo minucioso; (ii) SPE, que teve início em 1970, é uma metodologia na qual ocorre a extração dos analitos na fase aquosa para um

material sorvente e, em seguida, um solvente orgânico é usado para eluir os analitos; (iii) SPME, que se desenvolveu por volta de 1990 e é um processo simples e rápido, usa-se uma fibra que contém um material sorvente para reter os analitos, sendo esses desorvidos após a fibra sofrer aquecimento ao ser inserida no injetor de um cromatógrafo (CALDAS, 2011).

Um fator de suma importância é a seleção apropriada da metodologia de preparo de amostra que será usado, caso esse seja feito de forma equivocada pode influenciar diretamente na confiabilidade dos resultados apresentados. Portanto, torna-se necessário o estudo minucioso das características, tanto da amostra quanto do analito em questão, e dos procedimentos analíticos que estão disponíveis no laboratório em uso. Levando em consideração a matriz, faz-se necessária a observação das propriedades físicas e químicas, tamanho da amostra disponível para a execução da análise e pH. Já em relação ao analito deve-se analisar as propriedades físico-químicas, características que irão possibilitar a sua detecção e, não menos importante, a concentração. Para que o método seja o mais próximo possível de sua otimização, sua realização deve ser o mais simples possível, com o tempo e as etapas de análise reduzidas a fim de minimizar os erros, deve-se apresentar o mínimo de interferentes possíveis, ser de custo acessível e consumir baixo volume de solvente (JARDIM, 2010).

Para amostra de solo ou resíduos sólidos, deve-se usar os métodos de extração por solvente usando Soxhlet ou extração ultrassônica. Nesses casos deve-se dar atenção aos solventes e aos reagentes utilizados, os quais podem gerar interferências para a amostra, já que essas devem ser submetidas à extração com solvente antes da análise. A eficiência do método escolhido para extração da amostra irá fornecer a eficiência de extração para os analitos na análise em questão (USEPA, 2007).

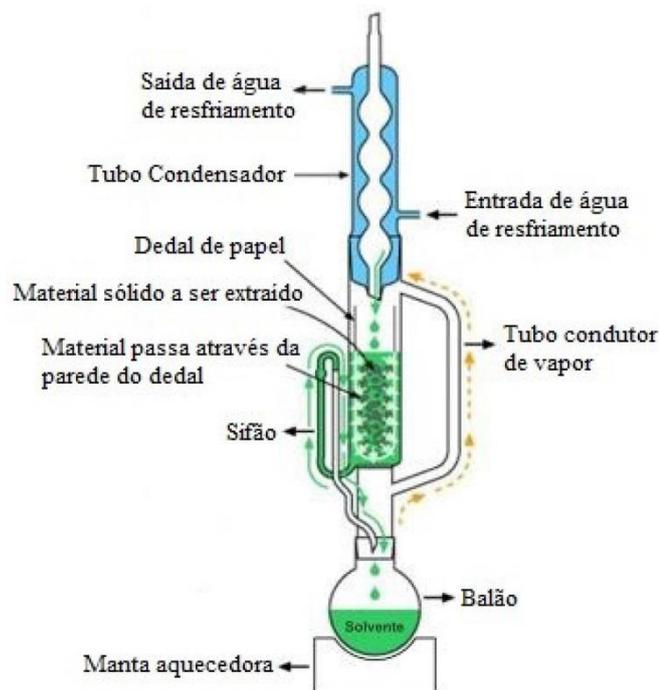
### **2.6.2 Extração por SLE**

A metodologia de Soxhlet foi desenvolvida com o objetivo de fazer a extração de lipídios que estão contidos no leite por evaporação de solvente orgânico. É um método que foi idealizado por volta de 1879 e vem sendo utilizado até hoje na extração de compostos orgânicos (SANTANA, 2017).

Nesse tipo de técnica de extração, o equipamento permite que parte do solvente puro passe várias vezes na amostra formando um ciclo. Cada etapa corresponde a uma lavagem total da amostra inicial, realizada à temperatura constante. Essa técnica é de suma importância por se tratar de uma extração exaustiva, ou seja, é possível extrair 100% dos compostos da amostra.

Esse extrator é amplamente utilizado na extração de óleos e de compostos de baixa polaridade, sendo que os solventes mais usuais são os éteres, por possuírem como característica baixa reatividade (DE OLIVEIRA, 2011). Segundo o método EPA 3540C, que utiliza Soxhlet para extrair orgânicos não voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas, para amostras de solo deve-se usar os seguintes solventes de extração: acetona/hexano (1:1); cloreto de metileno/acetona (1:1). A mistura de acetona/hexano possui menor custo e menor toxicidade. Outras amostras devem ser extraídas usando cloreto de metileno ou tolueno/metanol (10:1) (USEPA, 1996). Na **Figura 3** pode-se observar o equipamento dessa técnica.

Figura 3 - Equipamento usado na metodologia de Soxhlet.



FONTE: COSTA, Kíssyla et al., 2017.

Amostras de solo para aplicação dessa técnica devem ser preparadas retirando possíveis corpos estranhos (gravetos, folhas, pedras e outros). Além disso, a amostra deve decantar e, se houver formação de camada de água, é preciso retirar e descartar. Deve-se pesar 10 g de amostra sólida com 10g de sulfato de sódio anidro e colocá-lo em uma extração com um tampão de lã de vidro acima e abaixo da amostra. Adicionar 300 mL do solvente de extração no balão de 500 mL de fundo redondo, conectá-lo ao sistema de refluxo, que deve ser de 4 a 6 ciclos por hora, e a extração deve ser mantida de 16 a 24 horas. O método 3540C é

caracterizado por ter a instrumentação relativamente barata, o solvente usado pode ser substituído por um que seja compatível, fornece uma extração eficiente e poucas variáveis nesse método podem influenciar adversamente a eficiência da extração. Porém, essa metodologia usa uma grande quantidade de solvente (USEPA, 1996).

Há descrito na literatura a substituição da mistura de hexano/acetona (1:1) por uma mistura de diclorometano/metanol (4:1). Ao se comparar as porcentagens de recuperação obtidas para cada caso, a substituição mostra-se promissora por não apresentar perda significativa na extração dos HPAs, mostrando, assim, que o solvente pode ser substituído caso se faça necessário (CRISTALE; SILVA; MARCHI, 2008).

Monticeli et al., (2018) fez uso dessa técnica para extrair hidrocarbonetos totais do petróleo do solo artificialmente contaminado com diesel, buscando-se encontrar um método adequado para a remediação de solo contaminado utilizando biorreatores com custo baixo (MONTICELI; DE ANDRADE RODRIGUES; CORRÊA, 2018).

Em outro caso, fez-se um estudo para avaliar a possibilidade do impacto ambiental causado por 50 anos de exposição de um local à indústria do petróleo. Para extração foi pesada uma massa de 10 g da amostra inicial, adicionado diclorometano como solvente e a extração foi feita em Soxhlet por 16 horas. Ao fim da pesquisa, os HPAs foram identificados e quantificados em uma concentração total variando entre 1 - 409  $\mu\text{g}^{-1}$ . A quantificação e a identificação dos compostos foram feitos por GC-MS (CELINO; QUEIROZ, 2006).

Outra técnica que pode ser considerada SLE, é a extração assistida por ultrassom (USE). Curie ao estudar o efeito piezoeletrico em 1880, descobriu o ultrassom. Este vem sendo usado em diversas funções, tanto na indústria como na pesquisa, até a atualidade. A frequência das ondas que caracterizam o ultrassom se dá no intervalo de 16 KHz a 1 MHz. A propagação de ultrassom é explicada através do movimento de expansão e compressão do sistema, ao se comprimir, gera-se uma descompressão do sistema de moléculas do meio da propagação, esses processos resultam na formação das ondas ultrassônicas. Portanto, o sistema é submetido a várias etapas de expansão e compressão até que ele entre em equilíbrio (MARTINES; DAVOLOS; JAFELICCI JÚNIOR, 2000).

O método USE se caracteriza por ser uma técnica de rápida aplicabilidade, requer cerca de 15 min, podendo variar conforme a análise feita. Precisa de instrumentação simples e tem apresentado bom resultado na recuperação de analitos. Pode ser feita uma otimização da metodologia utilizada nas análises a fim de melhorar o resultado final, variando o solvente

utilizado na preparação da amostra, tempo de exposição a ondas ultrassônicas e quantidade de analito presente na solução (COTTA; REZENDE; LANDGRAF, 2009).

