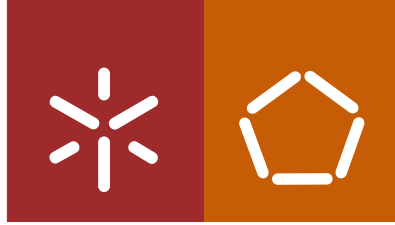




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vitor Joaquim Moreira Bertoluci

**Biorremediação de Solos Contaminados
com PAH (Hidrocarbonetos Aromáticos
Policíclicos - Pireno e Fenantreno)**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vitor Joaquim Moreira Bertoluci

**Biorremediação de Solos Contaminados
com PAH (Hidrocarbonetos Aromáticos
Policíclicos - Pireno e Fenantreno)**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Gestão Ambiental

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Teresa Tavares

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



**Atribuição
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento e conclusão deste trabalho seria impossível sem as várias pessoas que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional e, por esse motivo, não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, a Professora Teresa Tavares pelo apoio e paciência despendida.

A todos os que partilharam o Laboratório de Engenharia Química do Centro de Engenharia Biológica comigo durante este processo. À Bruna, à Elisa, à Filomena, à Idalina, à Lara, ao Miguel, ao Óscar, à Verónica e à Ziva.

A toda a minha família pelo apoio em toda a linha.

Aos meus amigos pela disponibilidade e resiliência.

À Aline, à Maura, ao Sr. Santos, à Vitória e a todos os colegas do Centro de Engenharia Biológica que de várias maneiras contribuíram para aligeirar este trabalho.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos e eterna gratidão

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

Biorremediação de Solos Contaminados com PAH (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos - Pireno e Fenantreno)

O solo é um recurso vital para as mais variadas formas de vida que coabitam a Terra. Os objetivos 2030 da ONU incluem o solo como um dos recursos que mais atenção deve receber devido à sua importância. Um dos principais grupos de poluentes que contaminam o solo um pouco por todo o globo são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), classificados como carcinogénicos e/ou mutagénicos, resultam da queima incompleta de compostos orgânicos. Setores da economia como o tratamento de combustíveis fósseis ou sistemas de climatização são os que mais contribuem para a sua emissão. A sua emissão tem aumentado na última década, alguns países europeus (incluindo Portugal), aumentaram a sua emissão em resultado do aumento do número de centrais elétricas que utilizam biomassa.

A bioestimulação e a bioaumentação estão entre as técnicas de biorremediação mais estudadas na tentativa de se encontrar uma solução eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados com PAH.

Os principais objetivos deste trabalho passaram por comprovar a existência de microrganismos degradadores de pireno e fenantreno na amostra de solo estudada, avaliar a taxa de degradação de cada um destes poluentes, ao longo do tempo e para diferentes concentrações iniciais, em ensaios de bioestimulação e bioaumentação e determinar dos coeficientes de degradação, no sentido de os aplicar a modelos matemáticos de forma gerar modelos de previsão da diminuição das quantidades destes poluentes no solo.

Para os ensaios realizados (Bioestimulação, Bioaumentação A e Bioaumentação B) foi possível comprovar a existência de microrganismos capazes de degradar os poluentes estudados. Definiram-se equações, uma para cada ensaio e cada um dos poluentes, que, partindo da concentração inicial devolvem a quantidade prevista ao final de 21 dias (nas condições estudadas e em solos de matriz idêntica ao da amostra) e por fim foram determinados os coeficientes de degradação para cada um dos diferentes ensaios que quando aplicados ao modelo matemático, devolve a previsão de variação da concentração de cada poluente para as condições de cada dos ensaios, ao longo do tempo.

Palavras-Chave: Bioaumentação, Biodegradação, Bioestimulação, PAH, Solo

ABSTRACT

Bioremediation of PAH Contaminated Soils (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - Pyrene and Phenanthrene)

Soil is a vital resource for the most varied forms of life that cohabit the Earth. The UN 2030 goals include soil as one of the resources that should receive the most attention due to its importance. One of the main groups of pollutants that contaminate the soil all over the globe are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), classified as carcinogenic and / or mutagenic, resulting from the incomplete burning of organic compounds. Economy sectors such as the treatment of fossil fuels or climatization systems are the ones that most contribute to its emission. Its emission has increased in the last decade, some European countries (including Portugal), increased their emission as a result of the increase in the number of power plants that use biomass.

Biostimulation and bioaugmentation are among the most studied bioremediation techniques in an attempt to find an effective and low-cost solution for the remediation of PAH-contaminated soils.

The main objectives of this work are proven by the exposure to pyrene and phenanthrene degrading microorganisms and studied soil samples, to evaluate the degradation rates of each one of these pollutants, over time and for different previous tests, in biostimulation and bioaugmentation tests and determine the degradation coefficients, in the sense of applying them to mathematical models in order to generate predictive models for decreasing the quantities of these pollutants in the soil.

For the tests carried out (Biostimulation, Bioaugmentation A and Bioaugmentation B), it was possible to prove the presence of microorganisms capable to degrade the pollutants studied. Defined as equations, one for each test and for each one of the pollutants, which are part of the initial concentration returned and the amount estimated by the end of 21 days (under the conditions studied and in identical soil matrix to the sample) and finally the coefficients were used of degradation for each of the different tests that, when applied to the mathematical model, returns a forecast of variation in the concentration of each pollutant for the conditions of each test, over time.

KEYWORDS: Soil, Biodegradation, PAH, Biostimulation, Bioaugmentation

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Introdução.....	1
1.1. Solo.....	2
1.2. Qualidade do Solo.....	4
1.3. Contaminação e Poluição do Solo.....	5
1.3.1. Contaminantes de Origem Natural.....	6
1.3.2. Contaminantes de Origem Antropogénica.....	7
1.4. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	11
1.4.1. Tipos de PAH.....	12
1.4.2. Fontes de Emissão.....	13
1.4.3. Destino dos PAH no solo.....	15
1.4.3.1. Transporte no Solo.....	17
1.4.4. Adaptações microbianas.....	18
1.5. Remediação Biológica / Biorremediação.....	19
1.6. Cromatografia Líquida de Ultra Pressão - UPLC.....	21
Materiais e Métodos.....	23
2.1. Materiais e Métodos.....	24
2.1.1 Recolha da Amostra de Solo.....	24
2.1.2 Caracterização Físico-química da Amostra de Solo.....	24
2.1.3 Caracterização Microbiológica da Amostra de Solo.....	24
2.1.4 Seleção de Bactérias Degradadoras de PAH.....	25
2.1.5 Crescimento em Meio Líquido R2A.....	25
2.1.6 Contaminação da Amostra de Solo.....	26
2.1.7 Ensaios de Degradação (21 dias).....	26
2.1.7.1 Bioestimulação.....	26

2.1.7.2.	Bioaugmentação A	27
2.1.7.3.	Bioaugmentação B	27
2.1.8	Extração de PAH da Amostra de Solo por agitação	27
2.1.9	Substituição de solvente	28
2.1.10	Cromatografia Líquida de Ultra Pressão - UPLC	28
2.1.10.1.	Preparação das Amostras	28
2.1.10.2.	Análise UPLC	29
2.1.11	Modelo de Derivação Matemática segundo Olatunji e Horsfall, 2014	30
	Resultados e Discussão	31
3.1.	Caraterização Físico-química da Amostra de Solo	32
3.2.	Caraterização Microbiológica da Amostra de Solo	33
3.3.	Quantificação do Número de UFC após Crescimento em R2A Líquido	34
3.4.	Composição dos Consórcios Microbiológicos Utilizados.....	34
3.5.	Biodegradação.....	35
3.5.1	Bioestimulação.....	36
3.5.2	Bioaugmentação A.....	37
3.5.3	Bioaugmentação B.....	39
3.6.	Validação de Hipóteses	40
3.7.	Determinação das Taxas de Remoção	42
3.8.	Constantes de Degradação média	46
3.9.	Impacto das Alterações de Carga Microbiana Na Taxa de Degradação	51
4.	Conclusões e Perspetivas Futuras	53
	Referências Bibliográficas	54
	ANEXOS	63
	ANEXO I	64
	ANEXO II	67
	ANEXO III	70
	ANEXO IV	73
	ANEXO V	102
	ANEXO VI	106
	ANEXO VII	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.01 – Esquema da molécula de fenantreno composta por 3 anéis de benzeno interligadas	12
Figura 1.02 – Esquema da molécula de pireno composta por 4 anéis de benzeno interligadas	12
Figura 1.03 – Distribuição da emissão de PAH segundo a sua origem (Adaptadp: EEA,2018) - Dados do Liechtenstein, Malta e Turquia não foram considerados)	13
Figura 1.04 – Destino dos PAH no solo ao longo do tempo (Adaptado de S. Kuppusamy <i>et al.</i> , 2017)	15
Figura 1.05 – Ilustração de cromatograma de cromatografia líquida	22

Capítulo 2

Não Aplicável

Capítulo 3

Figura 3.01 – Carga microbiana utilizadas nos ensaios realizados. microbioma nativo (☼), consórcio microbiológico R2A Fenantreno (≡) e consórcio microbiológico R2A Pireno (≡), expresso em UFC. g ⁻¹ de solo.	35
Figura 3.02 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido estéril.	36
Figura 3.03 – Taxa de remoção média de fenantreno (◊) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido estéril.	37
Figura 3.04 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas, com exceção do valor para concentração inicial de pireno de 200 μg. g ⁻¹ de solo na qual a amostra C3.13/A foi rejeitada) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana total de 1,45*10 ⁷ ($\frac{x}{\pm}$ 10) UFC.g ⁻¹ de solo	38
Figura 3.05 – Taxa de remoção média de fenantreno (◊) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de R2A líquido. Carga microbiana total de 1,45*10 ⁷ ($\frac{x}{\pm}$ 10) UFC.g ⁻¹ de solo	38
Figura 3.06 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana de 5,5*10 ⁶ ($\frac{x}{\pm}$ 10) UFC.g ⁻¹ de solo.	39
Figura 3.07 – Taxa de remoção média de fenantreno (◊) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana de 5,5*10 ⁶ ($\frac{x}{\pm}$ 10) UFC.g ⁻¹ de solo.	40
Figura 3.08 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioestimulação e desvio padrão (-)	42

após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Pireno}} = 0,139 \cdot \ln ([\text{PYR}]_{\text{inicial}}) + 1,0189$ $R^2=0,9246$ (.....).

Figura 3.09 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioaugmentação A e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Pireno}} = 0,100 \cdot \ln ([\text{PYR}]_{\text{inicial}}) + 0,7784$, $R^2=0,8316$ (-----).

Figura 3.10 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioaugmentação B e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Pireno}} = 0,129 \cdot \ln ([\text{PYR}]_{\text{inicial}}) + 0,9419$, $R^2=0,9698$ (- · - ·).

Figura 3.11 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) no ensaio de bioestimulação e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,068 \cdot \ln ([\text{PHE}]_{\text{inicial}}) + 1,2355$ $R^2=0,8349$ (.....).

Figura 3.12 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) no ensaio de bioaugmentação A e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,079 \cdot \ln ([\text{PHE}]_{\text{inicial}}) + 1,2286$, $R^2=0,8610$ (-----).

Figura 3.13 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) no ensaio de bioaugmentação B e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,099 \cdot \ln ([\text{PHE}]_{\text{inicial}}) + 1,2326$, $R^2=0,9807$ (- · - ·).

Figura 3.14 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioestimulação ao final de 21 dias, com a função $[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,0198 \pm 0,0105) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.15 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioaugmentação A aos 21 dias, com a função $[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,0146 \pm 0,0092) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.16 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioaugmentação B aos 21 dias, com a função $[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,0173 \pm 0,0079) t}$ (.....), para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.17 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioestimulação ao final de 21 dias, com a função $[\text{PHE}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,1152 \pm 0,0285) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.18 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioaugmentação A aos 21 dias, com a função $[\text{PHE}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,0939 \pm 0,0303) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.19 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioaugmentação B aos 21 dias, com a função $[\text{PHE}]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{(0,0669 \pm 0,0184) t}$ (.....), para valores t [18 - 24] dias.

Figura 3.20 – Retas de Correlação de Pearson para os pares ($TR_{\text{Fenantreno}}$; TR_{Pireno}), ao final de 21 dias das experiências: bioestimulação (.....); bioaugmentação A (-----) e bioaugmentação B (- · - ·).

Anexos

Figura A.01: Reta de calibração obtida a partir de concentrações conhecidas de criseno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0017x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999.

V

Figura A.02: Reta de calibração obtida a partir de concentrações conhecidas de pireno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0074x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998.

V

Figura A.03: Reta de calibração obtida a partir de concentrações conhecidas de fenantreno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0011x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9993.

V

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.01 – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos considerados, pelas suas características, individualmente como poluentes EPA Priority Chemical List (EPA, 2019) **11**

Tabela 1.02 – Lista (inacabada) de espécies de bactérias deragadoras de PAH (Adaptado: Jong-Su Seo *et al.*, 2009) **20**

Capítulo 2

Tabela 2.01 – Parâmetros analisados e Norma/ Protocolo utilizado **24**

Tabela 2.02 – Variação da constituição da fase móvel ao longo do tempo de ensaio **29**

Capítulo 3

Tabela 3.01 – Resultados análise química da amostra de solos **32**

Tabela 3.02 – Resultados análise granulométrica da amostra de solos **33**

Tabela 3.03 – Teste de Mann-Whitney com a regção de aceitação da hipótese nula (H_0) a ser obtida através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=8$ e $n_r=8$ para os pares em testes dos ensaios ao fenantreno. Para os ensaios de pireno para os pares Bioestimulação/Bioaumentação A e Bioaumentação A/Bioaumentação B foram obtidos através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=7$ e $n_r=8$ e o par Bioestimulação/Bioaumentação B através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=8$ e $n_r=8$. **41**

Tabela 3.04 – Equações de ajuste obtidas por regressão linear da variação da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial de pireno para cada uma das diferentes cargas microbianas consideradas **42**

Tabela 3.05 – Equações da função de ajuste obtidas por regressão linear da variação da taxa de remoção com a variação da concentração inicial de fenantreno, para cada uma das diferentes cargas microbianas consideradas **43**

Tabela 3.06 – Constantes de degradação de pireno, definidas por linha de experiência. **46**

Tabela 3.07 – Constantes de degradação de fenantreno, definidas por linha de experiência. **48**

Tabela 3.08 – Análise de correlação dos pares ($TR_{\text{Fenantreno}}$ e TR_{Pireno}) **51**

Anexos

Tabela A.01: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioestimulação	I
Tabela A.02: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioaumentação A	I
Tabela A.03: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioaumentação B	I
Tabela A.04: Resultados da extração dos poluentes e cálculo da concentração teórica de poluentes na solução de n-hexano	II
Tabela A.05: Correspondência dos códigos das amostras com o código utilizado na análise UPLC	IV
Tabela A.06: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de criseno	V
Tabela A.07: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de pireno	V
Tabela A.08: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de fenantreno	V
Tabela A.09: Resultados da extração com n-hexano e cálculo da taxa de recuperação utilizando como testemunho solução de criseno.	VI
Tabela A.10: Resultados UPLC para cada uma das amostras (APC – Área do Pico do Cromatograma)	VII
Tabela A.11: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioestimulação	VII
Tabela A.12: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioaumentação A	VII
Tabela A.13: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioaumentação B	VII

LISTA DE ABREVIATURAS

A

APC _{CRY}	Área do pico do cromatograma para o criseno
APC _{PHE}	Área do pico do cromatograma para o fenantreno
APC _{PYR}	Área do pico do cromatograma para o pireno
Au	Ouro

B

BE	Bioestimulação
BAA	Bioaugmentação A
BAB	Bioaugmentação B

C

CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CEB	Centro de Engenharia Biológica
CRY	Massa de criseno (μg)

E

EEA	Agência Ambiental Europeia
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais

F

FAO	Organização da Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
-----	---

I

ISO	International Standard Organization
-----	-------------------------------------

M

MML	Meio Mineral Líquido
-----	----------------------

O

ONU	Organização das Nações Unidas
-----	-------------------------------

P

PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PHE _i	Massa de fenantreno (μg)
PYR _i	Massa de pireno (μg)

R

R	Coefficiente de Correlação de <i>Pearson</i>
R ²	Coefficiente de determinação

R2A Agar	Meio de cultura sólido
R2A Líquido	Meio de cultura líquido
r_{BIOX_F}	Estatística de Mann-Withney para ensaio de fenantreno
r_{BIOX_P}	Estatística de Mann-Withney para ensaio de pireno
T	
t	Tempo
TR_{CRY}	Taxa de Recuperação de criseno (%)
$\text{TR}_{\text{Fenantreno}}$	Taxa de Remoção de fenantreno
$\text{TR}_{\text{Pireno}}$	Taxa de Remoção de pireno
U	
UFC.g ⁻¹ de solo	Unidades Formadoras de Colónias por grama de solo
UPLC	<i>Ultra Pressure Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Ultrapressão
V	
$V_{\text{n-hexano}}$	Volume de n-hexano (ml)
V_{sm}	Volume da solução mãe (ml)
Outros	
$[\text{CRY}]_m$	Concentração medida de criseno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{CRY}]_{\text{sm}}$	Concentração solução mãe de criseno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{CRY}]_t$	Concentração teórica de criseno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PHE}]_{\text{inicial}}$	Concentração de fenantreno inicial ($\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ de solo)
$[\text{PHE}]_c$	Concentração corrigida de fenantreno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PHE}]_{\text{final}}$	Concentração de fenantreno final (% da concentração inicial)
$[\text{PHE}]_m$	Concentração medida de fenantreno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PHE}]_t$	Concentração teórica de fenantreno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PYR}]_{\text{inicial}}$	Concentração de pireno inicial ($\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ de solo)
$[\text{PYR}]_c$	Concentração corrigida de pireno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PYR}]_{\text{final}}$	Concentração de pireno final (% da concentração inicial)
$[\text{PYR}]_m$	Concentração medida de pireno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
$[\text{PYR}]_t$	Concentração teórica de pireno ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
e	Número de <i>Euler</i> ou <i>Napier</i>
λ	Comprimentos de onda

À minha mãe

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. SOLO

São múltiplas as definições de solo que embora diversas, são coincidentes no que concerne à sua localização (à superfície da Terra), à sua constituição (muito heterogênea) e ao seu papel vital para os ecossistemas e biosfera (plantas e outros organismos vivos). A Comissão Europeia na sua *Estratégia temática de proteção do solo* define que “O solo é geralmente definido como a camada superior da crosta terrestre, formada por partículas minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos. O solo constitui a interface entre a terra, o ar e a água e aloja a maior parte da biosfera” (Comissão Europeia, 2006).

O solo é um recurso dinâmico constituído por componentes bióticos e abióticos. A sua componente abiótica inclui minerais de granulometria variada (das areias às argilas), água, gases e matéria orgânica. A parte biológica é constituída por todos os organismos vivos incluindo plantas, animais e microrganismos (fungos e bactérias). As propriedades físicas, químicas e biológicas permitem que o solo responda, geralmente, de forma dinâmica a quaisquer alterações ambientais que possam ocorrer. As relações complexas que se estabelecem no solo entre a sua componente biótica e abiótica têm um papel de vital importância na formação do solo, degradação da matéria orgânica, ciclo de nutrientes e degradação de alguns contaminantes. Desta forma, o solo assume várias funções vitais como a produção de biomassa e alimento, habitat para vários organismos, filtração e regulação do ciclo da água, degradação da matéria orgânica, ciclo dos nutrientes, armazenamento de carbono e suporte para a vida humana (Cachada *et al.*, 2018).

Cerca de metade da superfície terrestre está a ser usada diretamente pela humanidade e as nossas atividades estão a alterar de forma significativa a ecologia da Terra. Em algumas zonas do planeta a fertilidade do solo tem vindo a degradar-se, em paralelo com o número de pessoas a alimentar que continua a crescer. Restabelecer o equilíbrio ambiental do planeta é o desafio para a humanidade nas próximas gerações. O solo desempenha um papel central nos desafios ambientais de hoje: desde a poluição das águas às alterações climáticas, da perda de biodiversidade à produção de alimento para a população, o ecossistema global é afetado de muitas e variadas formas por processos que ocorrem no solo. A urbanização da paisagem tende a afastar as pessoas do contacto direto com o solo, o que leva a uma perda de consciência da dependência que temos deste recurso. A nossa dependência do solo, no futuro, tenderá a aumentar e não a diminuir. Infelizmente, a quantidade de solo disponível tende a diminuir devido à pressão urbanística e degradação do mesmo. Conceber um modo eficiente de gestão

deste recurso vital é essencial para a nossa sobrevivência bem como para a de todas as outras espécies com quem partilhamos o planeta (Brady and Weil, 2019).