O método 3550C, que utiliza extração assistida por ultrassom, também pode ser usado para extrair orgânicos não voláteis e semi-voláteis de amostras sólidas, e garante que haja contato direto entre a matriz da amostra e o solvente de extração. Em relação ao método que se deve utilizar para esse tipo de procedimento, a amostra deve ser misturada com sulfato de sódio anidro e essa mistura deverá ser extraída com solvente por três vezes, usando o USE. O extrato resultante deve ser separado por filtração ou centrifugação, e depois poderá ser analisado. Os solventes e reagentes utilizados também podem gerar interferências para a amostra e por esse motivo torna-se importante fazer o branco (USEPA, 2007).

Em relação ao solvente que deve ser utilizado para amostras orgânicas, essas podem ser extraídas usando acetona/hexano (1:1) ou acetona/cloreto de metileno (1:1), mas esses podem ser substituídos caso seja necessário de acordo com a amostra a ser analisada. No caso da amostra de solo, deve ser feita a retirada dos objetos estranhos e a amostra deve ser muito bem misturada. Após realizar a mistura com o solvente e a observação da decantação, se houver a formação de uma camada de água, esta deve ser retirada. Para aplicar o método, deve-se tomar o cuidado para que esse seja feito rapidamente para evitar a perda de substâncias voláteis. Para amostras com baixas concentrações, é necessário que se pese, aproximadamente, 30 g de amostra em um béquer de 400 mL e 100 mL do solvente de extração. A extração deve ser feita por 3 min, depois deve ser filtrada com papel filtro e centrifugado em baixa velocidade, esse procedimento deve ser realizado por mais duas vezes adicionando 100 mL de solvente limpo. Já no caso de amostras com altas concentrações, com mais de 20 mg por quilo de analito, deve-se pesar apenas 2 g de amostra para um frasco de 20 mL, o volume do solvente utilizado deve ser calculado de forma que o volume total final seja de 10 mL. Realiza-se a extração e filtra-se usando uma pipeta de Pasteur com 2 a 3 cm de lã de vidro. É importante ressaltar que a eficiência de extração dessa técnica geralmente é menor do que a obtida usando Soxhlet (USEPA, 2007.).

Cardoso et al., o estudo da produção de biodiesel através de microalgas utilizou a extração por ultrassom para extrair o óleo presente na alga. Para isso, transferiu-se 15,5 g da amostra seca com 70 mL de hexano pra o equipamento de ultrassom por 30 min a 45 KHz. Após esse procedimento a solução foi filtrada a vácuo e transferida para o funil de decantação, depois transferiu-se para um evaporador rotativo durante seis horas.

## 2.7 Extração por SPME

Outra técnica de extração que pode ser mencionada é a SPME, que se caracteriza por ser uma das microtécnicas modernas, é seletiva, e altamente sensível, utilizada na extração de compostos voláteis ou semi-voláteis, polares ou apolares. Desenvolvida com o objetivo de tornar mais simples a preparação de amostras, reduzindo o tempo utilizado nas análises, custos e uso de solventes orgânicos, minimizando o descarte de resíduos tóxicos referente a mesma (H. S. Dórea, 2008). Essa técnica não é usada apenas para extração, mas também para pré-concentração dos analitos que pode ser utilizada em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Porém, é necessário que a técnica seja realizada de forma minuciosa para que se atinja bons resultados analíticos, torna de extrema importância também a otimização da técnica que será utilizada nas condições em que serão realizadas as análises. A fase extratora é um dos fatores mais importantes dessa técnica, existem no mercado várias opções, com diferenças na polaridade, espessuras de filme e essas apresentam variações de interação com cada analito (ROCHA, 2013).

O equipamento utilizado para a realização da SPME é composto por um bastão de sílica fundida, revestida por um filme fino da ordem de décimos de milímetros. Esse revestimento deve ser de um polímero ou de um sólido adsorvente. A fibra deve ser usada juntamente a um amostrador, onde ela fica presa a um êmbolo e na extremidade contrária ao êmbolo há um tubo hipodérmico, uma agulha. Esse tubo tem a finalidade de proteger a fibra e perfurar os septos para que seja recolhido o analito. Outro aspecto importante é entender que a técnica no modo direto envolve o equilíbrio do analito em duas fases distintas, e no modo *headspace*, entre três fases: a amostra (líquida/sólida), a fase de vapor sobre a amostra e a fase extratora. Preferencialmente, a amostra deve ser homogênea e os analitos devem ser estáveis nas fases envolvidas. Alguns parâmetros de análise devem ser cuidadosamente ajustados, tais como a temperatura de extração e o nível de agitação da amostra, a fim de maximizar a difusão do analito para fibra coletora (DÓREA, 2008).

Visto isso, tem-se que essa técnica pode ser usada na análise de solo contaminado por diesel ou seus similares. Luz, 2011 em pesquisa sobre a biodegradação do óleo diesel em determinado solo, aplicou-se essa técnica. No experimento, utilizou-se para a extração e pré-concentração uma fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno de 65 mm ligada por um tampão constituído de algodão, por cerca de 5 minutos. Os compostos que foram absorvidos na fibra foram dessorvidos no injetor do GC.

Todas as técnicas aqui citadas podem ser utilizadas no desenvolvimento da análise da degradação do óleo diesel no solo. A fim de alcançar os objetivos citados ao início, a pesquisa foi desenvolvida de forma que ao fim seja feita a proposta da metodologia facilitando as próximas pesquisas desenvolvidas na UFLA.

### 3 METODOLOGIA

Realizou-se um levantamento de métodos utilizados em análises de solos contaminados com óleo diesel, e também foi investigado quais métodos são mais efetivos, mais viáveis economicamente e, além disso, a partir dos resultados encontrados, analisou-se quais métodos aplicados que geraram o menor número possível de compostos tóxicos ou prejudiciais ao meio ambiente. Os métodos mais efetivos apontados aqui são os que apresentaram maiores porcentagens de degradação com determinado agente decompositor.

Primeiramente, realizou-se uma pré-seleção das bases de dados na qual foram utilizados o Periódico da Capes, artigos disponíveis na Scielo, a plataforma Web of Science, Scopus, além de livros, teses e dissertações de outras universidades. Aplicaram-se filtros priorizando trabalhos dos últimos vinte anos e trabalhos que apresentavam desenvolvimento na área de química analítica, principalmente aos que aplicavam a cromatografia gasosa. Fez-se uma leitura seletiva excluindo aqueles trabalhos que não tratavam de cromatografia, ou ainda que não descreviam claramente a parte química usada, alguns foram deixados ao longo dos resultados e discussão apenas com o intuito de exemplificar que existem métodos mais simples, ou ainda, métodos que se enquadram em outras áreas de estudo, como o caso da microbiologia. No geral, foi encontrada uma quantidade relativamente pequena de trabalhos, cerca de cinquenta, entre artigos, monografias e dissertações. Alguns, inclusive, abordam o estudo estatístico para gerar os resultados e outros com interesse exclusivamente para área agrária, que no caso não é o principal interesse e, por tanto, esses trabalhos foram usados apenas na construção da parte referencial.

Para realização da pesquisa foram usadas algumas palavras chaves, conforme os tópicos a seguir:

- Biodegradação de óleo diesel.
- Solo contaminado; óleo diesel.
- Degradação de óleo diesel; solo contaminado.
- Degradação; óleo diesel; microorganismos.
- Extração; óleo diesel.
- Cromatografia gasosa; óleo diesel.
- Quimiometria; óleo diesel.
- Degradation; diesel oil.

- Degradation; diesel oil; GC-MS.
- Degradation; diesel oil; soil.
- Chromatography; diesel oil; soil.
- Analytical Chemistry; degradation; diesel oil.

Depois dessa etapa, fez-se o estudo mais profundo dos trabalhos onde foi feito o registro das informações relevantes, como os métodos químicos utilizados, resultados, agente decompositor, duração do experimento, área de estudo, conclusões, ano e autor, com esses dados, construiu-se um quadro (Quadro 1). Essa etapa auxiliou na construção do referencial teórico em que descreveram os métodos que foram usados nos trabalhos utilizados.

Adiante, fez-se a interpretação dos resultados com a finalidade de organizar todas as informações importantes obtidas, de tal forma que, com os resultados dessa pesquisa, fosse possível à interpretação de qual método apresenta melhor resultado, a fim de que se possa transcreever a pesquisa fazendo melhorias, caso seja possível.

## 4 RESULTADOS

Fez-se um levantamento dos trabalhos encontrados que versam sobre a decomposição ou degradação do óleo diesel no solo dando enfoque aos que utilizaram a análise por cromatografia gasosa. Além disso, deu-se uma atenção especial para o método de preparo de amostra, a forma como a análise foi realizada, o solvente utilizado, bem como a identificação dos compostos de degradação, a parte estatística ou quimiométrica, e os resultados obtidos. A fim de organizar essas informações construiu-se o **Quadro 1**, que contém um resumo dos principais trabalhos avaliados.

Quadro 1 - Análise dos trabalhos que envolvem a investigação da degradação do óleo diesel no solo, usando GC.

Referência	Extração	Solvente	Análise	Agente decompositor	Método auxiliar	Analitos	Resultado
BENTO, Douglas Mayer. Et al 2005	Soxhlet	Hexano diclorometano	GC-MS GC-FID	Biossurfactante – fungo <i>Aspergillus</i>	Evaporador rotativo Estatística	Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs	Recuperação do solo sem adição do biossurfactante foi melhor.
CZARNY, J. et al. 2020	SLE	Acetona e hexano	GC-MS	Bacterias <i>Gammaproteobacteria</i> e acinetibacterias	Agitador rotativo Estatística	Hidrocarbonetos	Degradação de 90% do óleo no solo
KAZEMZADEH, Somayeh et al. 2020	-	Hexano	GC-MS	Bactéria <i>Klebsiella variicola strain</i> SKV2	Estatística Espectrofotômetro	Hidrocarbonetos	Degradação >71%
SARAIVA, Lívia Antônia de Mello et al. 2018	Ultrassom	Diclorometano e Hexano	GC-MS	Rizobacterias – biossurfactantes	Evaporador rotativo Estatística	HPAs	Eficiência de 86,4%.
SILVA, Luana Monteiro et al. 2018	Ultrassom	Diclorometano e acetona	GC-MS	5 tipos de bactérias	Evaporador rotativo Estatística	Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs	Degradação > 60%
ARRUDA, Flávia Virgínia Ferreira de et al. 2011	SLE	Diclorometano	GC-MS	Fungos – <i>Aspergillus terreus</i> , <i>cunninghamella echinulata</i> e <i>Penicillium commune</i>	Estatística	Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs	Degradação > 80% para compostos oleosos

LUZ, Cleber C. et al. 2011	SPME	-	GC-MS e GC-FID	<i>Microbios - Acinetolacter Baumannii</i>	Estatística	Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs e fez-se a caracterização dos microrganismos	Degradação > 60%
JACQUES, Rodrigo Josemar Seminot et al. 2009	Soxhlet	Hexano	GC-MS	Consórcio de uma espécie de fungos e seis bactérias	Evaporador rotativo Estatística	HPAs	Degradação de 48% de antraceno, 67% de fenantreno e 22% de pireno.
OSINOWO, Ibrahim et al. 2021	SLE	Tolueno	GC-MS	<i>Micrococcus luteus trpE16</i> e <i>Bacillus subtilis</i> DNK UT 02, esterco de vaca e de ave.	Estatística	Hidrocarbonetos totais do petróleo	Degradou 96,8%
LJEŠEVIĆ, Marija et al 2019	SLE	Hexano e tolueno	GCxGC TOF MS	<i>Oerskovia sp</i> CHP-ZH25	Gravimetria	HPAs	A degradação foi efetiva > 70%
ALEXANDRINO, Guilherme L. et al 2019	-	Diclorometano	GCxGC-HRMS	-	Estatística	Óleo diesel leve	Degradação eficiente
LUNA, Saionara et al. 2015	Soxhlet	Hexano	GC-MS	Extrato vegetal de <i>araceae</i> como biosurfactante	Espectrofluorimetria de IV, quimiometria – PCA	Hidrocarbonetos	Degradou cerca de 87,60%
MONTICELI, et	Soxhlet	Não foi	GC-FIC	Consortio microbiano	Estatística	Hidrocarbonetos	Degradação de

al. 2018		descrito		associado a biorreatores			80%
CAVALCANTI, Jorge Vinicius Fernandes Lima et al. 2021	SLE	Hexano; diclorometano	GC-FID	Percarbonato de sódio como oxidante	Estatística	HPAs	Degradação de 75%
PRUS, Wojciech; FABIĄSKA, Monika J.; ŁABNO, Radosław et al 2015	Extrator de solvente acelerado Dionex 350	Diclorometano	GC-MS	Algas bacterianas	Estatística	HPAs e outros compostos do petróleo	Degradação não foi satisfatória
KACZOREK, Ewa et al., 2014	Eter dietílico como extrator	Acetato de etila	GC-FID	Consórcio de bactérias e leveduras ( <i>ramnolipídeos</i> )	Estatística e quimiometria	Hidrocarbonetos alifáticos	Degradação de ~100%
SAFITRI, Rina Marita et al., 2018	-	-	GC-MS	Consortio de <i>bacillus</i> e <i>pseudomonas</i>	Estatística e espectrofotometria	Hidrocarbonetos	Degradação de 57,56%
MNIF, Inés et al., 2015	Sonicação de amostras	Clorofórmio	GC-FID	Consortio de 4 bactérias	Estatística e gravimetria	Hidrocarbonetos	Degradação de 55,4%
OKONKWO, O. J et al. 2021	SLE	Acetona e solvente de cloreto de metileno	GC-MS	Microrganismos nativos	Estatística	Hidrocarbonetos totais	Degradação de 41,61%
SUN, Wuyang et	SLE	N-hexano	GC-MS	Consortio de 12	Estatística e	Hidrocarbonetos	Degradação de

al., 2019				bactérias	espectrofotometria		66%
ABDOLLAHINEJ AD, 2020.	Ultrassom	Acetona e n-hexano	GC-FID	<i>Convermicompostagem</i> corrigida com lodo e minhoca	Ultrassom, filtração a papel e estatística	Hidrocarbonetos totais	Degradação de 73,9%
RAJU, Manddela Naga et al., 2017	Ultrassom	Hexano	GC-FID e GC-HPLC	<i>Bacillus B</i>	Estatística	Hidrocarbonetos totais	Degradação de 83%
DE OLIVEIRA, Amilton Moreira et al., 2020	Soxhlet	Hexano e tolueno	GCXGC-FID/MS	Consortio de bactérias e leveduras	Quimiometria e estatística	Hidrocarbonetos	Degradação efetiva

FONTE: Do autor (2021).

Ao fazer uma análise detalhada, verificou-se que a técnica de extração mais utilizada foi a extração de Soxhlet (BENTO, 2005; JACQUES, 2009; LUNA, 2015; DEON, 2012; MONTICELI, 2018), muitas vezes baseado no método oficial da USEPA 3540C. Porém, consta na literatura uma pesquisa a respeito da produção de óleos a partir de microalgas, que compara métodos de extração, no qual o resultado foi quinze vezes melhor quando foi usada a extração por ultrassom e em vez de Soxhlet (CARDOSO, 2014). Levando em consideração essa informação nas análises da degradação do óleo diesel no solo, que também utilizaram o ultrassom e obtiveram um bom resultado, pode-se concluir que a técnica de ultrassom também pode ser usada, em especial para o método validado da USEPA 3550C (SARAIVA, 2018; CAVALCANTI, 2021 e SILVA, 2018). Porém, deve-se analisar o principal objetivo do estudo em questão, pois no caso do ultrassom usa-se uma menor quantidade de solvente e é uma técnica mais rápida quando comparada com Soxhlet. Quando se aplica técnicas de SLE, que não seja a de Soxhlet, é necessário que seja feito um controle da eficiência do método. No caso analisado, quando se aplicou a metodologia EPA 3050C o método apresentou uma média de 113,4% de recuperação analítica (SARAIVA, 2018 e SILVA, 2018). Pode-se observar em outro caso a recuperação para HPA, usando HPAs deuterados como padrão interno de 76% - 104%, variando entre essa porcentagem dependendo do HPA analisado, utilizando extração sob ultrassom (EPA 3550C) para seus estudos (SUN, 2018).

Outros métodos de extração usados, que reduzem a quantidade de solvente empregado, foram a SPME, que não utiliza solvente, e o extrator acelerado por solvente dionex, que executa a extração de compostos orgânicos presentes em amostras sólidas e semi-sólidas, em poucos minutos e com baixo consumo de solvente (LUZ, 2011, PRUS, 2015). Os fatores que podem explicar a variedade de técnicas de extração utilizadas para uma análise semelhante podem ser os solventes, equipamentos disponíveis no laboratório, custo de análise, custo dos equipamentos, falta de conhecimento nas técnicas mais atuais e tempo disponível para obter o resultado. O que justifica Soxhlet ter sido a técnica mais utilizada é ser uma técnica de baixo custo, ser exaustiva e ser uma metodologia oficial. Cabe ressaltar que em alguns trabalhos houve dificuldade para fazer a identificação do método de extração utilizado devido a falhas na descrição da metodologia, ou alguma dificuldade na tradução do trabalho (PUNTUS, 2018, ALEXANDRINO, 2019 e KAZEMZADEH, 2020).