A comunidade internacional, em sede da Organização das Nações Unidas, está sensibilizada para a importância do papel do solo como um recurso vital. A prova desta importância está vertida na definição e objetivos para um Desenvolvimento Sustentável na Agenda “Transformar o Nosso Mundo: Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável” (ONU, 2015). O solo é referido em quatro objetivos diferentes ligados à erradicação da fome, qualidade da saúde, produção e consumos sustentáveis e proteção da vida terrestre. As medidas para atingir estes objetivos até 2020 passam pela gestão ambientalmente saudável dos produtos químicos e de todos os resíduos, ao longo do seu ciclo de vida e de acordo com os marcos internacionais acordados, e pela significativa redução da libertação destes para o ar, água e solo, a fim de minimizar os seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente. Com um horizonte temporal mais alargado, até 2030, pretende-se garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos com práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às alterações climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo. Também se pretende reduzir substancialmente o número de mortes e doenças devido a químicos perigosos, contaminação e poluição do ar, água e solo, restaurar a terra e o solo degradados, incluindo terrenos afetados pela desertificação, secas e inundações, e lutar para alcançar a neutralidade em termos de degradação do solo (ONU, 2015).

As bases para uma gestão sustentável do solo estão lançadas. A comunidade internacional reconhece que é um recurso fundamental e de lenta regeneração e a sua conservação ao nível local, regional e internacional é fulcral. Os próximos dez anos são fundamentais para perceber qual o rumo que políticas darão à conservação e gestão sustentáveis deste recurso vital.

1.2. QUALIDADE DO SOLO

As funções do solo dependem de um sem número de propriedades físicas, químicas e biológicas que quando combinadas determinam a qualidade de um determinado solo. Essa qualidade garante que o solo possa realizar plenamente as suas funções ecológicas e de serviços. A diversidade de solo é enorme, quer em termos de propriedades, quer em termos das suas qualidades, limitações e potenciais. Mesmo em pequenas distâncias e em intervalos relativamente curtos, as variações das características dos solos podem ser significativas, tornando a monitorização ambiental do solo muito complexa (Brammer and Nachtergaele, 2015).

A qualidade do solo determina a sua capacidade em desempenhar funções ecológicas. Essa qualidade reflete a combinação das suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Algumas dessas propriedades como a textura e o tipo de minerais que o constituem são relativamente imutáveis e ajudam a definir o tipo de solo. Já propriedades como a estrutura e o teor de matéria orgânica podem ser alteradas significativamente através de processos de gestão (Brady and Weil, 2019).

Enquanto a qualidade do solo é associada à aplicabilidade deste num determinado uso, existem alguns autores (Cachada *et al.*, 2019, Bone *et al.*, 2010) que usam o termo saúde do solo definido como “a capacidade de um determinado solo de funcionar como sistema vital, dentro das fronteiras de um ecossistema ou determinado uso, de sustentar a produção de plantas e animais, manter ou melhorar a qualidade do ar e da água e promover a saúde de plantas e animais” (Doran *et al.*, 2000).

Por estas razões a definição de qualidade do solo está ligada ao seu uso. A função requerida do solo em áreas naturais ou agrícolas é muito diferente da função solicitada para um solo de uso comercial ou industrial. A dificuldade de se estabelecer uma definição está relacionada com a variedade de uso, condições geográficas, tipos de solo e falta de entendimento de processos que aí ocorrem. É difícil definir a qualidade e ainda mais difícil quantificá-la. A qualidade de um solo é normalmente estabelecida através de processos de identificação, medição de indicadores físicos, químicos e biológicos. Contudo algumas questões são levantadas como, por exemplo, o número de indicadores que devemos considerar, o que faz com que a qualidade do solo seja parcialmente subjetiva, mas sempre relacionada com as funções que se esperam tendo em conta o seu uso (Cachada *et al.*, 2019).

1.3. CONTAMINAÇÃO E POLUIÇÃO DO SOLO

Existem as mais diversas definições para contaminação e poluição. Uma delas é referida por Anabela Cachada (Cachada *et al.*, 2019) como “a simples presença de uma substância ou elemento químico que, ou não deveria ali existir ou não existir em concentrações acima do previsto. Poluição é a contaminação da qual pode resultar efeito biológico adverso às comunidades existentes (Chapman, 2007)”. Desta definição concluímos que contaminante é uma substância ou elemento químico que é inócuo para o ecossistema, enquanto poluente é uma substância ou elemento químico que causam efeitos nefastos ao ecossistema (Cachada *et al.*, 2019). A catalogação de contaminantes como poluentes depende da sua concentração em determinado ecossistema e dos eventuais efeitos nefastos nos organismos presentes nesse mesmo ecossistema (Walker *et al.*, 2018).

A expressão “Poluição do solo” refere-se à presença de um elemento químico ou substância estranha ao local ou em concentrações anormalmente elevadas que têm um efeito adverso em um ou vários organismos (FAO & ITPS, 2015).

No que concerne à sua natureza a grande maioria dos poluentes é de origem antropogénica, mas alguns contaminantes podem ocorrer naturalmente no solo como componentes da fração mineral e podem ser tóxicos em concentrações elevadas. Geralmente a constatação de que um solo está poluído não é percebida visualmente, fazendo com que seja um perigo escondido (Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M.e Pennock, D., 2018).

A degradação do solo devido a contaminantes é uma questão importante a nível mundial, em especial em áreas humanizadas, e tem vindo a acentuar-se, aumentando progressivamente depois da Revolução Industrial devido essencialmente ao uso em larga escala de fertilizantes, expansão da produção industrial e ao uso de combustíveis fósseis (Cachada *et al.*, 2019). Também a diversidade de contaminantes tem vindo ao aumentar exponencialmente devido à constante evolução na produção de agroquímicos e ao desenvolvimento industrial com a produção de novas substâncias para as mais variadas finalidades. Esta diversidade e a transformação biológica destes compostos orgânicos em diversos metabolitos faz com que a quantificação e identificação destes contaminantes no solo sejam cada vez mais difíceis e mais dispendiosas. O efeito no solo desta contaminação depende de outros parâmetros como a mobilidade dos contaminantes, a sua biodisponibilidade e o seu tempo de residência (FAO & ITPS, 2015).

A Organização da Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) publicou em 2018 um documento intitulado “Poluição do solo, uma realidade escondida” da autoria de Natalia Rodríguez

Eugenio da FAO, Michael McLaughlin da University of Adelaide e de Daniel Pennock da University of Saskatchewan e membro do Painel Técnico Intergovernamental sobre os Solos. Esta publicação pretende servir de guia para a implementação de uma resolução da Assembleia Geral das Nações Unidas que solicita aos países que acelerem as ações relacionadas com a gestão da poluição dos solos. Nele estão contidas informações base cruciais para a identificação dos principais contaminantes bem como para a gestão e remediação de locais contaminados. Os pontos seguintes (Contaminantes de Origem Natural e Contaminantes de Origem Antropogénica) são a compilação desse documento.

1.3.1. CONTAMINANTES DE ORIGEM NATURAL

Uma vez que a poluição de um solo depende da concentração de um determinado contaminante, é crucial separar o conceito de valor base do conceito de valor de fundo, em especial quando definimos a extensão da contaminação em áreas onde a legislação ambiental ainda não estabeleceu valores limite para todos os parâmetros (Albanese *et al.* 2007).

Valores de fundo indicam teor natural de origem geológica, enquanto valores base indicam o teor atual de um elemento no ambiente superficial num determinado ponto (Reimann, Filzmoser and Garrett, 2005; Salminen and Gregorauskiene, 2000).

As concentrações de fundo nos solos de uma determinada região estão fortemente ligadas com a rocha-mãe e com as dinâmicas ambientais que levaram à sua formação. O uso de médias ou intervalos de valores não é adequado para determinar valores de fundo a nível local ou regional (Horckmans *et al.*, 2005; Paye, Mello and Melo, 2012). Por exemplo solos com origem na mesma rocha-mãe, podem apresentar variações de concentração de metais pesados de diferença de duas ou três ordens de grandeza (Shacklette and Boerngen, 1984).

Eventos naturais como erupções vulcânicas ou fogos florestais podem provocar poluição natural quando elementos ou substâncias tóxicas são libertados para o ambiente. Exemplo destas libertações são as dioxinas (Deardorff, Karch and Holm, 2008) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH).

Por norma, esta poluição natural não causa problemas ambientais devido à capacidade regenerativa e de adaptação das plantas (Kim, Choi e Chang, 2011). O problema surge quando os ecossistemas são alvo de pressões externas, que alteram a sua resiliência e capacidade de resposta.

Os PAH podem também ocorrer naturalmente no solo, normalmente com origem cósmica, sendo relativamente comum a presença de pó cósmico ou meteoritos (Basile, Middleditch e Oró, 1984; Li, 2009) ou derivam de alterações por rearranjo molecular de ceras processadas existentes na matéria

orgânica no solo (Trendel *et al.*, 1989). A produção biológica de PAH é favorecida em ambiente redutor (Thiele e Brümmer, 2002).

1.3.2. CONTAMINANTES DE ORIGEM ANTROPOGÉNICA

Séculos de atividade humana resultaram no aparecimento de problemas de poluição do solo um pouco por todo o planeta (Bundschuh *et al.*, 2012; DEA, 2010; EEA, 2014; FAO & ITPS, 2015; Luo *et al.*, 2009; SSR, 2010).

As principais fontes antropogénicas de poluição dos solos são químicas: produtos usados ou produzidos em atividades industriais, domésticas e resíduos urbanos, incluindo águas residuais, agroquímicos e produtos derivados de petróleo. Estes químicos podem ser libertados no ambiente acidentalmente, por exemplo, em derrames de crude e lixiviação de aterros sanitários, ou intencionalmente, que é o caso do uso de fertilizantes e pesticidas, a irrigação com águas residuais não tratadas ou aplicação de lamas de estações de tratamento de águas residuais no solo.

- **Atividade Industrial**

A gama de produtos químicos usados na atividade industrial é vasta, tal como o seu impacto no ambiente. As atividades industriais libertam poluentes para atmosfera, solo e corpos de água. Os poluentes gasosos libertados para a atmosfera podem entrar no solo diretamente, através de chuvas ácidas ou por deposição atmosférica. Antigas zonas industriais podem ainda ter sido poluídas por via do incorreto armazenamento de substâncias ou descarga direta de resíduos no solo. Muitos poluentes de origem antropogénica podem ser dispersos a partir de poeiras de zonas de armazenamento não protegidas de matérias-primas para processamento ou de pilhas de material, de resíduos, de cinzas e fogos (Alloway, 2013).

De acordo com a Diretiva Europeia relativa à Prevenção e Controlo Integrados da Poluição (PCIP) (EC, 1996), as atividades potencialmente poluidoras podem ser agrupadas em seis categorias principais: 1) indústrias energéticas; 2) produção e processamento de metais; 3) mineração; 4) indústria química; 5) gestão de resíduos e 6) outras atividades (incluindo a produção de papel e cartão, indústria têxtil, curtumes, matadouros, criação intensiva de animais, instalações que usam solventes orgânicos e também a produção de carvão e grafite) (García-Pérez *et al.*, 2007).

- **Extração de Minério**

A extração de minério teve, desde sempre, um grande impacto no solo, água e bioma (FAO & ITPS, 2015). Podem ser encontrados, em todo o mundo, muitos exemplos documentados de solos altamente contaminados associados à atividade mineira (Alloway, 2013). O processo térmico de separação dos metais tem introduzido muitos poluentes no solo. As instalações de extração e fusão libertam enormes quantidades de metais pesados e outros elementos tóxicos (incluindo PAH) para o ambiente onde persistem por longos períodos, mesmo após o final das atividades (Ogundele *et al.*, 2017).

Zonas de extração de gás e petróleo são também pontos de contaminação do solo devido a derrames de solução salina e de crude. A solução salina, para além dos elevados teores de sal, pode também conter vestígios de elementos naturais radioativos. Derrames de crude em campos de poços e de oleodutos são outra das fontes de poluição em áreas de produção e transporte de petróleo.

- **Urbanização e Infraestruturas de Transportes**

O desenvolvimento generalizado de infraestruturas como habitações, estradas e vias férreas tem contribuído consideravelmente para a degradação do meio ambiente. Os efeitos negativos mais significativos são a impermeabilização do solo e alterações do seu uso (uso produtivo para não produtivo). Além destas ameaças ao uso do solo, outros grandes impactos que estas estruturas provocam é a entrada de diferentes poluentes nos ecossistemas. Embora seja uma das maiores ameaças, a poluição do solo pelas infraestruturas não tem sido considerada no que concerne à avaliação de impactos e à reflexão durante a fase de planeamento.

Atividades ligadas aos transportes, dentro e à volta de centros urbanos, constituem uma das principais fontes de poluição do solo, não só por causa das emissões dos motores de combustão interna que podem difundir mais de 100 metros por transporte atmosférico e dos derrames de combustíveis, mas também das atividades e alterações que resultam da instalação das vias de comunicação (construção, manutenção, uso, alterações do uso do solo, etc.) (Mirsal, 2008).

A dispersão de águas pluviais pelo tráfego e as escorrências, que podem ser significativos no caso de sistemas de drenagem sem a manutenção adequada, podem transportar poluentes como PAH, borracha e compostos derivados da degradação de matérias plásticas (Kumar and Kothiyal, 2016; Wawer *et al.*, 2015). A poluição do solo na vizinhança de estradas e autoestradas tem especial importância nos solos urbanos e nos solos das periferias de grandes aglomerados populacionais, podendo ser uma ameaça maior se aí existirem zonas de produção agrícola podendo entrar na cadeia alimentar caso sejam assimilados pelas plantas. Os principais processos de assimilação de poluentes

por plantas, observados na proximidade de estradas e autoestradas são a deposição folicular e a absorção radicular (Hashim *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015b). Como a existência de zonas de pastagem junto a vias de comunicação são muito comuns, a ingestão de plantas que crescem em solos contaminados acarretam o risco de transferência de poluentes que podem afetar a saúde humana e dos animais (Cruz *et al.*, 2014).

- **Resíduos Sólidos Urbanos e Águas Residuais**

Com o aumento da população mundial aumenta também a quantidade de resíduos gerados. Em especial nos países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, as elevadas taxas de crescimento populacionais e os consequentes aumentos da geração de resíduos e de águas residuais, combinados com a falta de serviços municipais que façam a gestão e tratamento dos mesmos, criam uma situação perigosa.

A deposição de resíduos sólidos urbanos em aterro e a incineração são as duas formas mais comuns de gestão. Em ambos os casos, muitos poluentes tais como metais pesados, PAH, medicamentos, produtos de higiene pessoal e seus derivados acabam por se acumular no solo e em lençóis de água (Swati *et al.*, 2014), seja diretamente a partir de lixiviados, ou através da deposição das cinzas emitidas pelas instalações de incineração (Mirsal, 2008). Bardena e co-autores (2011) descobriram uma mistura complexa de poluentes em lixiviados de aterros que alteram a qualidade das águas subterrâneas e acabam também por afetar a cadeia alimentar.

A intensificação do uso de equipamentos elétricos e eletrônicos e a rápida alteração das características técnicas dos mesmos, faz com haja cada vez maior produção de resíduos desta natureza, dado que quando estes equipamentos deixam de funcionar tornam-se obsoletos e eventualmente, resíduos. Estes resíduos contêm elementos valiosos como o cobre e ouro, mas também muitas outras substâncias perigosas o que torna impossível o seu tratamento como resíduo sólido urbano comum. Na Europa e na América do Norte a maioria dos resíduos elétricos e eletrônicos não são reciclados (Barba-Gutiérrez, Adenso- Díaz e Hopp, 2008; Sthiannopkao e Wong, 2013), enquanto que nos países em desenvolvimento ou nas economias emergentes estes resíduos tornaram-se fonte de rendimento.

Na indústria criada em volta da valorização deste tipo de resíduos apenas 25% do volume processado corresponde a centros de reciclagem formais, o restante é reciclado em centros informais usando técnicas primitivas como a queima de cabos para recolha de cobre. Estas técnicas libertam um manancial de substâncias perigosas (retardadores de fogo, dioxinas, PAH e metais pesados) sem

medidas de minimização dos efeitos adversos que estas têm para o ambiente e para o Homem (Perkins *et al.*, 2014).

Os plásticos são outra das principais fontes de poluição. Eles são largamente usados para a embalagem de comida, sacos de compras e utensílios de uso diário como escovas de dentes, canetas e muitos outros. A sua presença está espalhada por todo o globo, mesmo em áreas em que a presença humana é só temporária. Os plásticos são também, em geral, persistentes e vão-se acumulando nos oceanos e em aterros, mas também nos solos perto dos centros de produção e de consumo. Os polímeros usados são geralmente considerados bioquimicamente inertes e não representam uma ameaça para o ambiente. No entanto em materiais plásticos podem ser encontrados monómeros ou oligómeros residuais de reações de polimerização incompletas (Araújo *et al.*, 2002).

Os monómeros mais perigosos, classificados como carcinogénicos e/ou mutagénicos, são os pertencentes às famílias dos poliuretanos, poliacrilonitrilos, cloreto de polivinílico e resinas epóxi (Lithner, Larsson e Dave, 2011).

Todos os plásticos, de macro ou nano escala, estão em risco de ser lixiviados ou adsorverem substâncias perigosas como poluentes orgânicos persistentes e PAH (Björnsdotter, 2015).

A presença e efeitos dos plásticos em organismos e ecossistemas aquáticos estão bem documentados (Browne *et al.*, 2008; Thompson, 2004), mas o risco para a saúde humana e ecossistemas terrestres continua a necessitar de investigação (Lithner, Larsson and Dave, 2011; Rillig, 2012; Rocha-Santos and Duarte, 2015). São escassos os estudos sobre o destino dos plásticos no solo.

O uso de lamas de ETAR para correção de solos pode ser benéfico, uma vez que contém matéria orgânica e nutrientes para os solos. No entanto, se não forem corretamente tratadas antes da sua aplicação muitos poluentes podem acumular-se no solo e eventualmente entrar na cadeia alimentar. Na Europa, o uso de lamas de ETAR está regulado, mas isso não acontece em todo o lado. O uso de águas residuais tratadas para irrigação de culturas é uma solução comum para a escassez de água nas regiões áridas e semiáridas (Jefatura del Estado, 2001; Keraita e Drechsel, 2004; Uzen, 2016).

1.4. HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são um grupo de poluentes orgânicos, persistentes e semivoláteis. Os PAH representam um grupo vasto de moléculas com propriedades físico-químicas variadas compostas por dois ou mais anéis de benzeno fundidos com partilha de um par de átomos de carbono. Os PAH mais conhecidos são o antraceno, fluoranteno, naftaleno, pireno, fenantreno e benzopireno (Lerda, 2011).

Por norma os compostos definidos como PAH são encontrados em grupos de dois ou mais. São formados naturalmente fazendo parte de produtos como petróleo, carvão betuminoso e alcatrão de madeira, um produto comumente usado para preservar madeira. Outro dos métodos de formação dos PAH é o processo de queima incompleta de materiais orgânicos (combustíveis fósseis, carvão, madeira e resíduos) (US EPA, 2008).

O fato dos PAH terem uma solubilidade em água extremamente baixa e também as baixas taxas de transferência de massa na fase sólida, podem limitar a sua biodisponibilidade para microrganismos, dificultando assim a atenuação natural por processos microbianos. Os PAH acumulam-se nos solos por causa da sua persistência e hidrofobicidade e tendem a ficar retidos no solo por longos períodos. Por estas razões a maior parte dos PAH são considerados poluentes orgânicos persistentes (POP) e encontram-se presentes no ar, água, solo e sedimentos (Lin *et al.*, 2013).

Os PAH atraíram a atenção dos cientistas devido à sua elevada toxicidade, o fato de serem mutagénicos e carcinogénicos e a sua presença no ambiente ser muito abrangente (EFSA, 2008). Devido à vasta gama de PAH, cientistas e reguladores focaram-se em 6 compostos que foram identificados como carcinogénicos e/ou mutagénicos e são considerados individualmente na *EPA's Priority Chemical List* (US EPA, 2008).

Tabela 1.01 – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos considerados, pelas suas características, individualmente como poluentes EPA Priority Chemical List (EPA, 2019)

Composto	CAS	Composto	CAS
Acenafteno	83-32-9	Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2
Antraceno	120-12-7	Flureno	86-73-7
Pireno	129-00-0	Fenantreno	85-01-8

1.4.1. TIPOS DE PAH

Devido ao elevado número de compostos, mais de 100 (US EPA, 2008), os PAH foram agrupados em dois grupos de acordo com o seu peso molecular:

PAH de baixo peso molecular, moléculas caracterizadas por um peso molecular inferior a 200 g.mol^{-1} . Estruturalmente com dois ou três anéis de benzeno (Figura 1.01), por norma voláteis e que ocorrem maioritariamente na atmosfera (Srogi, 2007).