Em relação aos solventes utilizados nas técnicas de SLE, os mais comuns são o hexano e/ou o diclorometano. O hexano apresenta propriedades importantes para esse tipo de análise,

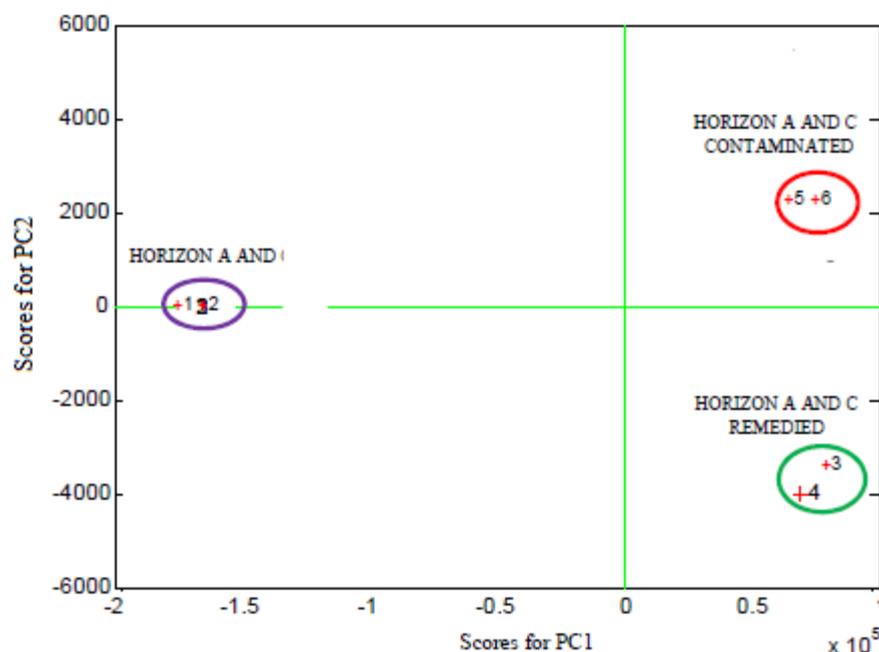
pois é um composto alifático, apolar e é bom extrator para solutos apolares. Já o diclorometano é um solvente clorado, com baixa polaridade. Por serem solventes que apresentam boa interação com os compostos presentes em derivados do petróleo, esses solventes foram usados para a extração dos compostos em vários trabalhos (PRUS, 2015, DEON, 2012, CALVALCANTI, 2021; LJESVIC, 2019; JACQUES, 2009; ARRUDA, 2011; SILVA, 2018; SARAIVA, 2018; KAZEMZADEH, 2020; SILVA, 2018; CZRMY, 2020; ALEXANDRINO, 2019 e BENTO, 2005). Observou-se também a utilização da mistura acetronitrila/diclorometano e acetoneitrila/hexano (CALVALCANTI, 2021). O tetracloreto de carbono, que é um composto comumente usado como solvente de gorduras e óleos têm características apolares, também foi utilizado (PUNTUS, 2019). Houve uso do tolueno que é um solvente aromático, apolar e também foi observada a mistura de tolueno e hexano (LJESVIC, 2019; MACHADO, 2020; OSINOWO, 2021; DE OLIVEIRA, 2020). Além de usar o hexano, usaram também a acetona em uma mistura e acetona com cloreto de metileno, foi observado também a mistura de diclorometano com n-hexano e n-hexano com acetona (CZRMY, 2020; BENTO, 2005; ABDOLLAHINEJAD, 2020; OKONKWO, 2021; SUN, 2019). Nota-se que alguns pesquisadores selecionaram dois tipos de solventes, um com característica pouco polar e outro com característica apolar, com o propósito de ampliar a faixa de compostos extraídos que serão analisados posteriormente. Visto que a extração é a parte inicial da análise, caso ela não apresente boa extração dos compostos na matriz, o resultado final da pesquisa será comprometido, apresentando uma porcentagem de degradação maior do que a real.

Alguns trabalhos empregaram outros métodos complementares à cromatografia ou aos métodos de extração com diferentes finalidades (JACQUES, 2009; SILVA, 2018; SARAIVA, 2018 e BENTO, 2005). A espectrofotometria foi utilizada para analisar o efeito do biossurfactante na amostra, para avaliar o teor total de hidrocarbonetos e também para monitorar o agente decompositor (MACHADO, 2020; KAZEMZADEH, 2020; OKONKWO, 2021; SUN, 2019). Também foi observado o uso da gravimetria para monitorar a biodegradação do óleo diesel (LJESVIC, 2019).

Com relação ao tratamento dos dados obtidos por GC, a quimiometria foi usada com o objetivo de tratar dados, identificar padrões, agrupar amostra e detectar amostras anômalas, com o uso de diversos algoritmos, sendo um dos mais comuns o algoritmo denominado Análise de Componentes Principais (PCA). Esse algoritmo trabalha com o número de

variáveis reduzidas a algumas dimensões, permitindo a detecção dos principais padrões semelhantes e a correlação entre as variáveis do experimento, possibilitando a separação das amostras. O trabalho de Luna, 2015 o PCA foi utilizado em combinação com a fluorescência induzida por LED com o intuito de discriminar amostras de solo contaminado. Foram realizadas 48 análises, que visaram uma análise exploratória e classificatória dos dados e otimização do mesmo. Com PC1 versus PC2 foi possível separar as amostras de acordo com sua composição química em três regiões distintas, como pode ser visto na **Figura 4**. Pode-se observar que nas amostras dos horizontes A e C contaminados e remediados foram dispostas no lado direito, nos quadrantes 2 e 4, enquanto que os horizontes A e C estão nos quadrante 1 e 3. Veja que as amostras do lado esquerdo seriam a amostra sem manipulação. Nesse caso disposto no gráfico, o PCA auxiliou na confirmação de que a remediação foi eficaz e o quão eficiente foi. Foi comprovado que a remediação foi eficaz, esses métodos foram associados ao GC-MS. (LUNA, 2015, KACZOREK, 2014).

Figura 4 - PC1 vs. PC2 de amostras de solo.

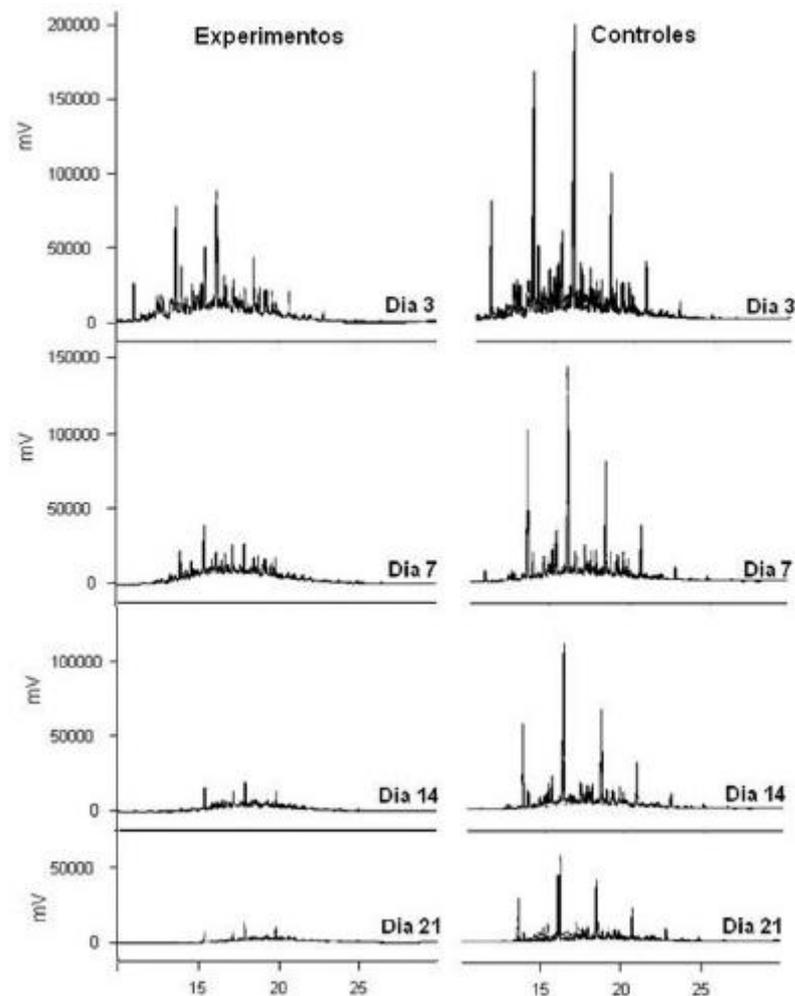


Fonte: LUNA, 2015.