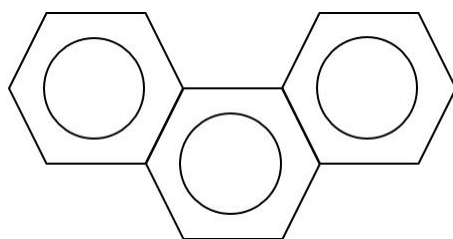


Figura 1.01 – Esquema da molécula de fenantreno composta por 3 anéis de benzeno interligadas

PAH de alto peso molecular, moléculas caracterizadas por um peso molecular superior a 200 g.mol^{-1} . Estruturalmente com quatro ou mais anéis de benzeno (Figura 1.02), especialmente arranjados das mais variadas formas e dependendo da temperatura estão repartidos entre a atmosfera e a matéria particulada (Srogi, 2007).

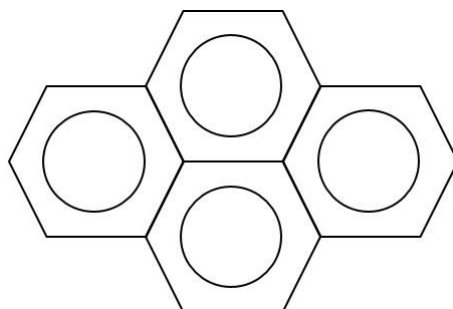


Figura 1.02 – Esquema da molécula de pireno composta por 4 anéis de benzeno interligadas

1.4.2. FONTES DE EMISSÃO

As principais fontes de emissão de PAH são a combustão incompleta de carvão, gás, petróleo e resíduos, bem como a pirólise de materiais orgânicos, a agricultura, motores de combustão interna e alteração diagenética de matéria orgânica (Conte *et al.*, 2001).

A Agência Europeia de Ambiente compila e publica regularmente dados relativos às emissões de PAH do conjunto de países membros da agência (conjunto de países da União Europeia mais a Islândia, Suíça, Noruega, Liechtenstein e Turquia), ao abrigo Convenção sobre Poluição Atmosférica Transfronteiras a Longa Distância, dividindo estas por setor responsável pela emissão.

Na figura 1.03 podemos constatar que a grande maioria das emissões (mais de 88%) são originadas por processos energéticos relacionados com o conforto térmico e processos industriais.

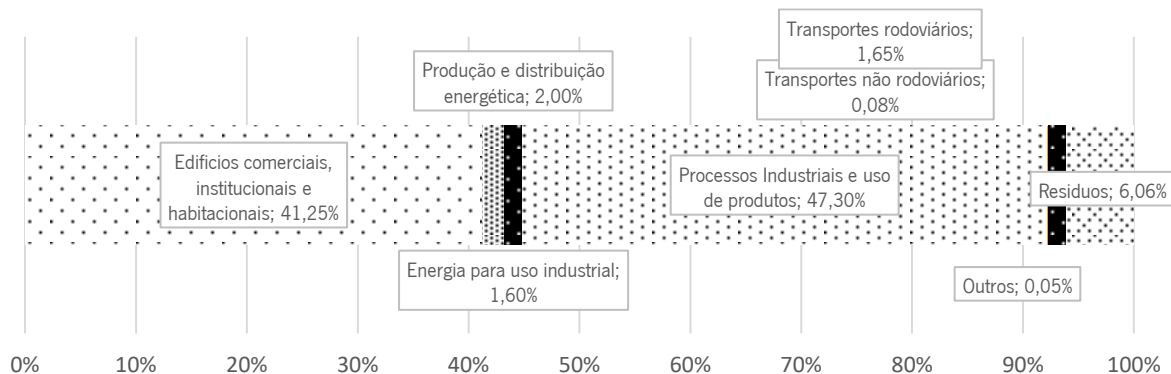


Figura 1.03 – Distribuição da emissão de PAH segundo a sua origem (Adaptadp: EEA,2018) - Dados do Liechtenstein, Malta e Turquia não foram considerados)

Os valores das emissões de “Edifícios Comerciais, Institucionais e Habitacionais” contribuem com 41% do total de emissões de PAH do grupo dos 33 países que constituem a Agência Ambiental Europeia (EEA). No entanto, as emissões diminuíram desde 1990 como resultado da diminuição do uso de carvão para aquecimento residencial.

Mas o maior contribuidor são os denominados “Processos industriais e uso de produtos”, que contribuem com 47% das emissões de PAH no espaço EEA. Em termos relativos (base 1990) este valor foi reduzido em mais de 50% devido essencialmente ao avanço tecnológico dos processos de refinação e fusão de metais.

Outro dos setores que beneficiou com o aprimoramento técnico e tecnológico foi o setor rodoviário. Os esforços para tornar este setor mais verde fazem com que do valor global de PAH, este setor seja responsável por apenas 1,65% das emissões (EEA, 2018).

Entre os anos de 1990 e 2016 a emissão de PAH na região EEA diminuiu 83%. Este resultado foi conseguido graças à legislação especializada e focada nesse objetivo, que se aliou a um maior controlo e substituição de tecnologias obsoletas por outras mais amigas do ambiente.

No entanto, embora a maioria dos países tenha conseguido uma diminuição das emissões de PAH desde 1990, três países (Dinamarca, Finlândia e Portugal) registaram um aumento das emissões de PAH, em média, superiores a 40% relativamente a 1990. Uma das causas deste aumento está relacionada com a introdução de medidas que privilegiam a queima de materiais renováveis (por exemplo sistemas de aquecimento baseados em madeira). O processo de combustão da madeira provoca emissões de PAH e foram incentivadas ao abrigo de políticas de controlo de emissões de poluentes que contribuem para as alterações climáticas (queima de matérias renováveis em detrimento de matérias não renováveis) que, no entanto, tiveram outras consequências. No computo geral, estes três países têm uma contribuição relativamente baixa quando comparados com o total da EEA, mas tal pode afetar localmente as populações e o meio ambiente. Isto é tanto mais preocupante considerando que os países que registaram, em valores absolutos, o valor mais elevado no conjunto dos 33 foram Portugal e Espanha, o que pode originar problemas regionais a ter em consideração (EEA, 2018).

Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAH) têm sido detetados um pouco por todo o mundo, mesmo em locais que se encontram longe de atividades industriais como os trópicos e as regiões polares. Em muitos solos tropicais compostos como o fenantreno, naftaleno e pirileno são mais abundantes do que em solos temperados. Nestes solos temperados, o benzo[a]fluoranteno, composto de elevado peso molecular, é frequentemente o PAH dominante (Mohan *et al.*, 2006).

As fontes de poluição de PAH são muito diversas e alterações na fonte emissora ou nos percursos de transporte podem influenciar significativamente o perfil de distribuição destas moléculas (Saranya Kuppusamy, 2017).

1.4.3. DESTINO DOS PAH NO SOLO

Após a entrada no solo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem ser atenuados ou degradados por uma variedade de processos físico químicos ou biológicos como a volatilização e/ou fotooxidação, sorção irreversível na matéria orgânica do solo, lixiviação para águas subterrâneas, absorção por plantas ou degradação por microrganismos (Okere, 2011).

A taxa a que estes processos ocorrem e a quantidade de PAH que são degradados ou retidos no solo são controlados por inúmeros fatores, entre eles, propriedades e tipo de solo (teor de matéria orgânica, teor de argila ou minerais, estrutura e composição de material húmico), temperatura do solo, humidade, potencial redox, disponibilidade de nutrientes, presença e atividade de organismos degradadores, propriedades de cada PAH como o peso molecular, biodisponibilidade, toxicidade e tempo de meia-vida (Wilson and Jones, 1993; Duan *et al.*, 2013).

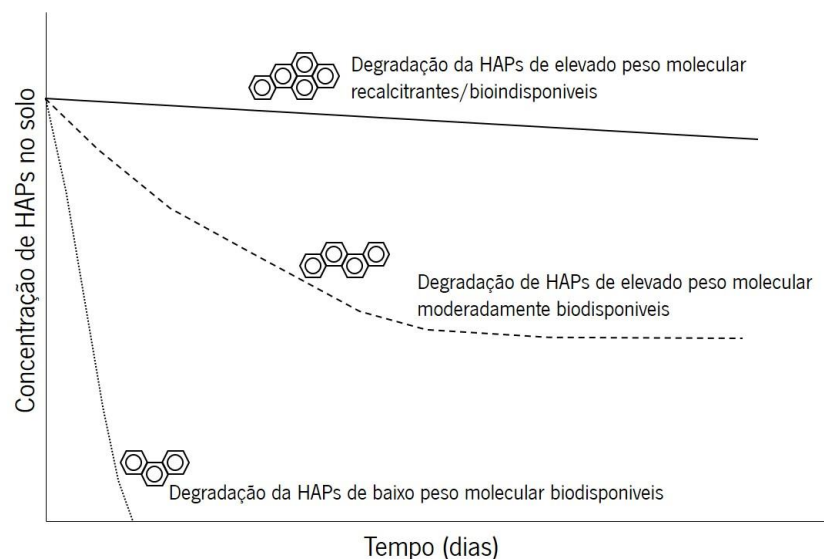


Figura 1.04 – Destino dos PAH no solo ao longo do tempo (Adaptado de S. Kuppusamy *et al.*, 2017)

A maioria dos PAH apresentam um comportamento biotápico relativamente ao seu desaparecimento no solo, sendo que após uma fase inicial em que a taxa de degradação é relativamente alta, esta tende a diminuir com o tempo devido à diminuição da fração biodisponível dos PAH. Em solos com altos teores de matéria orgânica e argilas, os PAH são protegidos pelas suas ligações à matéria orgânica e difusão nos microporos, limitando assim a sua degradação (Okere and Semple, 2011).

O principal processo pelo qual os PAH são removidos dos solos é biológico, através da degradação ou co-degradação em etapas mediadas por bactérias, fungos ou algas. A biodisponibilidade dos contaminantes para os microrganismos é fundamental nestes processos (Cébron *et al.*, 2013).

A sorção de PAH quer pela matéria orgânica quer pela componente mineral dos solos é determinante para a libertação de PAH para a solução do solo, limitando assim a sua biodisponibilidade (Barnier *et al.*, 2014).

A capacidade de captação de PAH pelos solos está fortemente relacionada com o teor de matéria orgânica (Lima *et al.* 2012). Esta relação não depende somente do seu teor de matéria orgânica, uma vez que solos com o mesmo teor de matéria orgânica têm potenciais diferentes de sorção de PAH. O facto da matéria orgânica ser uma mistura heterogénea de proteínas, polissacarídeos e lípidos (biopolímeros), substâncias húmicas e diferentes combinações de compostos de carbono, em que cada composto tem um potencial diferente de sorção de PAH, a quantidade relativa de cada um dos seus constituintes influencia diretamente a sua capacidade de sorção (Mechlińska *et al.*, 2009).

Outras características da matéria orgânica que influenciam significativamente a sorção de PAH são a estrutura, arranjo espacial, propriedades físicas e polaridade (Zhu *et al.*, 2016).

Para além da matéria orgânica também a fração mineral de cada solo contribui para a sua capacidade global de captação de PAH. A estrutura única dos minerais permite que estes interajam com vários compostos, em especial com compostos polares. Grupos hidroxilo superficiais, superfícies hidrofóbicas com ligação Si-O, catiões hidratados e metais superficiais de minerais fornecem possível local de sorção de PAH. Os minerais de argila do grupo dos filossilicatos e os óxidos metálicos são minerais amplamente estudados, sendo ambos sorventes eficazes no solo. No entanto, considerando que o solo é uma interação complexa, a componente mineral e a componente orgânica de um solo interagem em conjunto, maioritariamente agregados em detrimento de misturas isoladas. Assim a sorção de PAH no solo é influenciada em grande medida pelos complexos mineral-orgânico presentes (Xiaoya Ren *et al.* 2018).

1.4.3.1. TRANSPORTE NO SOLO

Acredita-se que o transporte dos PAH no solo resulta de uma combinação de processos de difusão e de processos de precipitação e suspensão (Mechlińska *et al.*, 2009). Os processos de difusão estão fortemente relacionados com a biodisponibilidade dos PAH (Johnsen *et al.*, 2005). Os principais processos que contribuem para o sequestro de PAH no solo são a difusão intra-particular e difusão intra-matéria orgânica (Northcott and Jones, 2000).

Os processos de difusão aumentam essa biodisponibilidade dos PAH no solo. Os poros do solo, em especial os macroporos, são a principal porta para os processos de fluxo de meio, porque permitem um movimento rápido e sem barreiras dos contaminantes. O transporte particulado ou transporte coloidal ocorre em duas circunstâncias, ou os contaminantes são arrastados na forma particulada devido à sua baixa solubilidade do meio (em geral água) ou ligados a partículas inertes das fases móveis (Sharma *et al.*, 2013). Coloides com superfícies específicas elevadas permitem que contaminantes de baixa solubilidade e/ou hidrofobicidade (caso dos PAH) sejam adsorvidos (Tavakkoli *et al.*, 2015).

A sorção de PAH por elementos estáticos do solo restringem o movimento dos contaminantes, enquanto a sorção por partículas nas fases móveis do solo promove o seu transporte, não só em meio saturados de água como também em meios porosos não saturados (embora neste caso com algumas limitações). Este processo tem maior probabilidade que o anterior de agravar a difusão da poluição (Knappenberger *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013).

Um dos componentes do solo que tem maior importância no transporte de PAH é a matéria orgânica dissolvida. Este componente do solo, derivado da correção orgânica de solos, está descrito como promotor de transporte de poluentes (Li *et al.*, 2005). As bactérias podem estar fisicamente ligadas à matéria orgânica o que facilita o contato direto com contaminantes associados a micelas (Schaefer and Juliane, 2007). Para além disso, a matéria orgânica dissolvida diminui a probabilidade de interação de bactérias móveis com as partículas de solo envolventes o que contribui para o seu movimento (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2015).

A mobilidade dos microrganismos e o transporte de PAH nas fases móveis do solo, bem como a adsorção pela matéria orgânica têm um papel fundamental na degradação de PAH.

1.4.4. ADAPTAÇÕES MICROBIANAS

O processo de biodisponibilidade foi descrito por Ehlers and Luthy, 2003, como uma sequência de processos de sorção e dessorção dos poluentes pelos constituintes do solo até que aqueles chegam à membrana celular e aí são adsorvidos pelos microrganismos.

Contudo quando os PAH se encontram em condições de baixa biodisponibilidade (baixa solubilidade ou fortes ligações à matéria orgânica e minerais) as características dos microrganismos aparentam desempenhar um papel particularmente importante. Assim, quando estudamos a biodisponibilidade de PAH no solo devem ser consideradas várias adaptações microbianas que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes. Os microrganismos adaptam-se de acordo com as variações ambientais e estas adaptações podem ser morfológicas, fisiológicas ou comportamentais (Fester *et al.*, 2014; Johnsen *et al.*, 2005).

Consumada a adaptação dos microrganismos para poderem degradar os PAH dissolvidos/não sorvidos, as moléculas sorvidas na matéria orgânica e mineral podem também estar disponíveis para os microrganismos. Esta disponibilidade pode ocorrer de dois modos diferentes (Chen & Ding, 2012): os PAH adsorvidos pela matéria orgânica ou fração mineral do solo podem ser libertados para a fase aquosa com a ajuda de biosurfactantes antes da biodegradação e ou podem ser degradados diretamente através de ligação à parede celular pela ação de enzimas extracelulares. Assim, a desorção não é um fator limitante da biodisponibilidade (Megharaj *et al.*, 2011).

1.5. REMEDIAÇÃO BIOLÓGICA / BIORREMEDIAÇÃO

A biodegradação é o modo como a natureza degrada matéria orgânica, residuais, em nutrientes e compostos utilizáveis por organismos vivos, seja na presença de oxigênio (biodegradação aeróbia) seja na sua ausência (biodegradação anaeróbia). Para promoção de degradação aeróbia são usadas técnicas de campo como bioestimulação (arejamento e adição de fertilizantes), compostagem ou armazenamento de solo em pilhas, bem como técnicas *ex-situ*, mais avançadas, que recorrem à utilização de bio reatores com melhor controlo da temperatura e pressão para otimização dos processos de degradação dos PAH (Alexander, 1999).

O processo de biodegradação aeróbia, também conhecido por respiração aeróbia consiste na degradação de contaminantes por micro-organismos na presença de oxigênio. As bactérias aeróbias usam o oxigênio como aceitador de eletrões na degradação de matéria orgânica e inorgânica em compostos mais simples, na maioria das vezes produzindo dióxido de carbono e água como produtos finais (Habe e Omori, 2003).

A biorremediação de solos contaminados com PAH tem vindo a receber aprovação como tecnologia um pouco por toda a comunidade científica. A biorremediação é considerada segura, amiga do ambiente e económica podendo ser realizada *in-situ* (Mohan *et al.*, 2006; Kuppusamy *et al.*, 2017).

Na bioestimulação, os solos contaminados são periodicamente sujeitos a movimentação que promove o arejamento bem como a homogeneidade para a biodegradação. As condições do solo são controladas através da monitorização dos teores de humidade e nutrientes, frequência de arejamento e pH de modo a otimizar a taxa de degradação dos contaminantes. Podem ser ainda ser adicionados resíduos orgânicos, corretores, fertilizantes de modo a melhorar o processo de degradação e oxidação por parte das populações microbianas existentes (Gan *et al.* 2009).

Esta técnica, para além de simples, de baixo custo e exige pouca monitorização dos parâmetros do solo. No entanto, em solos altamente contaminados ou com compostos muito tóxicos, a bioestimulação não é suficiente para uma biodegradação de PAH efetiva (Wang *et al.*, 1990).

Com esta técnica, o tratamento é limitado à camada superficial do solo (10 a 35 cm) e existe a possibilidade dos contaminantes migrarem para fora da área de tratamento. A eficiência deste método é fortemente influenciada pelas condições específicas de cada localização e por variáveis como a precipitação que são impossíveis de controlar e podem levar a um aumento considerável do tempo de remediação.

Caso as populações microbianas endógenas de uma determinada área não possuam capacidade de degradação de PAH ou as condições ambientais não sejam favoráveis a essa degradação, os PAH acabam por persistir no meio ambiente por longos anos. Assim, acaba por ser necessário recorrer à bioaugmentação, técnica onde são usados microrganismos específicos exógenos (fungos e bactérias) para realizar os processos de biodegradação (Castiglione *et al.*, 2016). Os microrganismos degradadores são geralmente isolados em laboratório a partir de solos com historial longo de contaminação por PAH.

Na literatura são descritas experiências laboratoriais de isolamento de microrganismos degradadores e de verificação das taxas de degradação destes em diferentes condições. Li *et al.* (2008) realizou ensaios de fase sólida e líquida (lamas) e Pinelli *et al.* (1997) usou bioreatores com agitação (lamas) e fases semissólidas. Ambos encontraram diferenças nas taxas de degradação entre os ensaios que realizaram. Nos ensaios de fase líquida a taxa de degradação foi maior que os realizados com fases sólidas ou semissólidas. Essas maiores taxas de degradação foram relacionadas com maiores taxas de desorção dos PAH, maior homogeneidade e maior presença de oxigénio nos ensaios de fase líquida, assim como com a maior proximidade entre os vários protagonistas (PAH, oxigénio e microrganismos) na fase líquida, aumentando assim a degradação.

Em 2009 Jong-Su Seo, *et al.*, compilaram as espécies de bactérias isoladas que se comprovou serem capazes de degradar PAH, na tabela 1.02 estão sumarizadas as espécies isoladas capazes de degradar pireno, fenantreno ou ambos os compostos

Tabela 1.02 – Lista (inacabada) de espécies de bactérias degradadoras de PAH (Adaptado: Jong-Su Seo *et al.*, 2009)

Espécie	Composto
<i>Acidovorax delafieldii</i>	Fenantreno
<i>Arthrobacter</i> sp.	Fenantreno
<i>Arthrobacter sulphureus</i>	Fenantreno
<i>Bacillus cereus</i>	Pireno
<i>Brevibacterium</i> sp.	Fenantreno
<i>Burkholderia cepacia</i>	Fenantreno, Pireno
<i>Burkholderia cocovenenans</i>	Fenantreno
<i>Burkholderia</i> sp.	Fenantreno
<i>Cycloclasticus</i> sp.	Pireno
<i>Janibacter</i> sp.	Fenantreno

<i>Mycobacterium flavescens</i>	Pireno
<i>Mycobacterium</i> sp.	Fenantreno, Pireno
<i>Mycobacterium</i> sp.	Pireno,
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Fenantreno, Pireno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fenantreno
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fenantreno
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Fenantreno
<i>Pseudomonas putida</i>	Fenantreno
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	Pireno
<i>Pseudomonas</i> sp.	Fenantreno
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Pireno
<i>Rhodococcus</i> sp.	Pireno
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Fenantreno
<i>Sphingomonas</i> sp.	Fenantreno
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Pireno
<i>Staphylococcus</i> sp.	Fenantreno
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Pireno
<i>Xanthomonas</i> sp.	Pireno

1.6. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA PRESSÃO - UPLC

A cromatografia líquida foi inventada em 1900 (primeira descrição em 1901, 31 de dezembro no XI Congress of Naturalists and Physicians, em São Peterburgo) durante a pesquisa sobre pigmentos de plantas. *Mikhail Semenovich Tswett* usou uma coluna com carbonato de cálcio como adsorvente e uma mistura de éter de petróleo/etanol como eluente, para separar clorofila e carotenoides das folhas de plantas (Miller, 2005). Neste sistema, a fase móvel (eluente) percola pela fase estática (adsorvente) através da força da gravidade. Ao longo do século XX, com os avanços na instrumentação e na tecnologia das colunas através do uso de materiais adsorventes cada vez mais particulados e de pressões de funcionamento cada vez maiores, aperfeiçoando a técnica, foi possível aumentar a resolução, a velocidade e a sensibilidade na cromatografia líquida. Hoje em dia, a cromatografia líquida, nas suas mais variadas formas, tornou-se uma das mais poderosas ferramentas de química analítica (Water, 2019).