A fim de identificar as substâncias presentes no óleo diesel analisado e determinar se a biodegradação estava sendo efetiva ou não, faz-se necessário o emprego de métodos para identificação dos compostos. A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para identificar grupos funcionais e ligações químicas de interesse (LUNA, 2015; PUNTUS, 2019). Já o GC-FID é utilizado na quantificação relativa dos compostos, análise que permite o monitoramento

da degradação dos hidrocarbonetos e a análise da formação de novos picos, como podem ser observados na **Figura 5**, através da comparação das áreas dos picos. Já para a quantificação empregando curva de calibração ou para fazer a identificação dos picos, se faz necessário o uso de padrões. Ao longo da análise, a diminuição da área dos picos presentes no tempo zero indicava a degradação do composto e a formação de um novo pico indicava que houve a formação de subprodutos (CAVALCANTI, 2021 e MONTICELI, 2018; ABDOLLAHINEJAD, 2020; MNIF, 2015, RAJU, 2017; KACZOREK, 2014). Na **Figura 5**, pode-se observar que nos cromatogramas controle, também há diminuição de alguns picos, o que pode indicar que a própria microbiota do solo atua de forma a promover a degradação. Além disso, nota-se que a produção de subprodutos foi baixa ou inexistente nos cromatogramas do experimento, visto que os picos remanescentes após 21 dias são os mesmos presentes no início do experimento. Um cromatograma que não foi observado e seria de suma importância, é o referente ao dia 0, pois com ele seria possível identificar se houve evaporação de algum composto leve do dia 0 para o dia 3.

Figura 5 - Cromatogramas (GC-FID)



LEGENDA: Cromatogramas obtidos por GC-FID de 0,1% de diesel (v/v) em meio mineral líquido após 3, 7, 14 e 21 dias na presença do consórcio microbiano (experimentos) e na ausência do consórcio microbiano (controles)

FONTE: LUZ, Cleber. 2011.

Contudo, para a identificação dos compostos a GC-MS é a técnica mais adequada, por ser uma técnica que registra a razão massa carga dos íons formados a partir dos compostos e por permitir a identificação dos compostos, e por isso foi a mais usada no estudo de degradação do óleo. No geral, para fazer a identificação dos compostos, comparou-se os espectros de massas gerados a partir do pico da amostra injetada, e os espectros já existentes na biblioteca do software usado (PRUS, 2015; LUNA, 2015; OSINOWO, 2021; JACQUES, 2009; ARRUDA, 2011; SILVA, 2018; SAFITRI, 2018; SUN, 2019; OKONKWO, 2021; SARAIVA, 2018; KAZEMZAD, 2020 e CZARMY, 2020). Alguns autores optaram por usar dois métodos de análise, combinando dados de GC-FID e GC-MS, a fim de obter informações

qualitativas e quantitativas (LUZ, 2011 e BENTO, 2005). E, por fim, alguns autores utilizaram um equipamento ainda mais sensível, a Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). Nesse tipo de análise foi possível observar os compostos minoritários, que quando estão em baixas concentrações não são detectados por GC convencional, mas por GC×GC torna-se possível e, quando comparada à GC, a detecção melhorou em até 5x (LJESEVIC, 2019; DE OLIVEIRA, 2020 e ALEXANDRINO, 2019). Além disso, observou-se um trabalho que utilizou a GC×GC e a quimiometria (PCA) para diferenciar as amostras ao longo do tempo. Como resultado, através dos dados de PCA foi possível verificar a redução dos alcanos, naftenos e óleo diesel leve. E através dele, foi possível explicar a resistência preferencial dos ramificados e n-alcanos > C14 durante os primeiros dias de análise (ALEXANDRINO, 2019).

Já em relação ao uso da estatística, a maior parte dos trabalhos faz sua aplicação a fim de medir se realmente a degradação foi eficaz (PRUS, 2015; SAFITRI, 2018; ABDOLLAHINEJAD, 2020; OKONKWO, 2021, SUN, 2019; MNIF, 2015, RAJU, 2017; DEON, 2012; LUNA, 2015; PUNTUS, 2019; LJESEVIC, 2019; OSINOWO, 2021; JACQUES, 2009; LUZ, 2011; SILVA, 2018; SARAIVA, 2018; CZARMY, 2020 e KAZEMZADEH, 2020). A estatística foi utilizada também para calcular o percentual de substâncias presentes na amostra, outras vezes para realizar um teste estatístico de análise de variância. A ANOVA foi utilizada para avaliar a redução de carbono total experimental e teórico, ou ainda para avaliar o potencial de remoção dos HPAs observando se há diferenças significativas entre a média de remoção com os agentes decompositores usados, como também para comprovar a degradação dos compostos ou detectando alguma discrepância (SAIRAVA, 2018; CAVALCANTI, 2021; RAJU, 2017; ABDOLLAHINEJAD, 2020; KACZOREK, 2014; MACHADO, 2020 e BENTO, 2005). Fez-se a análise de variância dos dados de remoção dos óleos, compararam-se as médias e trataram-se os dados pelo teste de Tukey. Esse teste foi usado para na análise de variância dos resultados da contagem microbiana (MACHADO, 2020; RAJU, 2017). Já o desvio padrão foi usado para constatar se houve flutuação do sinal instrumental, para comparar as médias obtidas entre os agentes decompositores usados, comparar as médias da degradação dos resultados (SARAIVA, 2018; SILVA, 2018; MACHADO, 2020).

Os trabalhos analisados foram realizados a partir da contaminação do solo feita propositalmente de maneira controlada pelos pesquisadores, e por ser o desenvolvimento de

uma pesquisa é um fator positivo, já que ao se manipular o óleo diesel é possível determinar exatamente quais compostos estavam no solo antes da contaminação, facilitando assim a possibilidade de identificação dos subprodutos formados além de permitir ao pesquisador a possibilidade de elaborar uma metodologia mais segura para ser aplicada a uma área que sofreu com um acidente.

A duração dos experimentos, de maneira geral, variou de 7 dias a 176 dias (CZARMY , 2020; JACQUES, 2019). Deve-se cuidar para que os experimentos realizados em curtos períodos de tempo não limitem o resultado, visto que os agentes decompositores podem apresentar necessidade de quantidades de dias diferentes para degradar diferentes compostos.

## 5 DISCUSSÃO

Depois de feita a análise para a construção da presente revisão bibliográfica, nota-se que é possível avaliar se houve degradação dos compostos do diesel sem fazer a utilização de métodos instrumentais, acompanhando apenas a respiração dos microrganismos. Esses, ao degradar compostos do óleo, liberam  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Ao se medir a quantidade de  $\text{CO}_2$  que foi liberado pela respiração microbiana, que indica a biodegradabilidade das substâncias presentes, pode-se quantificar a degradação por meio da atividade metabólica. Nesse tipo de técnica, é necessário que haja uma medição da produção de  $\text{CO}_2$  com e sem a presença dos microrganismos. Entretanto, essa técnica é usada para profissionais que não dispõem de equipamentos ou não tem o conhecimento necessário para aplicar métodos instrumentais (MACHADO, 2020 e Deon, 2012). Outro método utilizado para monitorar a biodegradação foi a gravimetria, que se destaca por ser um método de fácil acesso, não é necessário um conhecimento avançado na área, porém como desvantagens não há nenhuma informação dos compostos presentes envolvidos no processo de degradação. No caso da análise da contaminação do solo por óleo diesel parte dos compostos se evaporam e a gravimetria não consegue distinguir essa fração. Por outro lado, essa técnica é bastante interessante na seleção de microrganismos com potencial para degradação, pois é possível fazer diversos testes com diversos microrganismos diferentes sem a necessidade de realizar extrações ou fazer análises instrumentais. E, dessa forma, apenas aqueles microrganismos que realmente são efetivos no processo de degradação poderiam ser investigados de forma mais aprofundada através de extrações e análise instrumental (LJEŠEVIĆ, 2019).

A técnica de extração mais comumente usada para análise de degradação do óleo diesel é a SLE. Com destaque para a USE e, principalmente, a Soxhlet, o fato de elas serem as mais usuais deve-se a elas serem metodologias oficiais. A extração de Soxhlet é exaustiva, o que significa que consegue garantir a extração completa dos analitos, sendo assim, a mais adequada. Já a extração por ultrassom é uma técnica mais rápida quando comparada a Soxhlet, que usa menor quantidade de solvente, mas a porcentagem da extração varia em cada caso e os interferentes podem influenciar mais no resultado final da extração. Por isso, é interessante fazer o cálculo da eficiência de extração, garantindo assim que o analito seja extraído de forma completa, para evitar que problemas de extração cometidos durante a extração estejam relacionados a alguns resultados de baixa degradação no fim da análise. Em um dos trabalhos que fizeram uso da extração por ultrassom, a recuperação foi de 113,4%, o

que pode justificar isso, é ter ocorrido um erro para mais, devido a alguma interferência na análise. Deve-se destacar que se o analista não possuir certos conhecimentos na área ou não for monitorado por um profissional capacitado, isso pode ocasionar erros múltiplos. Um dos erros seria fazer com que o analito não sejam totalmente extraído da amostra inicial, o que poderá fazer com que haja uma porcentagem de degradação maior do que a real. Outro fator que ocasionaria um erro, é a evaporação do solvente antes da análise, o que ocasiona que a concentração do analito seja mais alta.

Quando se leva em consideração que o procedimento de biodegradação tende a reparar danos ao meio ambiente, o ideal é que se utilize técnicas que gerem a mínima quantidade possível de resíduos levando em consideração os princípios da química verde. A SPME seria a técnica de extração mais adequada sob esse aspecto, pois é uma técnica altamente sensível, o tempo de extração é pequeno quando comparado a Soxhlet e possui a vantagem de não ser necessário o uso de solvente, gerando uma quantidade mínima de resíduos. Porém, essa técnica tem a capacidade de extração limitada, ou seja, não exaustiva, porque a partir do momento em que a fibra utilizada atinge o equilíbrio termodinâmico, não haverá mais extração, o que pode ser considerada uma desvantagem já que parte do analito ficará retido na amostra. Além da limitação da fibra, é um procedimento mais complexo, que se faz necessário que o analista tenha conhecimento mais avançado no ramo da química analítica, e talvez por isso o resultado tenha sido comprometido (LUZ, 2011). Uma das críticas à SPME é o elevado custo das fibras usadas na análise, chegando a custar cerca de R\$1200,00. Entretanto, cabe ressaltar que uma fibra pode ser usada em cerca de 100 análises, o que torna o custo por análise próximo à R\$ 12,00, podendo ser mais barato que as extrações que empregam grandes quantidades de solventes orgânicos de elevada pureza.

Quando se trata da identificação dos compostos presentes nas amostras ou formados no processo de degradação, a GC-MS e a GC×GC-MS são adequadas para esse tipo de análise, por serem sensíveis e conseguirem detectar compostos, mesmo que estejam em baixas concentrações, possibilitando inclusive que o analista consiga determinar exatamente quais foram os compostos que se degradam melhor, em função do tempo (LJESEVIC, 2019; DE OLIVEIRA, 2020 e ALEXANDRINO, 2019). No caso da GC×GC, a melhoria na análise se dá por ser uma técnica ainda mais sensível e que permite separar alguns compostos que se apresentam coeluídos no GC. Um exemplo, é a mistura complexa única não resolvida (UCM), que são picos coeluídos que não são identificados na GC, exceto os picos mais intensos, no

caso da GCxGC é possível melhorar a separação e identificação desses picos e por isso torna-se importante caso seja possível a análise nesse equipamento (DE OLIVEIRA, 2020).

Ao fazer o estudo dos trabalhos, notou-se que houve a descrição da espectroscopia no infravermelho, que se caracteriza por ser um método rápido, mas não é capaz de fazer a separação dos compostos e permite apenas a determinação do teor de hidrocarbonetos. Seria extremamente interessante, do ponto de vista analítico, se houvesse a análise nos dois equipamentos para que houvesse uma comparação dos métodos, usando a matriz com as mesmas características físico químicas (LUNA, 2015). A espectroscopia de IV foi aplicada após o cultivo dos microrganismos para determinar o teor de óleo residual, através da determinação do teor de hidrocarbonetos por uma série de agrupamentos C-C e C-H.

Um fato que realmente chama atenção é que não houve a análise dos produtos formados, mesmo nos artigos que foram utilizados equipamentos capazes de detectar e identificar qual era a substância. E esse é um procedimento realmente muito importante, pois, assim, o pesquisador pode garantir que, ao remediar o solo, ele não estará comprometendo ainda mais o meio em que se faz a remediação com a formação de produtos ainda mais tóxicos, após a degradação do óleo a partir dos microrganismos usados. E, além disso, ao se fazer a identificação dos subprodutos é possível identificar se houve predileção do microrganismo utilizado algum grupo de compostos específico, auxiliando na otimização da remediação.

A respeito dos microrganismos usados, observa-se os mais diversos tipos de bactérias e fungos, até mesmo alguns autores decidiram por fazer o consórcio de bactérias e fungos. Observa-se o uso de sementes, algas bacterianas, rizobactérias, minhoca e até mesmo bactérias associadas a esterco animal. De modo geral, pode-se afirmar que o resultado que irá se obter a partir de cada agente decompositor do óleo diesel está relacionado também com outros fatores físico-químicos do solo, como temperatura, pH, granulometria e minerais presentes no solo. Inclusive, alguns dos agentes decompositores podem não se adaptar ao solo contaminado, fazendo com que o método não seja eficaz. Outro ponto que deve ser tratado é que, ao fazer a biorremediação, por exemplo, o pesquisador manipula o agente decompositor para o solo para fazer a análise. E em algumas pesquisas, ao se fazer uma amostra sem esse agente para controle, observa-se que as próprias bactérias já existentes no solo são eficazes assim como as que foram manipuladas (conforme observado no controle da **Figura 4**), apresentando uma defesa natural do solo à toxicidade dos compostos do óleo diesel. Esse

procedimento é conhecido como atenuação monitorada, onde ao usar microrganismos nativos evita-se o dano ainda maior ao meio ambiente.

Para que seja realizada a análise, é necessário que seja feito o branco da análise para avaliar de forma correta o controle da degradação. Quando o método se trata da identificação por GC, observa-se que o branco é realizado de duas formas: ou os pesquisadores optaram por fazer uma amostra sem a adição dos microrganismos escolhidos por ele para degradar o óleo, ou realizou a análise da amostra no primeiro dia e esse foi o branco. Podemos observar que usar uma amostra de solo como controle, para no final comparar se a degradação foi efetiva ou não, do ponto de vista analítico não é a melhor forma, a menos que se esterilize o solo antes. Isso porque o solo já possui microrganismos capazes de exercer a função de degradação. Assim, ao se inserir o óleo nessa amostra, mesmo que o pesquisador não tenha adicionado o agente decompositor, a degradação vai acontecer de forma natural. Em alguns casos, na conclusão das pesquisas foi constatado que o solo sem adição do agente decompositor apresentou maior eficácia do que quando se adicionou, alcançando até 75% da degradação dos HPAs presente na amostra (BENTO, 2005). Então, do ponto de vista analítico, recomenda-se que o branco seja feito a partir da área dos picos apresentados no GC, a partir do tempo zero.

Algo que se destaca na análise é que algumas bactérias são usadas com o objetivo de produzir biossurfactantes. Esses são compostos que apresentam atividade surfactante, tendo a função de melhorar a solubilidade dos contaminantes presentes na análise a fim de acelerar o processo de biodegradação. Por outro lado, se os compostos ficam mais solúveis, ele poderá atingir mais rápido a fração de água subterrânea piorando a contaminação que antes era apenas do solo. E se não houver esse tipo de tentativa de remediação pode ser que as próprias bactérias presentes no local de contaminação consigam degradar o óleo. Porque, uma vez que a remediação de um acidente deve ser feita fora do laboratório, torna-se extremamente complicado controlar todos os efeitos que serão gerados a partir da ação de remediação. E é importante ressaltar também que, dependendo do local que ocorrer o acidente e a temperatura do ambiente, alguns compostos vão ser rapidamente evaporados. (BENTO, 2005).