A cromatografia líquida de ultrapressão (UPLC- Ultra Pressure Liquid Chromatography) é uma técnica com a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes numa solução, recorrendo para o efeito, a colunas com partículas de diâmetro característico da ordem de 1 μm e pressões de funcionamento da fase móvel na ordem de 1000 bar (Porto, 2014).

O tempo que uma determinada substância, juntamente com a fase móvel, demora a atravessar a coluna (fase estacionária) e a atingir o detetor, designa-se por tempo de retenção. O tempo de retenção corresponde ao tempo que decorre entre o momento de injeção da amostra e a saída do pico (intensidade do sinal) do componente que emerge da coluna (Figura 1.05). O tempo de retenção varia com o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna (Serrano, 2013).

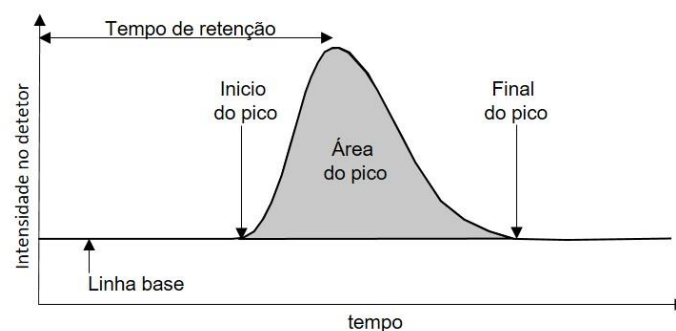


Figura 1.05 – Ilustração de cromatograma de cromatografia líquida

Através da área do pico de uma determinada substância, podemos calcular a sua concentração recorrendo à medição e comparação, pelo mesmo método, de soluções com concentrações conhecidas, sucessivas e calculando, por regressão linear, a função que relaciona a área do pico no detetor com a concentração de determinada substância (ou substâncias) presentes na amostra.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1

RECOLHA DA AMOSTRA DE SOLO

A amostra de solo foi recolhida na Freguesia de Aguçadoura (41° 27' 40,62'' N; 8° 45' 15,88'' O), no concelho da Póvoa de Varzim, Distrito do Porto, Portugal. Trata-se de uma área de intensa atividade agrícola, onde predomina a cultura de legumes e hortaliças, situada em zona de dunas terciárias.

O processo de amostragem foi realizado com um amostrador cilíndrico de 5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento. Foram recolhidas 3 amostras compostas cada uma com 3 vezes o volume do amostrador (FAO, 2015).

2.1.2

CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA DE SOLO

As análises físico-químicas do solo foram realizadas no Laboratório de Solo e Plantas da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro de acordo com os seguintes protocolos para cada um dos parâmetros:

Tabela 2.01 – Parâmetros analisados e Norma/ Protocolo utilizado

Parâmetros	Unidades	Norma / Protocolo
Granulometria	(g.kg ⁻¹)	ISO 11277
Teor de matéria orgânica	%(m.m ⁻¹)	EN 12879
pH (H ₂ O)	-	ISO 10390
pH (KCl)	-	ISO 10390
Fósforo extraível	mg P ₂ O ₅ .kg ⁻¹	Egner et al., 1960
Potássio extraível	mg K ₂ O.kg ⁻¹	Egner et al., 1960
Azoto total	g N.kg ⁻¹	ISO 14265

2.1.3

CARATERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA DE SOLO

A contagem dos microrganismos do solo (expresso em Unidades Formadoras de Colónias – UFC.g⁻¹ de solo) foi realizada através da técnica de diluição e crescimento em placa (10⁻¹ a 10⁻⁷). Cada réplica do ensaio foi realizada misturando 10 g de solo fresco com 90 ml de solução aquosa de NaCl (0,9%) Cloreto de Sódio, PanReac AppliChem, 99.5% (Lote 0001112289), autoclavada (15 minutos a 121°C), contendo 1 ml de solução de Na₅P₃O₁₀ (0,2 g.ml⁻¹) Tripolifosfato de Sódio, Sigma-Aldrich, 85% (Lote 16529COV) e 0,1 ml solução de Tween 80® (2%) MERCK SCHUCHARDT (Lote 8.22187.05000) (Salminen *et al.*, 2004).

A mistura foi agitada durante 1 hora a 160 rpm, deixada a decantar durante 30 min e depois foram feitas sete diluições decimais sucessivas do sobrenadante utilizando para tal uma solução aquosa de

NaCl (0,9%) PanReac AppliChem, 99.5% (Lote 0001112289), autoclavada durante 15 min a 121°C (Helmi Hamdi *et al.*, 2007).

Utilizou-se o meio de cultura R2A PanReac AppliChem (Lote 97055) (Reasoner e Geldreich, 1985), autoclavado, para cultura de bactérias para enumeração. As placas foram colocadas a 25 °C durante 96 horas. Os resultados foram expressos como o número de unidades formadoras de colônias por grama de solo seco (UFC.g⁻¹ de solo).

2.1.4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PAH

A seleção de microrganismos degradadores de PAH foi realizada por uma técnica de enriquecimento. Assim, 1 ml da suspensão do solo (Salminen *et al.*, 2004) foi inoculado em meio mineral líquido (MML- 5 g de NaCl Cloreto de Sódio, PanReac AppliChem, 99.5% (Lote 0001112289), 1 g de K₂HPO₄ Hidrogenofosfato dipotássio, Riedel-de Haen, 99.5% (Lote 71400), 1 g de (NH₄)₂SO₄, Sulfato de amônio, PanReac AppliChem, 99% (Lote 0000473432), 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, Sulfato de Magnésio, Riedel-de Haen, 99% (Lote 42720) e 3 gramas de KNO₃, Nitrato de Potássio, Labkem, 99% (Lote 17L23722AFF) por litro de meio em água destilada pH 7) (Coppotelli *et al.* 2010) suplementado com 2000 mg.l⁻¹ de pireno AGROS ORGANICS, 98% (Lote A0322434), (ou fenantreno AGROS ORGANICS, 97% (Lote A0350792), em ensaios separados), como única fonte de carbono e energia. Foram realizadas três culturas sucessivas para cada ensaio, realizadas em balões de Erlenmeyer de 250 ml sendo que a cultura *n* foi inoculada com 1% da solução *n-1*. As culturas foram incubadas a 25 °C, 150 rpm, por 7 dias (Madueño *et al.*, 2011).

No final dos 21 dias, foi realizada a técnica de diluição e crescimento em placa (10⁻¹ a 10⁻⁷): foram realizadas diluições decimais sucessivas em solução de NaCl (0,9%) PanReac AppliChem, 99.5% (Lote 0001112289) e crescimento e enumeração durante 96 horas a 25°C em meio de cultura R2A PanReac AppliChem (Lote 97055) (Reasoner e Geldreich 1985).

2.1.5 CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO R2A

Após a seleção das bactérias em MML durante 21 dias uma amostra de 1 ml de cada uma das linhas de crescimento (pireno e fenantreno) foi colocada em crescimento em meio líquido R2A (Reasoner e Geldreich, 1985) durante 28 horas a 25°C a 150 rpm. A carga microbiana gerada será utilizada nos ensaios de biodegradação de PAH por bioaugmentação.

2.1.6 CONTAMINAÇÃO DA AMOSTRA DE SOLO

As amostras de solo contaminado (pireno AGROS ORGANICS, 98% (Lote A0322434) e fenantreno AGROS ORGANICS, 97% (Lote A0350792)) foram preparadas misturando as amostras de solo com uma solução de pireno e outra de fenantreno (completamente dissolvidos em C₆H₁₄ Hexano (n), Chem-Lab NV, 99% (Lote 25.0470301)) para obter concentrações individuais de cada composto de 50, 100, 250 e 500 µg. g⁻¹ de solo, que é o intervalo de concentrações típico de PAH encontrado perto de locais contaminados (Gomez *et al.*, 2010). Em seguida, as misturas foram colocadas numa hotte até o hexano evaporar completamente (Fonseca *et al.*, 2011). Para os ensaios onde o microbioma nativo será considerado (Bioestimulação e Bioaumentação A) a contaminação foi realizada apenas em 10% da amostra de solo, por receio que a imersão da amostra em hexano alterasse significativamente o microbioma nativo.

No Anexo I podem ser consultados os dados das medições e cálculos realizados no processo de contaminação das amostras

2.1.7 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO (21 DIAS)

2.1.7.1. BIOESTIMULAÇÃO

As amostras de 20 g de solo contaminadas com PAH foram misturadas com mais 180 g de solo para se finalizar com amostras de 200 g de solo. As amostras foram colocadas em balões de fundo raso de 500 ml de capacidade devidamente protegidos da luz solar com papel de alumínio.

A cada uma das amostras dos conjuntos codificada como BExxx_1 e BExxx_2 (sendo o conjunto BExxx_1 replica do conjunto BExxx_2), onde B (Bio) E(Estimulação) xxx(Concentração PAH µg.g⁻¹ de solo) e 1/2 (número de réplica), foram adicionados 20 ml de meio líquido R2A (10 ml da linha Pireno e 10 ml da linha Fenantreno), autoclavado a 121°C durante 15 min e tamponados com rolas de algodão e gaze. A cada 7 dias, as amostras eram agitadas durante 30 minutos a 250 rpm. No final dos 21 dias de ensaio as amostras foram autoclavadas durante 15 minutos a 121 °C para parar o processo de degradação.

2.1.7.2. BIOAUMENTAÇÃO A

As amostras de 20 g de solo contaminadas com PAH foram misturadas com mais 180 g de solo para se finalizar com amostras de 200 g de solo. As amostras foram colocadas em balões de fundo raso de 500 ml de capacidade devidamente protegidos da luz solar com papel de alumínio.

A cada uma das amostras dos conjuntos codificada como BAAxxx_1 e BAAxxx_2 (sendo o conjunto BAAxxx_1 replica do conjunto BAAxxx_2), onde B (Bio) A (Aumentação) A, xxx (Concentração PAH $\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) e 1/2 (número de réplica), foram adicionados 10 ml de meio líquido R2A não estéril da linha pireno, mais 10 ml de meio líquido R2A não estéril da linha fenantreno e tamponados com rolas de algodão e gaze. A cada 7 dias, as amostras eram agitadas durante 30 minutos a 250 rpm. No final dos 21 dias de ensaio as amostras foram autoclavadas durante 15 minutos a 121 °C para parar o processo de degradação.

2.1.7.3. BIOAUMENTAÇÃO B

Com o objetivo de analisara capacidade de degradação das espécies selecionadas, as amostras de 200 g de solo contaminadas com PAH foram autoclavadas (121°C durante 20 min) e colocadas em balões de fundo raso de 500 ml de capacidade devidamente protegidos da luz solar com papel de alumínio.

A cada uma das amostras dos conjuntos codificada como BABxxx_1 e BABxxx_2 (sendo o conjunto BABxxx_1 replica do conjunto BABxxx_2), onde B (Bio) A (Aumentação) B, xxx (Concentração PAH $\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) e 1/2 (número de réplica,) foram adicionados 10 ml de meio líquido R2A não estéril da linha pireno, mais 10 ml de meio líquido R2A não estéril da linha fenantreno e tamponados com rolas de algodão e gaze. A cada 7 dias, as amostras eram agitadas durante 30 minutos a 250 rpm. No final dos 21 dias de ensaio as amostras foram autoclavadas durante 15 minutos a 121 °C para parar o processo de degradação.

2.1.8 EXTRAÇÃO DE PAH DA AMOSTRA DE SOLO POR AGITAÇÃO

Após os 21 dias de ensaio e depois de terminado o processo de degradação, foram colhidos e pesados 20 g de solo cada uma das amostras dos conjuntos BExxx_1, BExxx_2, BAAxxx_1 e BAAxxx_2, BABxxx_1 e BABxxx_2, depois de autoclavado , cada uma das amostras recolhidas foram colocadas em balões de 500 ml e adicionados 7,5 ml de solução de criseno AGROS ORGANICS, 90% (Lote

A0251606) 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dissolvido em Acetonitrilo, Chem-Lab NV, 99.9% (Lote 26.2180905)), como testemunho do rendimento da extração. Em seguida foram adicionados 50 ml de acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) Chem-Lab NV, 99,5% (Lote 26.8682903) e colocadas num agitador durante 30 minutos a 250 rpm. Após esse tempo foram adicionados 50 ml de hexano (C_6H_{14}) e a amostra continuou no agitador durante mais 12 horas (250 rpm). No final das 12 horas, parou-se o agitador e deixou-se as amostras a decantar durante 30 minutos. Decantou-se o sobrenadante para um outro recipiente filtrando com filtro de papel, após o qual se adicionou 50 ml de hexano (C_6H_{14}) para lavagem da fase sólida, decantou-se e filtrou-se o hexano (C_6H_{14}) adicionado neste segundo passo. Colocou-se a totalidade de hexano recolhido e filtrado numa ampola de decantação e removeu-se a acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) com 400 ml de água, mexendo duas vezes e separando-se a fase aquosa (água+acetona) da fase solvente (hexano+PAH). O solvente foi seco com 40 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) PanReac AppliChem, 99%. O sulfato de sódio anidro foi lavado com 50 ml de hexano, recolhido e filtrado com filtro de papel (ISO 13859, 2014).

No Anexo II podem ser consultados os dados das medições e cálculos realizados no processo de extração de PAH

2.1.9 SUBSTITUIÇÃO DE SOLVENTE

Foi necessário proceder à substituição do solvente nas amostras que se encontravam em solução de hexano, por questões de compatibilidade deste com o material da coluna e sistema de análise. Assim, foram colocados 10 ml de cada amostra recolhida (em hexano) no evaporador Turbovap® com o banho a 52 °C e um fluxo contínuo de azoto (N_2) a uma pressão de 7,5 psi, durante 20 minutos, no final dos quais o hexano evapora na totalidade. Após a remoção total de hexano as amostras sólidas presentes foram dissolvidas em 10 ml de acetonitrilo Chem-Lab NV, 99.9% (Lote 26.2180905) (ISO 13859, 2014).

2.1.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PRESSÃO - UPLC

2.1.10.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras e soluções, foram filtradas em filtros de 22 μm compatíveis com acetonitrilo, imediatamente antes da realização da análise.

2.1.10.2. ANÁLISE UPLC

A análise cromatográfica foi realizada no sistema UPLC Nexera X2 (Shimadzu, Coreia do Sul) equipado com detetor de foto díodos de matriz (SPD-M20A Photo Diode Array).

Para a separação dos PAH, utilizou-se a coluna (Acquity UPLC® HSS T3 1,8 µm 2,1 x 100 mm, Waters, Lote 0168351681) precedida de pré coluna (Acquity UPLC® HSS T3 1,8 µm Vanguard™ Pre-Column 2,1 x 5mm, Waters, (Lote 0166351181) aquecidas a 35 ° C.

A fase móvel é constituída por duas soluções, a solução A (água ultrapura Millipore®) e solução B (acetoneitrilo Chem-Lab NV, 99.9% (Lote 26.2180905)) com um caudal de 0,25 ml.min⁻¹ com as condições de gradiente de eluição em várias etapas descritas na tabela 2.02

Tabela 2.02 – Variação da constituição da fase móvel ao longo do tempo de ensaio

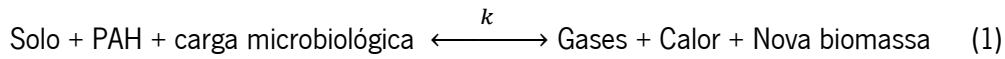
Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,0 - 0,5	40,5	59,5
0,5 – 3,5	31,5	68,5
3,5 – 11	1,8	98,2
11 – 12	40,5	59,5

As amostras e o padrão (10 µl, preparados como descrito) foram injetados de acordo com o sistema automático de recolha de amostras. Os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 190 a 500 nm (por defeito do sistema).

Primeiramente, procedeu-se a extração de cromatogramas em 254 nm. Os PAH das amostras foram identificados por espectroscopia de absorção característica do PDA (Photo Diode Array) e os tempos de retenção foram comparados com os do padrão analítico. A quantificação foi feita inserindo dados de áreas de pico previamente identificadas na equação de regressão (Acimovic *et al.*, 2017).

2.1.11 MODELO DE DERIVAÇÃO MATEMÁTICA SEGUNDO OLATUNJI E HORSFALL, 2014

Em 2014 Olatunji e Horfall, considerando que num sistema em equilíbrio com uma substância não persistente, muitas destas substâncias são degradadas por processos bioquímicos a uma taxa relevante para ser considerada eficiente e de acordo com o princípio de conservação a massa,



k : taxa da reação

Deduziram a equação (2) como modelo de biodegradação de PAH (considerando que não existe perdas abióticas de PAH) .

$$C = C_{\text{inicial}} \cdot e^{-k_m \cdot t} \quad (2)$$

Onde,

C_{inicial} : Concentração inicial de PAH ($\mu\text{g. g}^{-1}$)

C : Concentração final de PAH ($\mu\text{g. g}^{-1}$)

k_m : Coeficiente de degradação (t^{-1})

t : tempo (t)

Ao aplicar a equação (2) para n concentrações durante o mesmo período de tempo (t) podemos calcular o valor médio k_m

$$k_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\ln C_{\text{inicial}_i} - \ln C_i}{t} \quad (3)$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA DE SOLO

Na tabela 3.01 estão presentes os resultados das análises químicas da amostra de solo realizadas no Laboratório de Solos e Plantas da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, no Anexo III pode ser consultado o boletim de resultados das análises físico-químicas realizadas a amostra de solo.

Tabela 3.01 – Resultados análise química da amostra de solos

Parâmetro	Resultado	Unidade	Classificação	Protocolo
Teor de Matéria Orgânica	0,79	%(m.m ⁻¹)	Baixo	EN 12879
pH (H ₂ O)	7,5	-	Neutro	ISO 10390
pH (KCl)	7,0	-	Neutro	ISO 10390
Fósforo Extraível	231	mg P ₂ O ₅ .kg ⁻¹	Muito Alto	Egner et al, 1960
Potássio Extraível	47	mg K ₂ O.kg ⁻¹	Baixo	Egner et al, 1960
Azoto total	0,52	g N.kg ⁻¹	-	ISO 14265
Rácio C/N	8,8	-	-	

Sabendo de antemão que as amostras foram recolhidas numa zona de agricultura industrial intensiva era previsível que alguns dos elementos associados ao uso intensivo de fertilizantes o que se confirma pela presença de um nível muito alto de fósforo (P) extraível. O teor de matéria orgânica é surpreendentemente baixo, uma vez que é um solo utilizado na agricultura pelo que seria previsível que o teor de matéria orgânica se situasse em valores a rondar os 5%. Estes dois fatores (altos valores de fósforo e baixo teor de matéria orgânica) indicam que a correção dos solos e adição de nutrientes é proveniente maioritariamente de fertilizantes e corretores químicos e não de práticas tradicionais como o uso de chorumes ou camas de animais ou mesmo de corretores orgânicos com origem na compostagem de resíduos.

Na tabela 3.02 estão presentes os resultados da análise granulométrica à amostra de solo, realizadas no Laboratório de Solos e Plantas da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Tabela 3.02 – Resultados análise granulométrica da amostra de solos

Designação	Tamanho das Partículas (mm)	g.kg ⁻¹	Classificação	Protocolo
areia grossa	0,2 - 2	775	Solo Arenoso	ISO 11277
areia fina	0,02 - 0,2	177		
limo	0,002 - 0,02	17		
argila	< 0,002	31		

Numa primeira análise o facto de materiais caracterizados como areias corresponderem a 95,2% (w/w) do total do solo demonstra a natureza do terreno em que a zona agrícola se encontra inserida (dunas terciárias). Analisando os valores, podemos caracterizar a amostra como pertencendo a um solo arenoso (Ramos *et al.*, 2016). Solos arenosos ou arenosolos são muito permeáveis tendo uma capacidade de retenção de água muito baixa, o que é uma vantagem para a produção de produtos hortícolas porque os solos aquecem mais cedo (baixa inércia térmica) na época de produção (FAO, 2015).