Além disso, alguns autores fizeram o uso de reagentes químicos como agente decompositor dos hidrocarbonetos. Observou-se o uso do permanganato de sódio e obteve resultado de 75% de degradação dos HPAs presentes no óleo diesel (CAVALCANTI, 2020). Há também outros tipos de oxidantes usados na degradação de HPAs, porém, não foram

usados no estudo da degradação do óleo diesel, mas é relevante levar em consideração a observação que se fez. Constatou-se que o uso do permanganato de potássio na degradação de HPAs foi eficaz, mas houve formação de compostos HPAs oxigenados, que foi verificado por uma análise feita por GC-MS. Foi constatado que a formação desses subprodutos é devido a degradação incompleta dos compostos, o que pode ser evitado usando a dosagem correta do oxidante (BOULANGE, 2019). Já em outra pesquisa, aponta como desvantagem de usar oxidantes no tratamento de solo contaminado com HPAs é a produção rápida da hidroxila no solo, apresentando curto prazo de vida útil e baixa transferência de massa em ambiente subterrâneo (VENNY, 2012). Nesses dois trabalhos fica explícita a necessidade de que haja a análise dos subprodutos formados a partir da degradação visto que HPAs oxigenados também podem ser tóxicos. Na pesquisa de Cavalcanti, que avaliou a degradação dos HPAs provenientes de óleo diesel, não foi feita a análise para identificação, porém, pode ser que o mesmo subproduto tenha sido formado, já que em ambas as pesquisas foram usadas o permanganato como agente decompositor (CAVALCANTI, 2020).

Visto isso, para análise da degradação de óleo diesel em solo contaminado, sugere-se que as próximas pesquisas sejam feitas de forma mais cuidadosa, buscando profissionais capacitados, com conhecimentos químicos para aplicar as técnicas analíticas da melhor forma possível, esse ponto foi levantando ao logo do trabalho porque muitas pesquisas foram desenvolvidas por pesquisadores de outras áreas, como agrônomos, engenheiros ou biólogos que não tem tanto conhecimento em instrumentação química. Caso seja empregada alguma metodologia baseada na extração com solventes, sugere-se que use dois solventes de polaridades complementares para que haja extração mais ampla dos compostos presentes na amostra, como o diclorometano ou hexano com tolueno ou acetona. Além disso, uma técnica de extração que se torna interessante ser usada é a SPME, pois evita o uso desses solventes que são tóxicos, é automatizada, sensível e minimiza o tempo de análise.

Ao que se refere a detecção e identificação dos compostos, recomenda-se que seja usado o GC-MS. E, ainda, caso os estudiosos que se interessem pela área tenham acesso ao GC-MS ou ao GC×GC-MS, que seja feita a análise do produto gerado na degradação do óleo diesel por diferentes agentes decompositores, assim, podendo evitar também o problema de se gerar um subproduto ainda mais tóxico causando um problema ainda maior.

A estatística mostra-se útil quando se trata de cálculos necessários para se determinar a porcentagem de degradação, principalmente quando se mede área de pico, área total dos

compostos ou quando se faz uso da gravimetria. Outra ferramenta auxiliar de extrema importância é a quimiometria que pode ser aplicada aos dados de GC para organizar os resultados obtidos, classificar e detectar resultados discrepantes, tendências de similaridade entre amostras ou ainda ser usada como ferramenta para verificar quais picos aumentaram ao longo do tempo, indicando a formação de subprodutos. Nos trabalhos investigados nesse estudo, a quimiometria foi empregada em apenas dois trabalhos. O motivo dos pesquisadores não terem usado provavelmente se dá devido à sua complexidade ou falta mão de obra capacitada. Entretanto, trabalhos que envolvem vários cromatogramas ao longo do tempo de degradação, sendo que cada cromatograma pode apresentar centenas de picos variando ao longo do tempo, a análise quimiométrica permite extrair informações que são impossíveis de serem obtidas empregando apenas médias das áreas de pico. Então, não se pode afirmar que a ausência da técnica compromete a análise, mas seria uma ferramenta extremamente útil para agrupar os resultados.

Outro estudo que considera-se importante é a análise de degradação de óleo diesel no solo usando um reagente químico como agente de degradação, já que os estudos citados nesse trabalho, foram análises feitas fora do Brasil e a composição do óleo diesel pode sofrer alteração. Os trabalhos aqui citados, que usaram esse tipo de reagente para degradar HPAs obtiveram resultados satisfatórios com mais de 70% da quantidade total de hidrocarbonetos degradados. E, nesse caso, indica-se que haja atenção redobrada na dosagem do reagente usado a fim de evitar que subprodutos ainda mais tóxicos sejam formados. A partir de todo esse estudo, construiu-se a proposta de duas metodologias para análise química da degradação do óleo diesel no solo.

### **5.1 Proposta de metodologia**

Para a análise química da degradação do óleo diesel no solo por um agente decompositor, sugere-se dois caminhos diferentes. No primeiro caso, opta-se por utilizar a metodologia oficial, usando EPA 3540C (extração Soxhlet) como método extrator. Primeiro deve-se retirar os corpos sólidos estranhos da amostra, tais como: galhos, folhas, pedras ou outros. Depois, deve-se pesar 10 g da amostra e adicionar 10 g de sulfato de sódio anidro, colocando-os em uma extração com um tampão de lã de vidro acima e abaixo da amostra. Adiciona-se 300 mL do solvente, que pode ser a mistura de hexano e acetona como sugerido na metodologia ou ainda diclometano com metanol que é menos tóxico e, segundo a literatura, não compromete significativamente extração de HPA. O solvente é inserido em um balão de fundo redondo de

500 mL, adaptado ao tubo condensador e o sistema é deixado em refluxo de 16 a 24 horas. Depois que o processo finaliza e resfria, faz-se a concentração do extrato empregando um rotaevaporador e injeta-se 1  $\mu$ L do extrato concentrado no GC-MS em uma temperatura de 250 - 300 ° C. A temperatura da coluna cromatográfica deve ser programada para rampas de aquecimento da seguinte forma: temperatura inicial de 40 °C por 4 min, aquecimento de 40 - 270 ° C a 10 ° C por minuto, a temperatura final de 270 °C deve ser mantida até que o benzo[ghi]perileno eluir. Supondo um experimento com duração de 90 dias de degradação, sugere-se que essa análise seja realizada em triplicata no dia 0 (branco), dia 1, dia 15, dia 30, dia 60 e dia 90. Assim, com os cromatogramas gerados, pode ser feita a comparação dos picos para determinar se a degradação foi efetiva e se houve formação de novos picos, sendo os picos identificados por GC-MS.

Já no segundo caso, propõe uma alteração apenas no método de extração utilizado, substituindo a extração de Soxhlet por SPME. Nesse caso, para fazer a coleta da amostra deve-se usar uma fibra de SPME de polimetilsiloxane/divinilbenzeno com diâmetro de 65 mm, inserindo cerca de 5 g de solo contaminado em um tubo para SPME e mantido por 45 min, para que seja realizada a extração e pré-concentração dos compostos de interesse presentes no *headspace*. Os compostos que forem sorvidos pela fibra devem ser dessorvidos no injetor do GC-MS a 250 °C por cerca de 5 min. As informações cromatográficas e o tempo de degradação serão os mesmos do método anterior. Entretanto, sugere-se fazer a análise quimiométrica (PCA), podendo identificar se houve a formação de subprodutos ou não e além disso, fazer a verificação dos picos que diminuiram ao passar do tempo e quais picos surgiram ou aumentaram a concentração. Dessa forma, pode-se confirmar se todos os compostos de fato degradaram, confirmando assim se a remediação foi eficaz. Essas propostas foram feitas para que a própria autora realize o experimento em sua pós graduação.

## 6 CONCLUSÃO

A presente pesquisa teve como proposta fazer uma revisão bibliográfica para que fosse possível apontar os melhores métodos analíticos para a investigação de degradação de óleo diesel, quando contamina o solo. No desenvolvimento da pesquisa, deparou-se com inúmeras opções de agente decompositor, que podem ser usados nessa área, e variações de combinações de técnicas analíticas que viabilizassem a obtenção do resultado detalhado.

Em suma, se direciona que as próximas pesquisas desenvolvidas na UFLA devam ser feitas usando uma das metodologias propostas nesse trabalho. De acordo com os equipamentos disponíveis no laboratório, devem ser usados uma técnica de extração que gere o mínimo de resíduo possível, como no caso da SPME (metodologia II). Ou, caso não seja possível, usar a SLE, no caso da extração por Soxhlet (metodologia I). Já para fazer a identificação dos compostos, se recomenda a GC-MS para fazer o monitoramento da degradação, sendo possível a identificação de cada produto. Sugere-se também que faça o estudo dos subprodutos, caso haja formação. É importante que o pesquisador anexe os cromatogramas obtidos na análise de forma geral e não em triplicatas, para que caso outro pesquisador tenha interesse consiga entender exatamente o que foi obtido no estudo, esses cromatogramas devem ser dispostos do dia zero ao fim da análise.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHINEJAD, Behnaz et al. Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by co-vermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114584, 2020.