Assim, temos um solo classificado como arenosolo (FAO, 2015) que é caracterizado por um baixo teor de matéria orgânica, elevada permeabilidade e baixa capacidade de retenção de água, vestígios de fertilização incorreta e com uma inércia térmica baixa.

3.2. CARATERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA DE SOLO

Para além da caracterização física (granulométrica) e química do solo procedeu-se à quantificação da carga microbiológica utilizando R2A agar como meio de crescimento. Segundo Reasoner e Geldreich (1985) o meio é propício ao crescimento de bactérias heterotróficas com um resultado de 10^7 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ solo após crescimento durante 96 horas a 25°C. No entanto, e porque não se procedeu à identificação das espécies, considerámos que a carga microbiana quantificada corresponde ao conjunto de bactérias e fungos presente no solo, expressa em unidades formadoras de colónias (UFC). Os resultados obtidos mostram a existência de uma carga microbiana com capacidade de formação de colónia de 10^7 por cada grama de solo seco. O resultado, quando comparado com solos usados em experiências similares, embora de locais diferentes do globo, têm a mesma ordem de grandeza. São os casos de ensaios realizados por Salmien *et al.* (2004) em solos industriais no sul da Finlândia com carga microbiana de 10^8 (UFC.g⁻¹ de solo) ou Helmi Hamdi *et al.* (2007) em ensaios com solos originários do Japão com carga microbiana de 10^7 (UFC.g⁻¹ de solo).

3.3. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE UFC APÓS CRESCIMENTO EM R2A LÍQUIDO

Depois do procedimento de seleção com MML (Madueño *et al.*, 2011), uma amostra foi recolhida e colocada em crescimento em R2A líquido (com pireno ou fenantreno como únicas fontes de carbono) durante 28 horas a 25°C com uma rotação de 150 rpm, após este procedimento foram recolhidas amostras e diluídas em fatores de 10 e colocada em placas de R2A Agar para crescimento durante 96 horas para contagem/determinação da carga microbiana (UFC.ml⁻¹) de cada uma das linhas de crescimento. Com um resultado de $10^7(\pm 10)$ UFC.ml⁻¹ para a linha R2A Pireno e $10^8(\pm 10)$ UFC.ml⁻¹ para a linha R2A Fenantreno.

Dos resultados obtidos conclui-se que o a carga microbiana presente na linha R2A fenantreno no final dos 21 dias são estatisticamente semelhantes (considerando o desvio padrão)

Como não se procedeu à sua identificação das espécies não é possível afirmar se a diferença se deve a um maior número de espécies capazes de usar o fenantreno como fonte de carbono em comparação com o pireno ou se determinada espécie capaz de degradar fenantreno consegue ter taxas de crescimento superiores quando utiliza este composto como fonte carbono, de novo em comparação com o pireno.

Independentemente da razão pelo qual esta diferença se verifica, o facto a registar deste ensaio é a existência na amostra de solo utilizada de espécies de microrganismos com capacidade de utilização de pireno ou fenantreno como única fonte de carbono. Assim, com este dado podemos proceder a ensaios de bioestimulação, estimulando os microrganismos naturalmente existentes no solo com capacidade de degradar PAH como o pireno e fenantreno e a ensaios de bioaugmentação realizando variações na carga microbiana do solo).

3.4. COMPOSIÇÃO DOS CONSÓRCIOS MICROBIOLÓGICOS UTILIZADOS

De acordo com os resultados apresentados nos pontos 3.2 e 3.3, a figura 3.01 apresenta a carga microbiana dos consórcios utilizados para cada um dos ensaios.

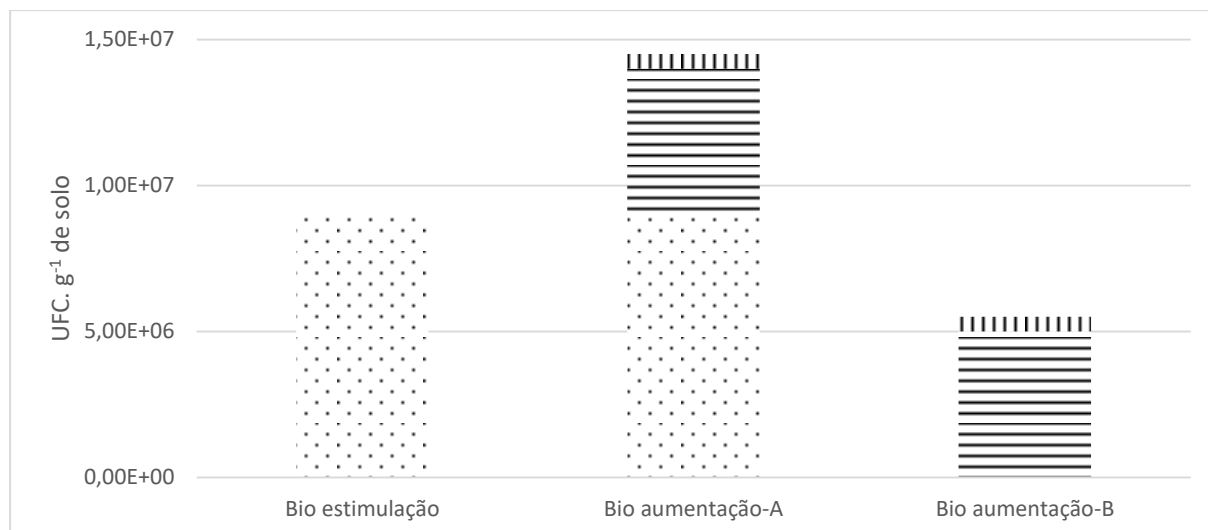


Figura 3.01 – Carga microbiana utilizadas nos ensaios realizados. microbioma nativo (·), consórcio microbiológico R2A Fenantreno (≡) e consórcio microbiológico R2A Pireno (|||), expresso em UFC. g⁻¹ de solo.

No ensaio de bioestimulação foi unicamente testada a capacidade de biodegradação por parte do microbioma nativo da amostra de solo (9×10^6 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo), bioestimulado por 20 ml de R2A líquido estéril.

Para o ensaio de bioaumentação A, para além do microbioma nativo (9×10^6 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo), foram adicionados os consórcios obtidos na linha de seleção em MML de fenantreno (5×10^6 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo) e na linha de seleção em MML de pireno (5×10^5 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo), em suspensão em 20 ml de R2A líquido), num total de $1,45 \times 10^7$ ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo.

Por fim no ensaio de bioaumentação B foi testada a capacidade de degradação de um consórcio de microrganismos composto por 5×10^6 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo com origem no MML de fenantreno e 5×10^5 ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo com origem no MML de pireno, em suspensão em 20 ml de R2A líquido, para uma carga microbiana total de $5,5 \times 10^6$ ($\times 10$) UFC.g⁻¹ de solo.

3.5. BIODEGRADAÇÃO

Os resultados dos ensaios de biodegradação foram obtidos através análise de UPLC e foram tratados de acordo com os exemplos apresentados em anexo de acordo com o seguinte:

Anexo IV – Cromatogramas das amostras aos 254 nm;

Anexo V – Retas de Regressão Linear de Calibração dos compostos (Pireno, Fenantreno e Criseno);

Anexo VI – Taxas de Eficiência da Extração por Agitação;

Anexo VII – Cálculos das Concentrações por ensaio.

Desta forma foram encontrados os valores das taxas de degradação média em cada um dos ensaios e para cada uma das substâncias consideradas. Nos cálculos realizados foi considerado, de acordo com o protocolo seguido, que as taxas de recuperação dos poluentes eram iguais à taxa de recuperação de criseno ($85,7\% \pm 6,4\%$) usado como padrão no processo. No entanto e de acordo com Song, *et. al.*, 2002, as taxas de recuperação de fenantreno foram calculadas em $76,4\% \pm 7,3\%$ e as de pireno em $84,9\% \pm 6,2\%$, o que pode alterar os resultados apresentados, As figuras apresentadas neste ponto são a representação gráfica dos resultados do tratamento estatístico desses dados.

3.5.1 BIOESTIMULAÇÃO

Na figura 3.02 estão representados os resultados relativos à degradação de pireno obtidos a partir de experiências com várias concentrações do hidrocarboneto (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), em condições de bioestimulação, com a taxa de remoção média a variar entre os 47% e os 18%, dentro dos valores obtidos por Koshlaf, 2019 aos 28 dias (26%). Numa primeira abordagem denota-se uma diminuição da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial, diminuição esta mais pronunciada nas concentrações mais elevadas (200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo).

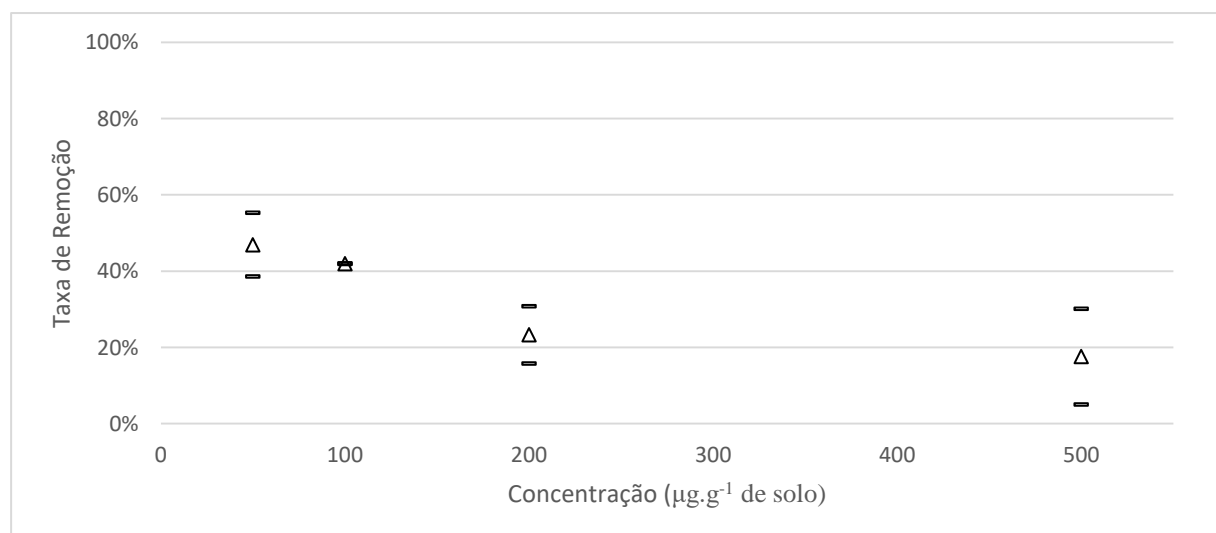


Figura 3.02 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido estéril.

Na figura 3.03 estão representados os resultados de degradação de fenantreno obtidos em experiências com várias concentrações da molécula (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), com taxa de remoção média a variar entre os 95% e os 87%, muito superior aos 36% obtidos por Koshlaf, 2019 aos 28 dias. Tal como com o pireno, denota-se uma diminuição da taxa de remoção com o aumento da

concentração inicial, diminuição esta mais pronunciada na concentração mais elevada (500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo).

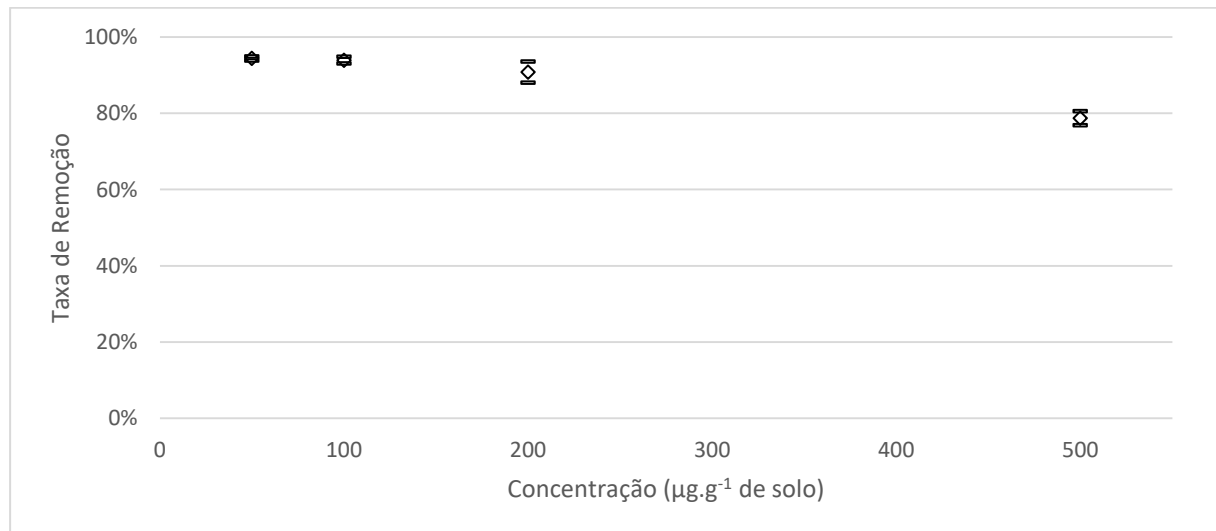


Figura 3.03 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido estéril.

3.5.2

BIOAUMENTAÇÃO A

Os resultados relativos à degradação de pireno durante a experiência de bioaumentação A estão representados na figura 3.04. Estes foram obtidos com várias concentrações de pireno (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), atingindo-se taxas de remoção médias a variarem entre os 38% e os 18%, taxas semelhantes às obtidas por Yu,2005 (20%). Denota-se uma diminuição da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial, diminuição esta mais pronunciada nas concentrações mais elevadas (200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo).

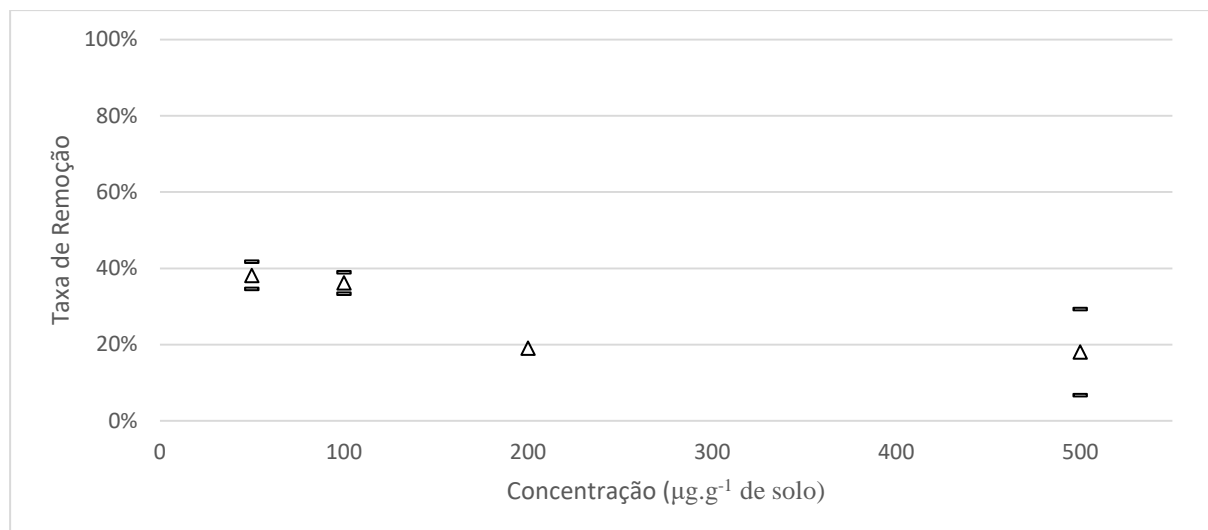


Figura 3.04 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas, com exceção do valor para concentração inicial de pireno de 200 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo na qual a amostra C3.13/A foi rejeitada) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana total de $1,45 \cdot 10^7 (\pm 10)$ UFC.g⁻¹ de solo

Na figura 3.05 são apresentados os resultados relativos à degradação de fenantreno em condições de bioaugmentação, obtidos com várias concentrações iniciais do poluente (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), com taxa de remoção média a variar entre os 90% e os 74%, taxas mais elevadas que as obtidas por Rabodonirina, 2019 aos 22 dias (80%). Regista-se uma diminuição da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial, diminuição esta mais pronunciada nas concentrações mais elevadas (200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo).

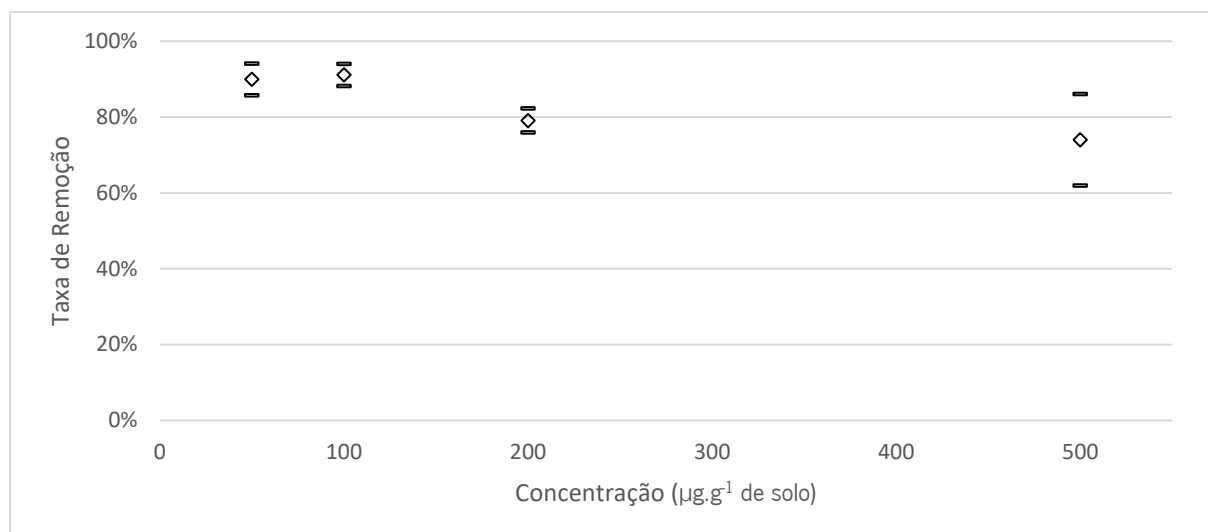


Figura 3.05 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de R2A líquido. Carga microbiana total de $1,45 \cdot 10^7 (\pm 10)$ UFC.g⁻¹ de solo

3.5.3 BIOAUMENTAÇÃO B

Na figura 3.06 estão representados os resultados de degradação de pireno durante a experiência de bioaumentação B, obtidos a partir de concentrações variáveis de pireno (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), atingindo-se uma taxa de remoção média a variar entre os 43% e os 14%, taxas semelhantes às obtidas por Yu,2005 (20%). Como nos ensaios anteriores, denota-se uma diminuição da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial, diminuição esta mais pronunciada nas concentrações mais elevadas (200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo).

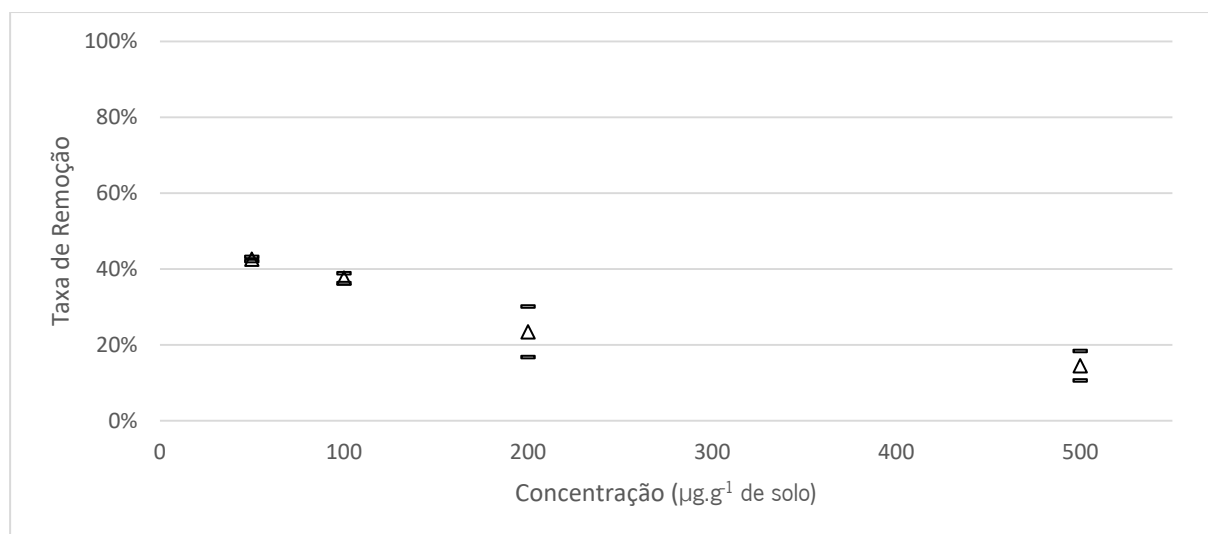


Figura 3.06 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana de $5,5 \cdot 10^6 (\pm 10)$ UFC.g⁻¹ de solo.

A figura 3.07 apresenta os resultados relativos à degradação de fenantreno, a partir de concentrações iniciais crescentes (50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de solo), com taxa de remoção média entre os 84% e os 63%, taxas semelhantes às obtidas por Rabodonirina, 2019 aos 22 dias (80%). Confirma-se a diminuição da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial.

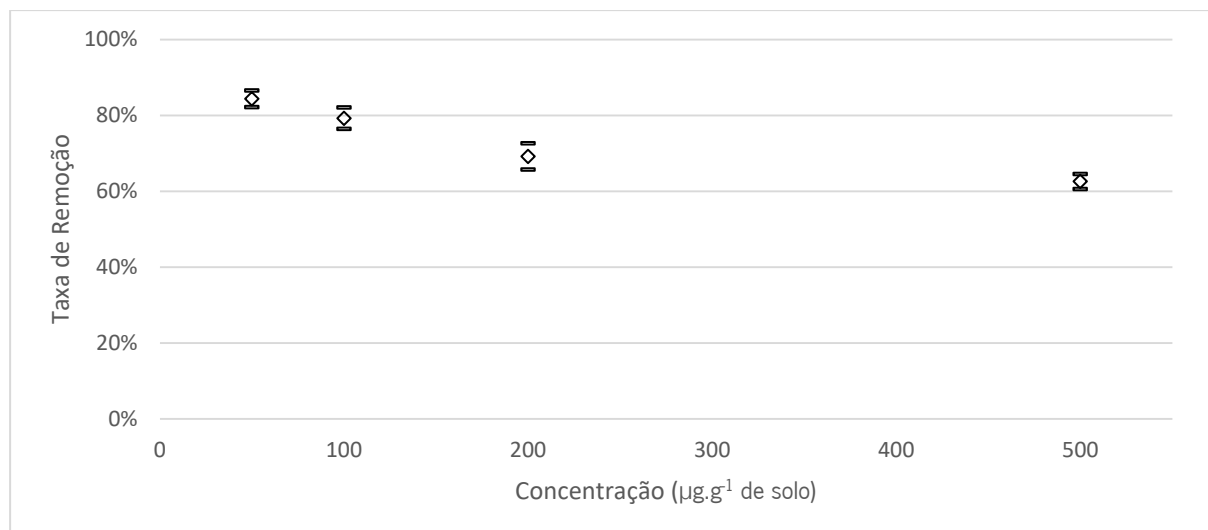


Figura 3.07 – Taxa de remoção média de fenantreno (◊) e desvio padrão (-) (duas réplicas) após 21 dias com adição de 20 ml de R2A líquido. Carga microbiana de $5,5 \cdot 10^6$ ($\times 10$)UFC.g⁻¹ de solo.

3.6. VALIDAÇÃO DE HIPÓTESES

A decisão de analisar os resultados amostrais agrupados de acordo com o definido inicialmente (Bioestimulação, Bioaugmentação A e Bioaugmentação B) depende de se os mesmos diferem realmente entre si ou se a diferença detetada depende unicamente da variabilidade das médias amostrais. Assim de modo validar ou rejeitar a diferença estatística dos dados amostrais estes foram submetidos a um teste de hipótese adequado à sua natureza. Os testes de hipóteses são ferramentas estatísticas de apoio à decisão muito importantes e valiosas. Da variedade de testes existentes decidiu-se pela submissão dos dados amostrais ao teste Mann-Whitney (não paramétrico) por ser o que mais se aplica à sua natureza (amostras pequenas, distribuição desconhecida, desconhecimento de parâmetros populacionais como a média e a variância) (Reis *et al.*, 2019). Foram assim testadas (para uma significância de 10%) as hipóteses H_0 : As amostras seguem a mesma distribuição e H_1 : Uma das amostras segue uma distribuição maior que a outra, para cada um dos pares de amostras possíveis por cada um dos contaminantes.

Tabela 3.03 – Teste de Mann-Whitney com a região de aceitação da hipótese nula (H_0) a ser obtida através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=8$ e $n_p=8$ para os pares em testes dos ensaios ao fenantreno. Para os ensaios de pireno para os pares Bioestimulação/Bioaumentação A e Bioaumentação A/Bioaumentação B foram obtidos através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=7$ e $n_p=8$ e o par Bioestimulação/Bioaumentação B através da tabela de quatis de Mann-Whitney $\alpha=0,10; n_f=8$ e $n_p=8$.

	Fenantreno	Região de Aceitação	Pireno	Região de Aceitação
Bioestimulação/ Bioaumentação A	$r_{BIOE,F}=81,5$ $r_{BIOAA,F}=54,5$]56;80[$r_{BIOE,P}=68$ $r_{BIOAA,P}=51,5$]45;67[
Bioestimulação/ Bioaumentação B	$r_{BIOE,F}=94$ $r_{BIOAB,F}=42$]56;80[$r_{BIOE,P}=71$ $r_{BIOAB,P}=65$]56;80[
Bioaumentação A/ Bioaumentação B	$r_{BIOAA,F}=85,5$ $r_{BIOAB,F}=50,5$]56;80[$r_{BIOAA,P}=54$ $r_{BIOAB,P}=66$]45;67[

De acordo com os resultados obtidos do teste de Mann-Whitney para o caso do fenantreno, existem diferenças significativas entre os dados quando estes são agrupados de acordo com a hipótese inicial (Bioestimulação, Bioaumentação A e Bioaumentação B), existe sempre um valor da estatística de teste r dos elementos dos pares analisados que se encontra fora da região de aceitação da hipótese inicial de que as amostras seguem a mesma distribuição, levando a que esta seja rejeitada, concluindo-se que a diferença entre os ensaios não se devem á variabilidade das médias amostrais.

Quando comparados os dados amostrais dos ensaios relativos ao à biodegradação de pireno, os dados são mais heterógenos, de acordo com a estatística de teste r , a diferença, quando comparados os dados amostrais da bioestimulação e bioaumentação A, rejeita-se a hipótese H_0 de que ambas partilham a mesma distribuição uma vez que esta se encontra fora do intervalo correspondente à região de aceitação. Quando comparados os outros ensaios o mesmo não acontece. No caso da comparação entre os ensaios de bioestimulação e bioaumentação B a estatísticas de testes são da mesma ordem de grandeza e dentro da região de aceitação da hipótese nula de que ambos compartilham a mesma distribuição. O mesmo acontece quando comparados os ensaios de bioaumentação A e bioaumentação B, no entanto as estatísticas de testes destes diferem em maior grau e a proximidade da estatística de teste r para a bioaumentação B aproxima-se do limite superior do intervalo de aceitação indicando a existência de uma variabilidade entre estes que pode não ser exclusivamente da variabilidade das médias amostrais.

Com base nestes dados decidiu-se que, para o tratamento dos dados amostrais, estes seriam agrupados da forma inicialmente proposta. Bioestimulação, Bioaumentação A e Bioaumentação B para cada uma das linhas de poluentes (pireno e fenantreno).

3.7. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE REMOÇÃO

Definiu-se uma função logarítmica ($TR_{PAH} = -m \cdot \ln ([PAH]_{inicial}) + b$) para cada um dos consórcios microbianos utilizados (Bioestimulação, Bioaumentação A e Bioaumentação B) por regressão linear, utilizando-se o Microsoft® Excel®. Esta função relaciona a taxa de remoção do poluente com a sua concentração final, para um período de 21 dias.

Tabela 3.04 – Equações de ajuste obtidas por regressão linear da variação da taxa de remoção com o aumento da concentração inicial de pireno para cada uma das diferentes cargas microbianas consideradas

	$TR_{Pireno} = -m \cdot \ln ([PYR]_{inicial}) + b$	R^2	Concentração inicial $\mu\text{g. g}^{-1}$
Bioestimulação	$TR_{Pireno} = -0,139 \cdot \ln ([PYR]_{inicial}) + 1.0189$	0,9246	[50-500]
Bioaumentação A	$TR_{Pireno} = -0,100 \cdot \ln ([PYR]_{inicial}) + 0,7784$	0,8316	[50-500]
Bioaumentação B	$TR_{Pireno} = -0,129 \cdot \ln ([PYR]_{inicial}) + 0,9419$	0,9698	[50-500]

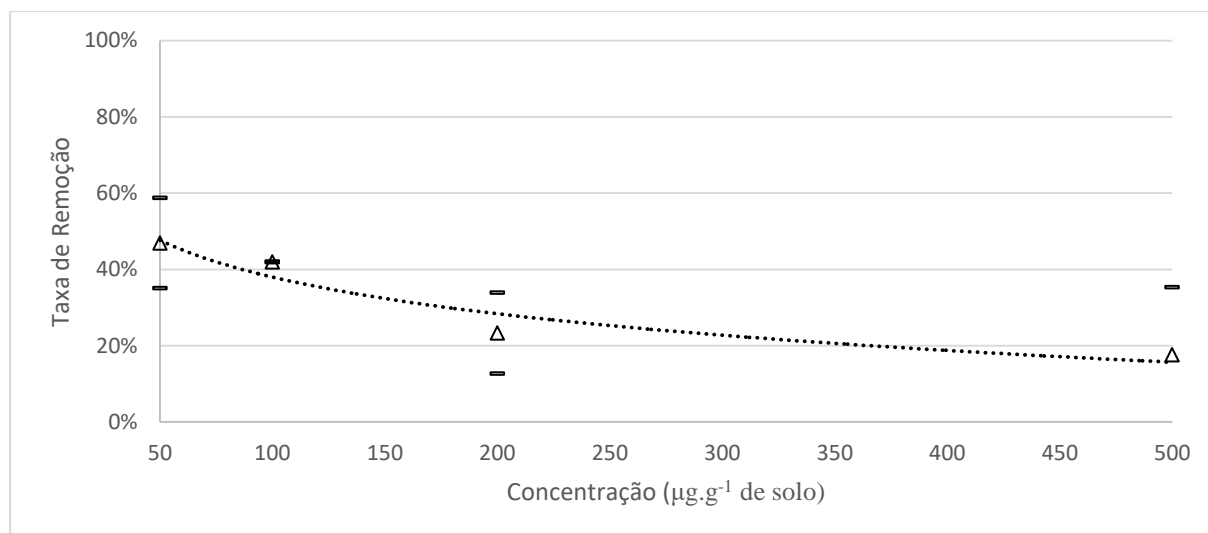


Figura 3.08 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioestimulação e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{Pireno} = -0,139 \cdot \ln ([PYR]_{inicial}) + 1.0189$ $R^2=0,9246$ (.....).

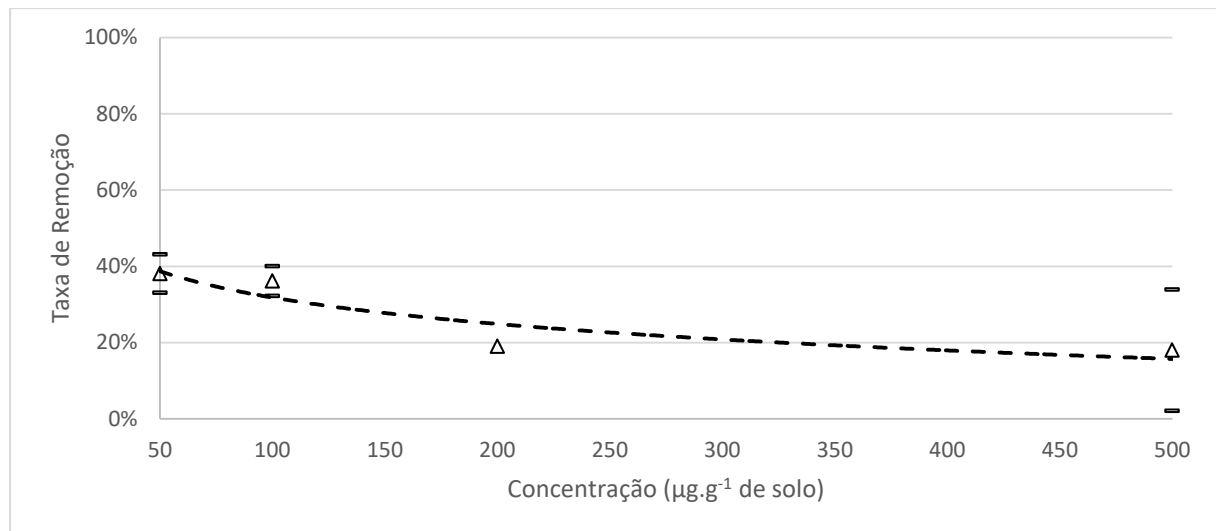


Figura 3.09 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioaumentação A e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{Pireno} = -0,100 * \ln ([PYR]_{inicial}) + 0,7784$, $R^2=0,8316$ (-----).

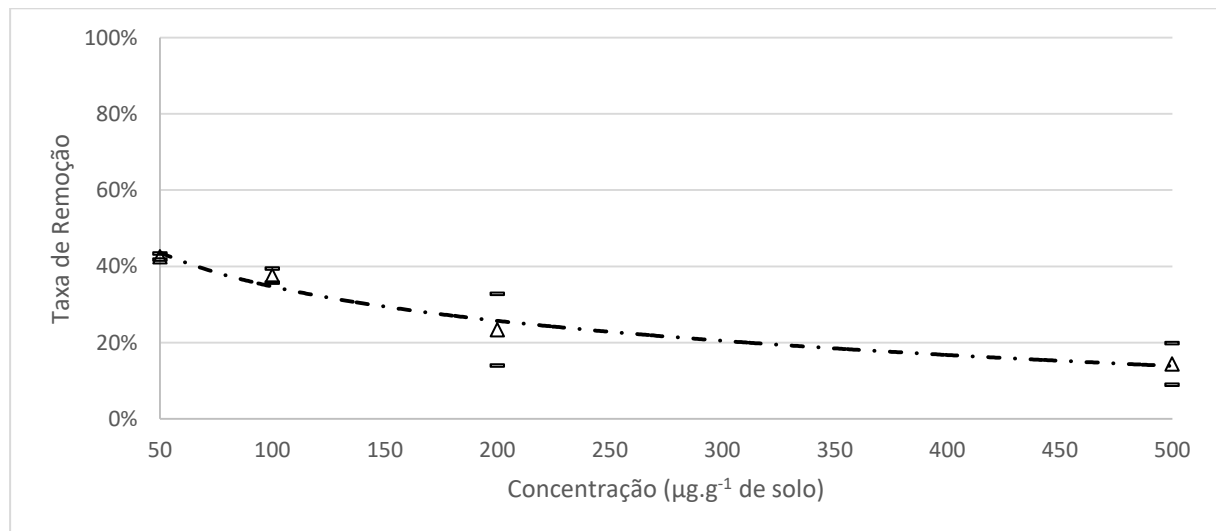


Figura 3.10 – Taxa de remoção média de pireno (Δ) no ensaio de bioaumentação B e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{Pireno} = -0,129 * \ln ([PYR]_{inicial}) + 0,9419$, $R^2=0,9698$ (- · - ·).

Tabela 3.05 – Equações da função de ajuste obtidas por regressão linear da variação da taxa de remoção com a variação da concentração inicial de fenantreno, para cada uma das diferentes cargas microbianas consideradas

	$TR_{Fenantreno} = -m * \ln ([PHE]_{inicial}) + b$	R^2	Concentração inicial $\mu g \cdot g^{-1}$
Bioestimulação	$TR_{Fenantreno} = -0,068 * \ln [PHE]_{inicial} + 1,2355$	0,8349	[50-500]
Bioaumentação A	$TR_{Fenantreno} = -0,079 * \ln [PHE]_{inicial} + 1,2286$	0,8610	[50-500]
Bioaumentação B	$TR_{Fenantreno} = -0,099 * \ln [PHE]_{inicial} + 1,2326$	0,9807	[50-500]

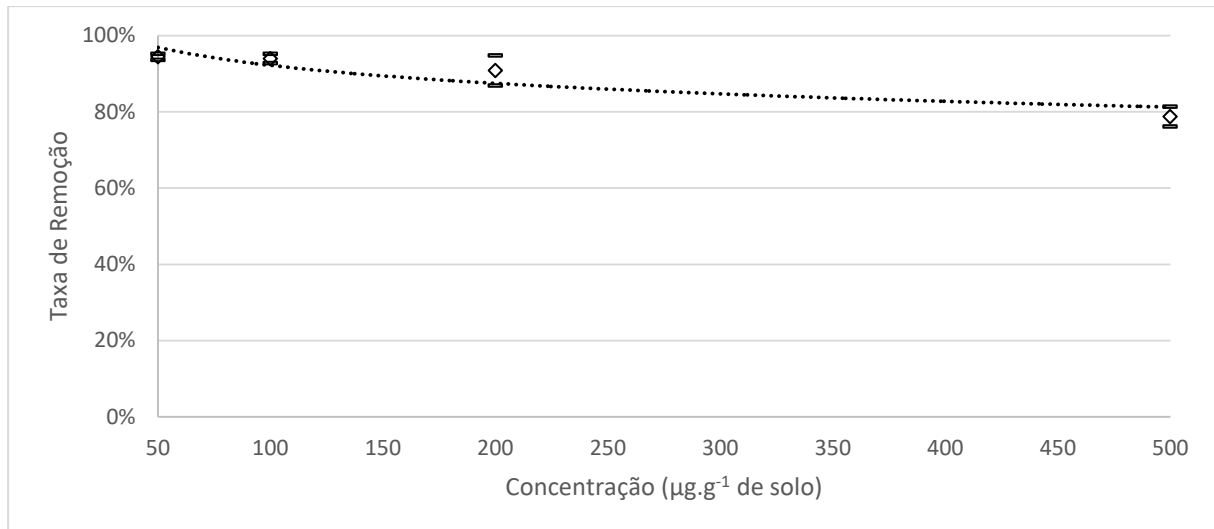


Figura 3.11 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) no ensaio de bioestimulação e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,068 \cdot \ln [PHE]_{\text{inicial}} + 1,2355$ $R^2=0,8349$ (.....).

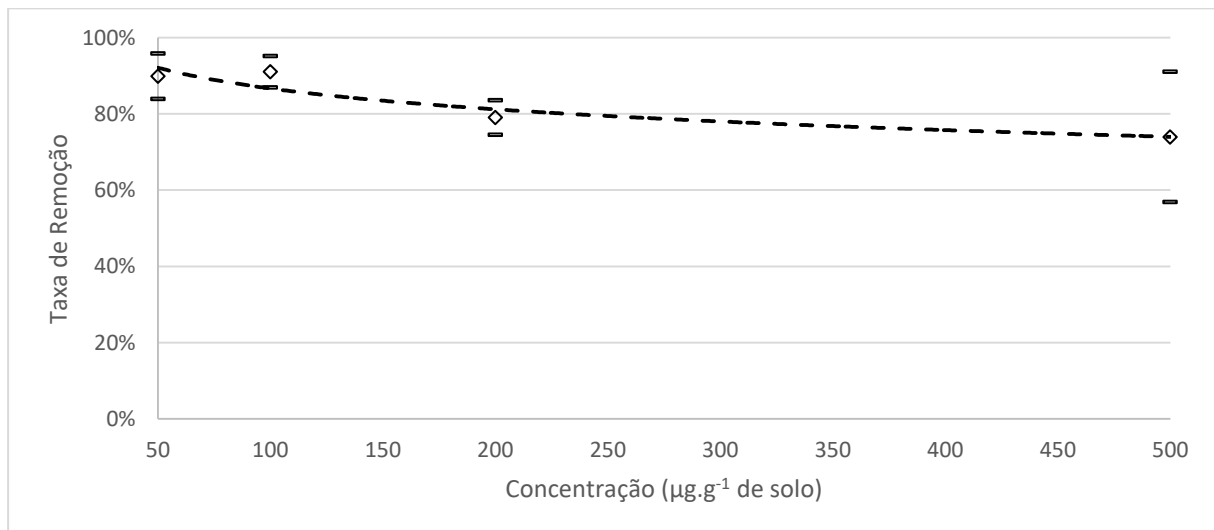


Figura 3.12 – Taxa de remoção média de fenantreno (\diamond) no ensaio de bioaumentação A e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,079 \cdot \ln [PHE]_{\text{inicial}} + 1,2286$, $R^2=0,8610$ (- - - - -).