ALEXANDRINO, Guilherme L. et al. Investigating weathering in light diesel oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography–High resolution mass spectrometry and pixel-based analysis: Possibilities and limitations. **Journal of Chromatography A**, v. 1591, p. 155-161, 2019.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso feito em: 15 de jan. 2020.

AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. **Rio de Janeiro: Interciência**, p. 64-8, 2003.

ARRUDA, Flávia Virgínia Ferreira de. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco. 2011.

BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANÇAS, Fernando Mauro. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BARROS, Claudia Affonso et al. Monitoramento da atenuação natural de solos artificialmente contaminados com óleo diesel B0 e B4. 2010.

BENTO, Douglas Mayer. Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos–Rio Grande/RS. **Dissertação de Mestrado**. 2005.

BOULANGÉ, Marine et al. Fenton-like and potassium permanganate oxidations of PAH-contaminated soils: Impact of oxidant doses on PAH and polar PAC (polycyclic aromatic compound) behavior. **Chemosphere**, v. 224, p. 437-444, 2019.

BRASIL, Resolução nº420, de 27 de Dezembro de 2009. CONAMA. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso feito em: 11 de out.2020.

CALDAS, Sergiane Souza et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011

CARDOSO, Willian Acordi et al. Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas. **Revista de Iniciação Científica**, v. 12, n. 1, 2014.

CAVALCANTI, Jorge Vinicius Fernandes Lima et al. In-depth investigation of Sodium percarbonate as oxidant of PAHs from soil contaminated with diesel oil. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115832, 2021.

CELINO, Joil José; QUEIROZ, Antônio Fernando de S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. Rem: **Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 3, p. 265-270, 2006.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo - 2007. São Paulo: CETESB, 2007.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de cromatografia. In: Fundamentos de cromatografia. 2006. p. 453-453.

COSTA, Kíssyla Ávila et al. Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator soxhlet visando emprego em pavimentos. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 2, 2017.

COTTA, Jussara Aparecida Oliveira; REZENDE, Maria Olímpia Oliveira; LANDGRAF, Maria Diva. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2026-2033, 2009.

CRISTALE, Joyce; SILVA, Flavio Soares; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 69-78, 2008.

CZARNY, J. et al. Acinetobacter sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. **Journal of hazardous materials**, v. 383, p. 121168, 2020.

DA SILVA, Thiago Emanuel Pereira et al. ENXOFRE: UM POLUENTE EM POTENCIAL NA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DIESEL BRASILEIRO. 2013.

DEON, Maitê Carla et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DE OLIVEIRA, Lizandra Carla Pereira et al. Estudo da extração e avaliação do rendimento de óleo de baru. Outubro, v. 1, n. 1, 2011.

DE OLIVEIRA, Amilton Moreira et al. Sample preparation for solid petroleum-based matrices based on direct matrix introduction oriented to hydrocarbon profiling. **Energy & Fuels**, v. 34, n. 9, p. 10705-10712, 2020

DIONÍSIO, Amália GG et al. Novas tendências em preparo de amostras para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.

DÓREA, Haroldo Silveira; GAUJAC, Alain; NAVICKIENE, Sandro. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia plena**, v. 4, n. 7, 2008.

DUARTE, Diego G.; ARÁUJO, Eduardo C.; FALLA, Maria Del Pilar Hidalgo. Destilação do Óleo Diesel e Quantificação dos Seus Componentes por Cromatografia Gasosa. **III ENCONTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**, p. 85.

IBAMA- ICMBIO. Manifestação técnica sobre os impactos ambientais potenciais decorrentes da implantação do Comperj nas unidades de conservação federais da região. **Mimeo**, Rio de Janeiro, 2019.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KAZEMZADEH, Somayeh et al. Gas chromatography-mass spectrometry analyses of crude oil bioremediation by the novel *Klebsiella variicola* SKV2 immobilized in polyurethane polymer scaffold and two-layer microcapsulation. **Bioremediation Journal**, v. 24, n. 2-3, p. 129-149, 2020.

KACZOREK, Ewa et al. Best conditions for biodegradation of diesel oil by chemometric tools. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 117-126, 2014.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LJEŠEVIĆ, Marija et al. Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp. followed by comprehensive GC×GC-TOF MS. **Journal of hazardous materials**, v. 363, p. 227-232, 2019.

LOURENÇO, Rafael André. Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos-Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróis e alquenonas. 2003. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

LUNA, Saionara et al. Remediação de solo contaminado com petróleo utilizando extrato vegetal de uma espécie da família das araceae. 2015.

LUZ, Cleber C. et al. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho-Ro, Amazônia. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 775-779, 2011.

MACHADO, Thaís Strieder et al. Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110798, 2020.

MARIANO, Adriano Pinto. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006.

MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JÚNIOR, Miguel. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000

MCNAIR, Harold M.; MILLER, James M.; SNOW, Nicholas H. Basic gas chromatography. 3ª edição. **John Wiley & Sons**, 2019.

MEIRE, Rodrigo Ornellas; AZEREDO, Antonio; TORRES, João Paulo Machado. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MENEGHETTI, Liliane Rebechi Ribeiro et al. Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. 2007.

MNIF, Inès et al. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14852-14861, 2015.

MONTICELI, Francisco Maciel; DE ANDRADE RODRIGUES, Denise Celeste Godoy; CORRÊA, Sergio Machado. Desenvolvimento de biorreatores de bancada para

Biorremediação de solo contaminado com diesel B5. **Acta Scientiae et Technicae**, v. 6, n. 1, p. 3-12, 2018.

MORAES, Maria Silvana Aranda et al. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente aplicada à análise qualitativa dos componentes majoritários do bio-óleo da pirólise de bagaço de laranja. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 301-4, 2011.

MORAIS FILHO, M. C.; CORIOLANO, Ana Catarina Fernandes. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **HOLOS**, v. 7, p. 133-150, 2016.

OKONKWO, C. J. et al. Experimental thawing events enhance petroleum hydrocarbons attenuation and enzymatic activities in polluted temperate soils. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-12, 2021.

OLIVEIRA, Eder Silva. Associação de hidrocarbonetos alifáticos e metais pesados na zona portuária de Vila do Conde, Barcarena-Pará: concentração, composição e riscos associados ao ecossistema aquático. 2012.

OSINOWO, Ibrahim et al. Bioremediation of Diesel Contaminated Soil Using Bacterial Cocktail and Organic Nutrients. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2020, p. 150-158, 2020.

PRUS, Wojciech; FABIAŃSKA, Monika J.; ŁABNO, Radosław. Geochemical markers of soil anthropogenic contaminants in polar scientific stations nearby (Antarctica, King George Island). **Science of the Total Environment**, v. 518, p. 266-279, 2015.

Puntus, I.F., Borzova, O.V., Funtikova, T.V. et al. Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation. **J Soils Sediments** 19, 3166–3177 (2019).

RAJU, Maddela Naga et al. Biodegradation of Diesel, Crude Oil and Spent Lubricating Oil by Soil Isolates of Bacillus spp. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 98, n. 5, p. 698-705, 2017.

ROCHA, Sílvia M. et al. Microextração em fase sólida e cromatografia de gás: Uma combinação de elevado potencial. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 284-300, 2013.

SAFITRI, Rina Marita; MANGUNWARDYO, Wibowo; AMBARSARI, Hanies. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons using Bacillus subtilis InaCC B289 and Pseudomonas aeruginosa InaCC B290 in single and mixed cultures. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2018. p. 030013.

SANTANA, JOSIANE. UTILIZAÇÃO DE TNT COMO ENVOLTÓRIO SUBSTITUTO NA EXTRAÇÃO POR SOXHLET. **Tese de Mestrado**. 2017.

SARAIVA, Livia Antônia de Mello et al. Biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) por rizobactéria em solo de várzea da Amazônia contaminado com óleo diesel. 2018.

SILVA, Luana Monteiro et al. Biodegradação de hidrocarbonetos por rizobactérias em solo de várzea da Região Amazônica contaminado com petróleo e óleo diesel. 2018.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição. **Thompson. Mexico DF**, 2005.

STRELAU, João Renato de Mendonça et al. Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de compostos orgânicos em lixiviados de aterros sanitários por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). 2006.

SUN, Wuyang et al. Isolation, identification, and characterization of diesel-oil-degrading bacterial strains indigenous to Changqing oil field, China. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 7, p. 723-734, 2019.

USEPA, USEPA. Method 3500C–Organic Extraction and Sample Preparation. 2007.

USEPA, USEPA. Method 3540C–Soxhlet Extraction. 1996.

USEPA, USEPA. Method 3550C–Ultrasonic Extraction. 2007.

USEPA, USEPA. Method 8270D–SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS). 1998.