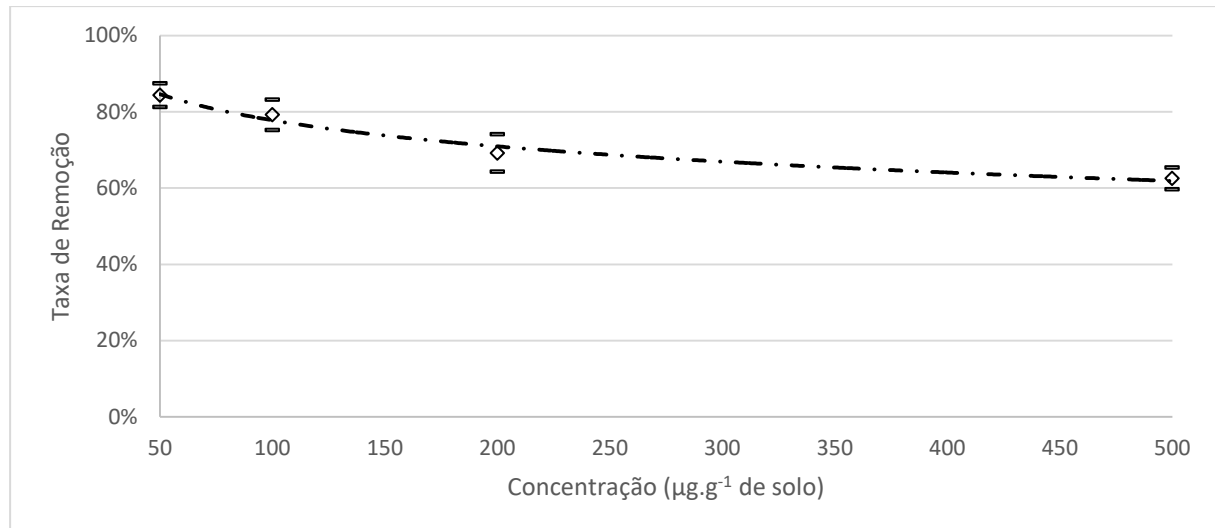


Figura 3.13 – Taxa de remoção média de fenantreno (◊) no ensaio de bioaumentação B e desvio padrão (-) após 21 dias, com representação da função de ajuste ao conjunto de dados experimentais: $TR_{\text{Fenantreno}} = -0,099 \cdot \ln[\text{PHE}]_{\text{inicial}} + 1,2326$, $R^2=0,9807$ (— · — ·).

As funções modeladoras dos ensaios apresentam uma tendência semelhante de diminuição da taxa de remoção efetiva inversamente proporcional à complexidade do microbioma do solo, em ambos os poluentes. Embora em ordens de grandeza diferentes, a taxa de remoção de fenantreno na ordem dos 85% e a de pireno na ordem dos 25%, em ambos os poluentes as taxas de remoção assumem comportamentos semelhantes de acordo com a carga microbiana.

Assim, o ensaio de bioestimulação apresenta-se como o mais eficiente na remoção de PAH e a taxa de remoção mais baixa é apresentada pelo ensaio de bioaumentação B, em todo o espectro de concentrações de PAH analisado. Com um comportamento intermédio em relação a estes, encontra-se o ensaio bioaumentação A no qual foi utilizado o consórcio microbiano selecionado e utilizado no ensaio bioaumentação B, adicionado ao microbioma nativo.

Como tendência, alterações ao consórcio microbiológico nativo não aumentam a eficiência da degradação, ao final de 21 dias.

Embora a taxa de degradação diminua quando se altera a composição do microbioma, verifica-se uma diminuição do desvio padrão e um aumento do coeficiente de determinação (R^2) das funções que melhor representam os dados experimentais, o que indica uma maior consistência de dados.

3.8. CONSTANTES DE DEGRADAÇÃO MÉDIA

Foi determinada a constante de degradação média para os ensaios envolvendo pireno em cada um dos ensaios utilizando a equação (18), que se encontra na tabela 3.06 juntamente com o respetivo desvio padrão.

Tabela 3.06 – Constantes de degradação de pireno, definidas por linha de experiência.

	\bar{k}_{Pireno} (dias ⁻¹)
Bioestimulação	0,0198±0,0105
Bioaumentação A	0,0146±0,0092
Bioaumentação B	0,0173±0,0079

Na aplicação da equação (17) uma vez que iremos analisar conjuntamente várias concentrações iniciais de poluente recorreu-se à transformação em % da concentração inicial de modo a que seja possível a utilização conjunta.

$$[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,0198 \pm 0,0105 * t} \quad (19)$$

$$[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,0146 \pm 0,0092 * t} \quad (20)$$

$$[\text{PYR}]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,0173 \pm 0,0079 * t} \quad (21)$$

Uma vez que os dados utilizados se referem apenas aos obtidos após 21 dias de ensaio, os resultados apresentados apenas contemplam valores entre os 18 e os 24 dias de modo a que o erro da extrapolação seja o menor possível. Estas podem ser utilizadas para valores diferentes deste intervalo mas para isso seria necessário ensaios adicionais para verificar a validade da mesma para valores mais distantes de t=21 dias. Nos gráficos seguintes as equações (19) a (24) estão representadas pelo limite superior e inferior do desvio padrão amostral do cálculo da constante de degradação

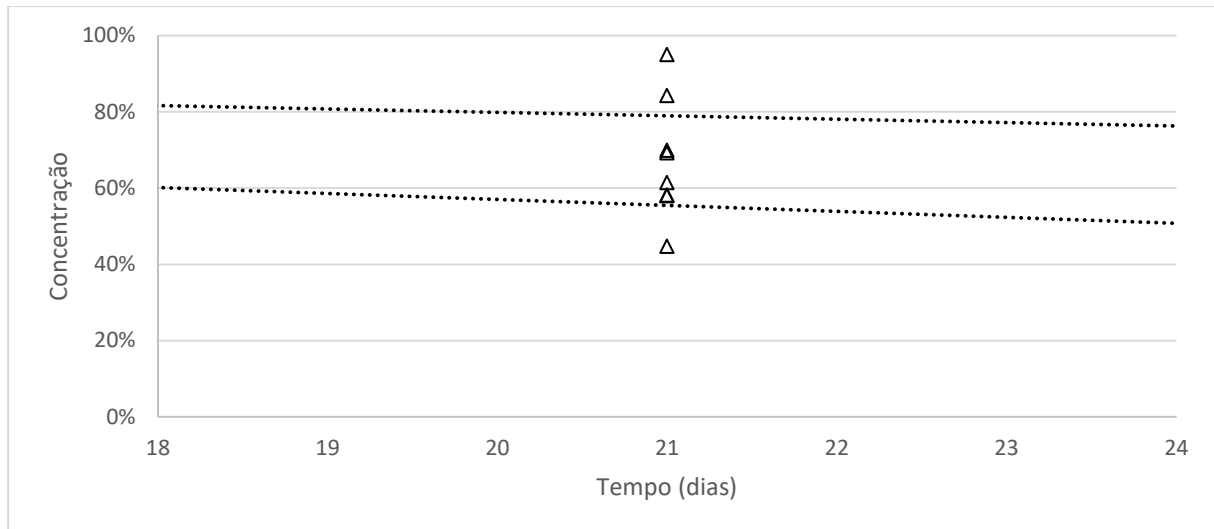


Figura 3.14 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioestimulação ao final de 21 dias, com a função $[PYR]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{-0,0198 \pm 0,0109} t$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

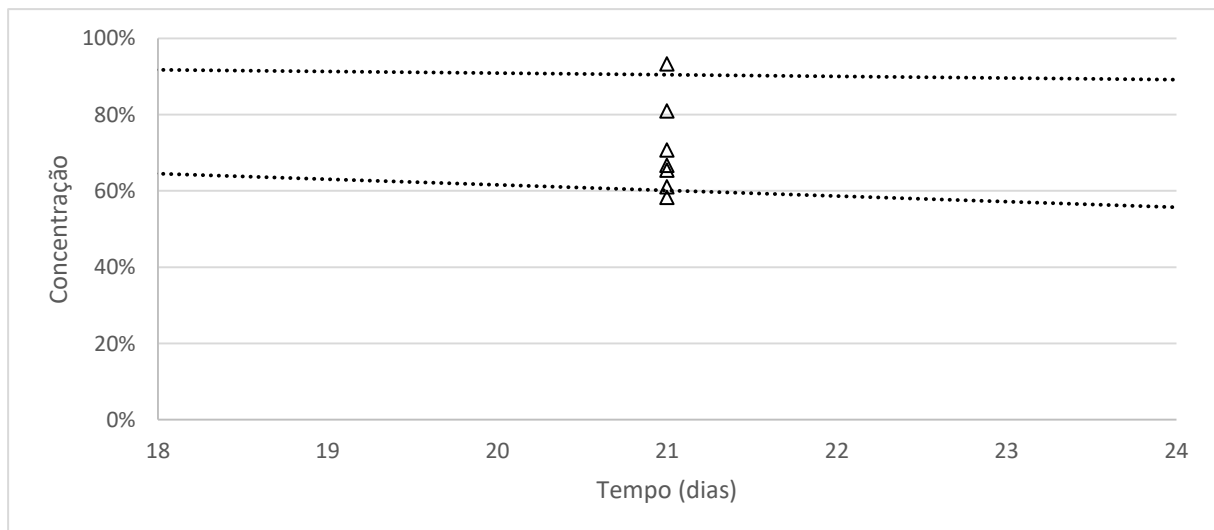


Figura 3.15 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioaumentação A aos 21 dias, com a função $[PYR]_{\text{final}} = 100 \cdot e^{-0,0146 \pm 0,0092} t$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

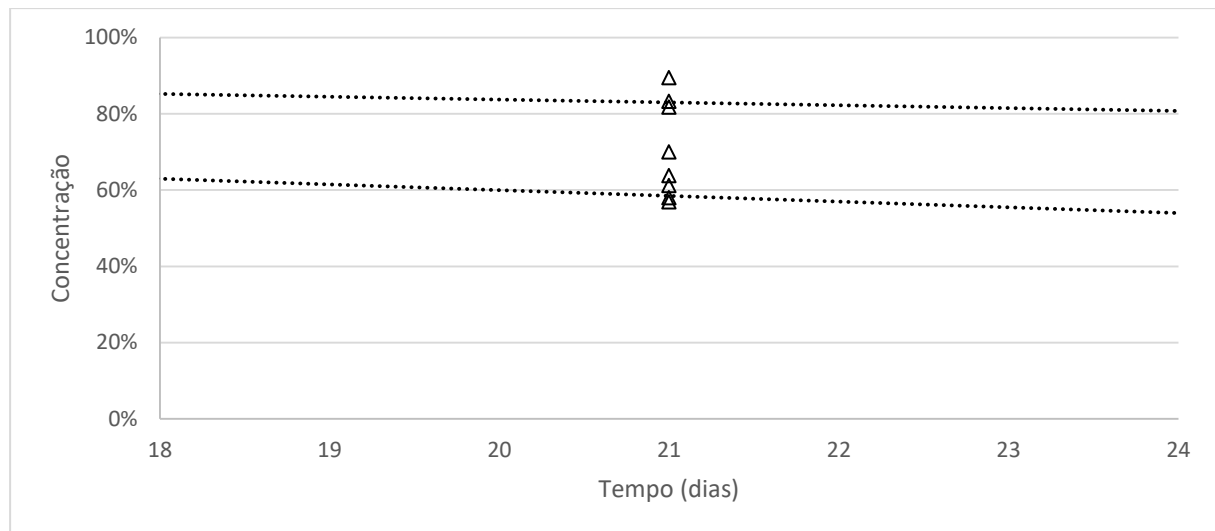


Figura 3.16 – Concentração média de pireno (Δ) em % do valor inicial, no ensaio de bioaumentação B aos 21 dias, com a função $[PHE]_{\text{final}} = 100 * e^{-(0,0173 \pm 0,0079) * t}$ (.....), para valores t [18 - 24] dias.

De modo análogo ao realizado para os ensaios de degradação de pireno foi determinada a constante de degradação média para o fenantreno em cada uma das linhas de biodegradação consideradas, utilizando a equação (18). Estas encontram-se na tabela 3.07 juntamente com o respetivo desvio padrão.

Tabela 3.07 – Constantes de degradação de fenantreno, definidas por linha de experiência.

	$\bar{k}_{\text{fenantreno}}$ (dias ⁻¹)
Bioestimulação	0,1152±0,0285
Bioaumentação A	0,0939±0,0303
Bioaumentação B	0,0668±0,0184

Aplicando a equação (17) aos resultados dos ensaios ao fenantreno obtemos as seguintes equações:

$$[PHE]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,1152 \pm 0,0285 * t} \quad (22)$$

$$[PHE]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,0939 \pm 0,0303 * t} \quad (23)$$

$$[PHE]_{\text{final}} = 100 * e^{-0,0668 \pm 0,0184 * t} \quad (24)$$

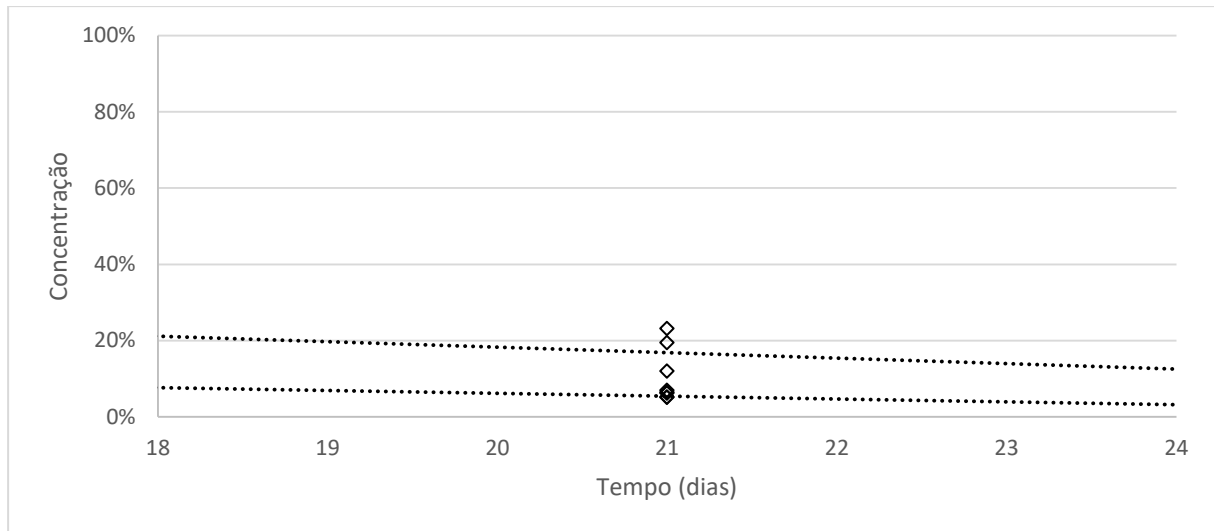


Figura 3.17 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioestimulação ao final de 21 dias, com a função $[PHE]_{final} = 100 * e^{(0.1152 \pm 0.0285) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

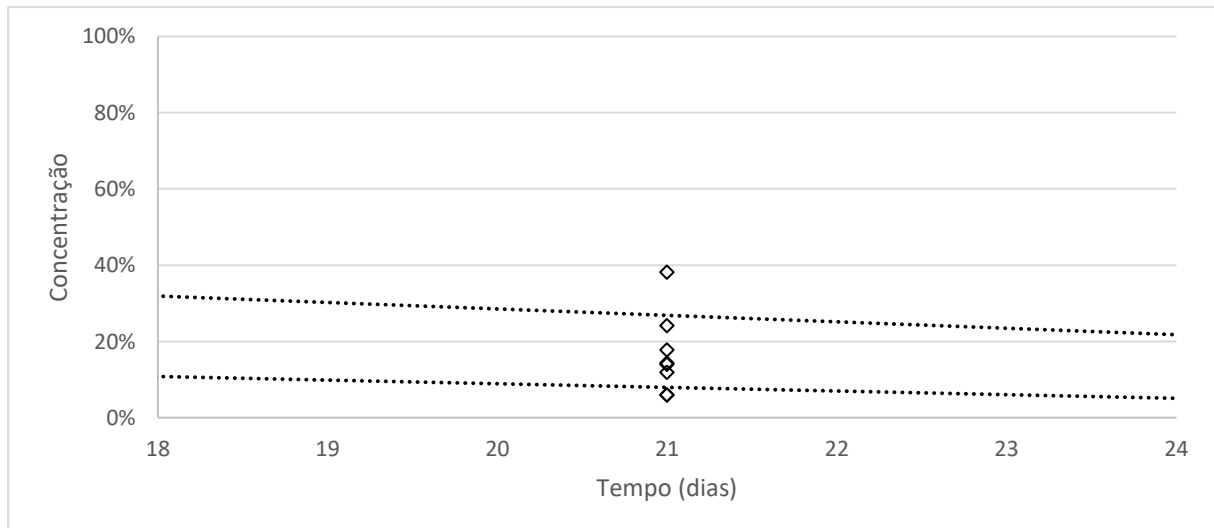


Figura 3.18 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioaumentação A aos 21 dias, com a função $[PHE]_{final} = 100 * e^{(0.0939 \pm 0.0303) t}$ (.....) para valores t [18 - 24] dias.

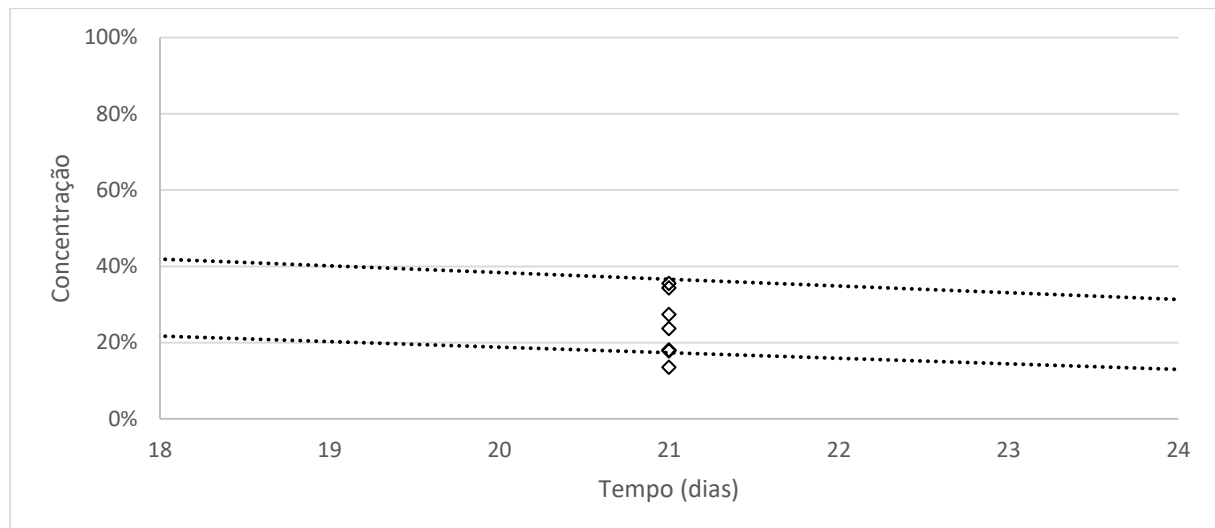


Figura 3.19 – Concentração média de fenantreno (\diamond), em % do valor inicial, no ensaio de bioaumentação B aos 21 dias, com a função $[PHE]_{\text{final}} = 100 * e^{(0,0669 \pm 0,0184) t}$ (.....), para valores t [18 - 24] dias.

Ambos os poluentes apresentam a mesma tendência, os melhores resultados de degradação foram obtidos pelos ensaios de bioestimulação, com o consórcio microbiano nativo estimulado com R2A. Já a menor taxa de degradação é conseguida pela de bioaumentação B, com utilização do consórcio microbiano selecionado. A linha de bioaumentação A, na qual foram utilizados o consórcio nativo e o consórcio selecionado apresenta, valores médios entre as duas anteriores.

3.9. IMPACTO DAS ALTERAÇÕES DE CARGA MICROBIANA NA TAXA DE DEGRADAÇÃO

Dos dados anteriores há dois factos a destacar. Por um lado, a alteração do consórcio microbiano nativo provoca uma diminuição, mesmo que ligeira, das taxas de remoção dos poluentes. Por outro, há uma tendência para os dados obtidos se tornarem mais homogêneos à medida que o controlo (embora limitado pela não caracterização qualitativa) do consórcio microbiano aumenta.

Para atestar a qualidade dos dados foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau da correlação e a direção dessa correlação entre duas variáveis ($TR_{\text{Fenantreno}}$ e TR_{Pireno}) e para tal foi utilizado o Excel® da Microsoft®, agrupando os dados de acordo com o consórcio microbiano utilizado (Bioestimulação, Bioaugmentação A e Bioaugmentação B) que reportam os valores de concentração final ao fim de 21 dias. Os dados obtidos desta análise encontram-se representados na figura 3.20 e estão sumarizados na tabela 3.08.

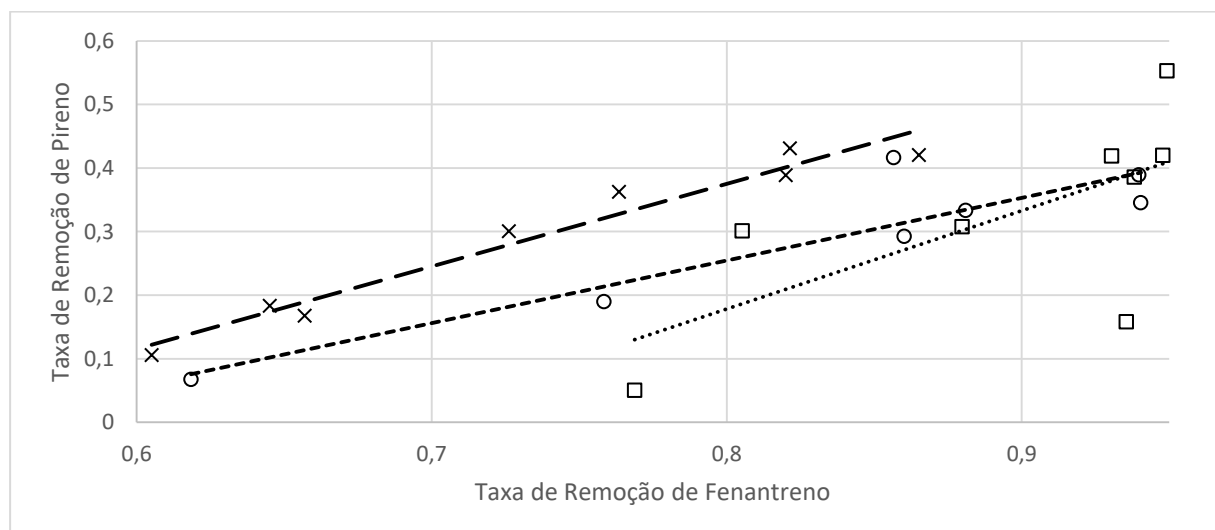


Figura 3.20 – Retas de Correlação de Pearson para os pares ($TR_{\text{Fenantreno}}$; TR_{Pireno}), ao final de 21 dias das experiências: bioestimulação (.....); bioaugmentação A (- - - -) e bioaugmentação B (- · - ·).

Tabela 3.08 – Análise de correlação dos pares ($TR_{\text{Fenantreno}}$ e TR_{Pireno})

	Coefficiente de Correlação de Pearson
Bioestimulação	0,6832
Bioaugmentação A	0,9153
Bioaugmentação B	0,9775

Desta análise sobressai que o coeficiente de correlação de Pearson, entre as variáveis TR_{Pireno} e $TR_{\text{Fenantreno}}$, aumenta de forma significativa quando o controlo sobre os consórcios microbianos aumenta.

O maior coeficiente de correlação ($R=0,9775$) entre as taxas de degradação do pireno e fenantreno nos ensaios onde apenas se utilizou um consórcio microbiano com origem no microbioma nativo (depois

deste ter sido sujeito a técnicas de seleção de microrganismos através de crescimentos sucessivos em meio mineral onde a única fonte de carbono disponível eram os contaminantes aqui estudados), indica que este processo de seleção de consórcios microbianos são úteis para estudos similares e aplicações em scale-up.

O ensaio de bioestimulação apresenta a maior taxa de remoção para cada um dos contaminantes testados de entre as três linhas de ensaio realizadas, mas os seus resultados são os de menor consistência, com maior desvio padrão e com o menor coeficiente de correlação.

O ensaio de bioaugmentação B, no qual foi utilizado unicamente o consórcio microbiológico selecionado, apresenta a menor taxa de remoção de contaminantes, mas os resultados obtidos são os que mais consistência estatística.

Com taxas de remoção intermédias a estes dois últimos, o ensaio de bioaugmentação A, no qual foi usado o consórcio microbiológico nativo e o consórcio microbiológico selecionado, apresenta resultados que se aproximam à média dos dois anteriores.

Estes dados encorajam a seleção de consórcios microbiológicos a partir de microbiomas nativos de solos, para estudos mais detalhados e as espécies integrantes desses consórcios deverão ser estudadas individualmente quanto à sua capacidade de degradação de cada um destes poluentes.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O trabalho visou demonstrar a existência no microbioma nativo de um determinado solo, de espécies ou de consórcios capazes de degradar um conjunto específico de poluentes (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos). Tal foi demonstrado nos ensaios realizados, sem que, no entanto, as referidas espécies ou consórcios tenham sido identificados.

Foi possível definir funções de ajuste aos dados experimentais que, nas condições descritas, para este tipo de solo específico e limitados a um intervalo de tempo e de gamas de concentração, modelam o comportamento da taxa de degradação com a da concentração inicial do PAH e uma outra que define o comportamento dessa mesma taxa com o tempo.

As taxas de degradação do pireno e do fenantreno foram menores, embora da mesma ordem de grandeza, quando o consórcio microbiano utilizado foi o nativo (bioestimulação) em comparação com o selecionado (bioaugmentação B). No entanto, a correlação entre as duas variáveis indica uma maior correlação estatística quando o consórcio microbiano utilizado foi o selecionado (bioaugmentação B)

A amostra de solo utilizada foi obtida numa zona de agricultura intensiva e na proximidade de grandes vias de comunicação, pelo que era de prever a presença de contaminantes PAH, o que não se observou. Uma vez que ficou demonstrada a existência de espécies ou conjuntos de espécies que degradam os PAH, tal poderá ser a razão pela qual não foram detetados nas amostras.

Os resultados apresentados possibilitam e encorajam linhas de investigação que podem ser exploradas, entre elas:

- Estudos de cinéticos e termodinâmicos de degradação definida para períodos de tempo mais longos, para entendimento dos processos históricos de acumulação e degradação de contaminantes em solos
- Isolamento e identificação da(s) espécie(s) obtidas por seleção com avaliação da sua capacidade individual de degradar PAH;
- Aplicação destes métodos de bioreabilitação a diferentes solos, com matrizes estruturais e composição diferentes de e determinar a influência dessas propriedades na biodegradação;
- Aplicação dos métodos de seleção a outros poluentes orgânicos;
- Utilização de solos de zonas com contaminações históricas de PAH, tomando vantagem da capacidade de especialização dos microrganismos quando sujeitos por longos períodos de tempo a situações extremas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acimovic, D.D., Zeljka M. N., Milos S. T., Dubravka S. M., Vladimir M. N., Tanja P. B., Milica P. M-K., Validation and uncertainty estimation of UPLC-PDA method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in concrete, *Journal of Hazardous Materials* 325: 271-278, (2017)
doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.008
- Albanese, S., De Vivo, B., Lima, A. & Cicchella, D., Geochemical background and baseline values of toxic elements in stream sediments of Campania region (Italy). *Journal of Geochemical Exploration* 93(1): 21–34, (2017)
doi.org/10.1016/j.gexplo.2006.07.006
- Alexander, M., *Biodegradation and Bioremediation*, 2nd ed., Academic Press, US, (1999)
ISBN: 9781483299754
- Alloway, B.J., *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Third edition. Environmental Pollution, Springer Netherlands, (2013)
www.springer.com/gp/book/9789400744691
- Araújo, P.H.H., Sayer, C., Giudici, R. & Poço, J.G.R.. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: A review: Techniques for Reducing Residual Monomer Content. *Polymer Engineering & Science*, 42(7): 1442–1468, (2002)
doi.org/10.1002/pen.11043
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M. & Benfenati, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environmental Research*, 111(4): 603–613, (2011)
doi.org/10.1016/j.envres.2011.01.015
- Barba-Gutiérrez, Y., Adenso-Díaz, B. & Hopp, M.. An analysis of some environmental consequences of European electrical and electronic waste regulation. *Resources, Conservation & Recycling*, 3(52): 481–495, (2008)
doi.org/10.1016/j.resconrec.2007.06.002
- Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., Morel, J.L.. Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment. *Sci. Tot. Environ.* 470:639-645, (2014)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.032
- Basile, B.P., Middleditch, B.S. & Oró, J.. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Organic Geochemistry*, 5(4): 211–216, (1984)
doi.org/10.1016/0146-6380(84)90008-1
- Björnsdotter, M.. Leaching of residual monomers, oligomers and additives from polyethylene, polypropylene, polyvinyl chloride, high-density polyethylene and polystyrene virgin plastics. Örebro University, (2015)
www.divaportal.org/smash/get/diva2:855478/FULLTEXT01.pdf
- Bone, J., Head, M., Barraclough, D., Archer, M., Scheib, C., Flight, D., Voulvoulis, N., Soil quality assessment under emerging regulatory requirements, *Environment International* 36: 609-622, (2010)
doi.org/10.1016/j.envint.2010.04.010
- Brady e Weil, *Elements of the Nature and Properties of Soils*, 4th Edition, Pearson (2019)
- Brammer, H. & Nachtergaele, F.O. Implications of soil complexity for environmental monitoring. *International Journal of Environmental Studies*, 72(1): 56-73, (2015)
doi.org/10.1080/00207233.2014.967509

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. & Thompson, R.C.. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental Science & Technology*, 42(13): 5026–5031, (2008) doi.org/10.1021/es800249a

Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.-S., Liu, C.-W., López, D., Armienta, M.A., Guilherme, L.R.G., Cuevas, A.G., Cornejo, L., Cumbal, L. & Toujaguez, R.. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *The Science of the Total Environment*, 429: 2–35, (2012) doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024

Cachada, A., Rocha-Santos, T. and Duarte, A., *Soil and Pollution*, Elsevier, (2018) dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-849873-6.00001-7

Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Becarelli, S., Siracusa, G., Lorenzi, R., Di Gregorio, S., Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L.. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 7930-7941, (2016) doi.org/10.1007/s11356-016-6049-y

Cébron, A., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Leyval, C., Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: consequences on biodegradation. *Environ. Pollut.* 177: 98-105, (2013) doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.043

Chapman, P.M., Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents, *Environ. Int.* 33:492-501, (2007) doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.001

Chen, B.L., Ding, J., Biosorption and biodegradation of phenanthrene and pyrene in sterilized and unsterilized soil slurry systems stimulated by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* 229: 159–169, (2012) doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.090

Comissão Europeia, Estratégia temática de proteção do solo, Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões, Bruxelas, COM 231 final, (2006) eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52006DC0231&from=EN (acedido 25-ABR-2019)

Conte, P., Zena, A., Pilidis, G. & Piccolo, A. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environmental Pollution*, 112(1): 27–31, (2001) doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00101-9

Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Dias, R.L., Del Panno, M.T., Berthe-Corti L., Morelli, I.S., Study of the Degradation Activity and the Strategies to Promote the Bioavailability of Phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006F, *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 59: 266-276, (2010) doi.org/10.1007/s00248-009-9563-3

Cruz, N., Rodrigues, S.M., Coelho, C., Carvalho, L., Duarte, A.C., Pereira, E. & Römkens, P.F.A.M. Urban agriculture in Portugal: Availability of potentially toxic elements for plant uptake. *Applied Geochemistry*, 44: 27–37, (2014) doi.org/10.1016/j.apgeochem.2013.07.003

DEA. Framework for the Management of Contaminated Land. Republic of South Africa, Department of Environmental Affairs, (2010) sawic.environment.gov.za/documents/562.pdf

Deardorff, T., Karch, N. & Holm, S. Dioxin levels in ash and soil generated in Southern California fires. *Organohalogen Compounds*, 70: 2284–2288, (2008) dioxin20xx.org/wp-content/uploads/pdfs/2008/08-857.pdf

Doran, J.W., Zeiss, M.R., Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality, *Applied. Soil Ecology*. 15: 3-11, (2000) doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6

Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J., Megharaj, M., Managing longterm polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-15, (2013)
doi.org/10.1007/s11356-013-2270-0

EC, Commission Regulation No 835/2011. amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic, (2011)
eurlex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R0835&from=EN

EC, Council Directive 96/61/EC of 24 September 1996 concerning integrated pollution prevention and control, (1996)
eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0061:en:HTML

EEA, Progress in management of contaminated sites. European Environment Agency (2014)
www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites/progress-in-management-ofcontaminated-1

EEA, Persistent organic pollutant emissions, (2018)
www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-persistent-organic-pollutant-pop-emissions-1/assessment-9

EFSA. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *The EFSA Journal*, 724: 1–114, (2008)
www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/724

Egner, H., Reihn, H., Domingo, W.R., Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoff-zunstandes, K. Lautbrhogsk. *Annlr* 20:199-216 (1960)

Ehlers, L.J., Luthy, R.G.,Peer reviewed: contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 37: 295A–302A, (2003)
doi.org/10.1021/es032524f

Eman Koshlaf, Esmaeil Shahsavari, Nagalakshmi Haleyr, A. Mark Osborn, Andrew S. Ball, Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbialcommunity of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation, *Geoderma* 338:216-225, (2019)
doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.12.001

FAO & ITPS, Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report, Rome, (2015)
ISBN 978-92-5-109004-6

FAO, World reference base for soil resources 2014 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps, Roma, (2015)

Fester, T., Giebler, J., Wick, L.Y., Schlosser, D., Kästner, M.. Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27: 168–175, (2014)
doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.017

Fonseca, B., Pazos, M., Figueiredo, H., Tavares, T., Sanromán, M.A., Desorption kinetics of phenanthrene and lead from historically contaminated soil, *Chemical Engineering Journal* 167: 84–90 (2011)
doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.004

Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K., Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Journal of Hazardous Materials* 172:532-549, (2009)
doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118

García-Pérez, J., Boldo, E., Ramis, R., Pollán, M., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N. & López-Abente, G. Description of industrial pollution in Spain. *BMC Public Health*, 7(1), (2007)
doi.org/10.1186/1471-2458-7-40

- Gómez, J., Alcántara, M.T., Pazos, M., Sanromán, M.A., Remediation of polluted soil by a two-stage treatment system: desorption of phenanthrene in soil and electrochemical treatment to recover the extraction agent, *J. Hazard. Mater.* 173:794–798, (2010)
doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.103
- Habe, H., Omori, T., Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2):225–243, (2003)
doi.org/10.1271/bbb.67.225
- Hashim, T., Abbas, H., Farid, I., El-Husseiny, O. & Abbas, M. Accumulation of some heavy metals in plants and soils adjacent to Cairo – Alexandria agricultural highway. *Egyptian Journal of Soil Science*, 0: 0–0 (2017)
doi.org/10.21608/ejss.2016.281.1047
- Helmi H., Saoussen B., Levonas M., Isao A., Naceur J., Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions, *Soil Biology & Biochemistry* 39:1926–1935, (2007)
doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.008
- Hoornweg, D. & Bhada-Tata, P. What a waste. A Global review of solid waste management. Knowledge papers. The World Bank, (2012)
documents.worldbank.org/curated/en/302341468126264791/pdf/68135-REVISEDWhat-a-Waste-2012-Final-updated.pdf
- Horckmans, L., Swennen, R., Deckers, J. & Maquil, R. Local background concentrations of trace elements in soils: a case study in the Grand Duchy of Luxembourg. *CATENA*, 59(3): 279–304, (2005)
doi.org/10.1016/j.catena.2004.09.004
- ISO 13859:2014, Soil quality – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), International Standard Organization, (2014)
- Jani M. Salminen, Pirjo M. Tuomi, Anna-Mari Suortti, Kirsten S. Jørgensen, Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface, *Biodegradation* 15:29–39 (2004)
doi.org/10.1023/B:BIOD.0000009954.21526.e8
- Jefatura del Estado. Plan Hidrológico Nacional, (2001)
www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2001-13042
- Jimenez-Sanchez, C., Wick, L.Y., Cantos, M., Ortega-Calvo, J.J., Impact of dissolved organic matter on bacterial tactic motility, attachment, and transport. *Environ. Sci. Technol.* 49: 4498–4505, (2015)
doi.org/10.1021/es5056484
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133: 71–84, (2005)
doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015
- Jong-Su Seo, Young-Soo Keum and Qing X. Li, Bacterial Degradation of Aromatic Compounds, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6: 278- 309, (2009)
doi:10.3390/ijerph6010278
- K.S.H. Yu, A.H.Y. Wong, K.W.Y. Yau, Y.S. Wong, N.F.Y. Tam, Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments, *Marine Pollution Bulletin* 51:1071-1077, (2005)
doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.006
- Keraita, B.N. & Drechsel, P. Agricultural use of untreated urban wastewater in Ghana. In C.A. Scott, N.I. Faruqui & L. Raschid-Sally, eds. *Wastewater use in irrigated agriculture: confronting the livelihood and environmental realities*, Wallingford, CABI, pp. 101–112, (2004)
www.cabi.org/cabebooks/ebook/20043115023

- Kim, E.J., Choi, S.-D. & Chang, Y.-S. Levels and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils after forest fires in South Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(9): 1508–1517, (2011)
doi.org/10.1007/s11356-011-0515-3
- Kim, H.S., Kim, K.-R., Kim, W.-I., Owens, G. & Kim, K.-H. Influence of Road Proximity on the Concentrations of Heavy Metals in Korean Urban Agricultural Soils and Crops. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(2): 260–268, (2017)
doi.org/10.1007/s00244-016-0344-y
- Knappenberger, T., Flury, M., Mattson, E.D., Harsh, J.B., Does water content or flow rate control colloid transport in unsaturated porous media? *Environ. Sci. Technol.* 48: 3791–3799, (2014)
doi.org/10.1021/es404705d
- Kumar, V. & Kothiyal, N.C. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Toxic Equivalency Factor and Related Carcinogenic Potencies in Roadside Soil within a Developing City of Northern India. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 36(4): 506–526, (2016)
doi.org/10.1080/10406638.2015.1026999
- Lerda, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet., p. 34. Belgium, Joint Research Centre, European Commission, (2011)
ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet%20PAH_0.pdf
- Li, A. PAHs in Comets: An Overview. In H.U. Käufel & C. Sterken, eds. *Deep Impact as a World Observatory Event: Synergies in Space, Time, and Wavelength*, pp. 161–175. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, (2009)
link.springer.com/10.1007/978-3-540-76959-0_21
- Li, K., Xing, B.S., Torello, W.A., Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environ. Pollut.* 134: 187–194, (2005)
doi.org/10.1016/j.envpol.2004.08.011
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z., Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. Hazard. Mater.* 150: 21-26, (2008)
doi.org/10.1016/j.pnsc.2007.07.003
- Lima, D.L., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments. *Sci. Total Environ.* 423:120–124, (2012)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.014
- Lin, C., Liu, J., Wang, R., Wang, Y., Huang, B. & Pan, X. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Soils of Kunming, China: Concentrations, Distribution, Sources, and Potential Risk. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22(7): 753–766, (2013)
doi.org/10.1080/15320383.2013.768201
- Lithner, D., Larsson, A. & Dave, G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *The Science of the Total Environment*, 409(18): 3309–3324, (2011)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038
- Luo, Y., Wu, L., Liu, L., Han, C. & Li, Z. Heavy Metal Contamination and Remediation in Asian Agricultural Land. p. 9. Paper presented at MARCO Symposium, Japan, (2009)
- Madueño, L., Coppotelli, B.M., Alvarez, H.M., Morelli, I.S., Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina, *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 345-351, (2011)
doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.008
- Mechlińska, A., Gdaniec-Pietryka, M., Wolska, L., Namieśnik, J., Evolution of models for sorption of PAHs and PCBs on geosorbents. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 28: 466–482, (2009)
doi.org/10.1016/j.trac.2009.01.005

- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environ. Int.* 37:1362–1375, (2011)
doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003
- Miller, J. M. *Chromatography: Concepts and Contrasts*, 2 ed. (2005)
ISBN-13: 978-0470530252, ISBN-10: 0470530251
- Mirsal, I. *Soil Pollution: Origin, Monitoring & Remediation*. Springer Science & Business Media. 310 pp, (2008)
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A., Shimizu, Y., Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5:347-374, (2006)
doi.org/10.1007/s11157-006-0004-1
- Northcott, G.L., Jones, K.C., Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ. Pollut.* 108:19–43, (2000)
doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00199-2
- Ogundele, L.T., Owoade, O.K., Hopke, P.K. & Olise, F.S. Heavy metals in industrially emitted particulate matter in Ile-Ife, Nigeria. *Environmental Research*, 156: 320–325 (2017).
doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.051
- Okere, U.V., Semple, K.T., Biodegradation of PAHs in 'Pristine' soils from different climatic regions. *J. Bioremed. Biodegr.* 1-11, (2011)
doi.org/10.4172/2155-6199.S1-006
- Olatunji, O. M., Horsfall, I.T, Numerical simulation of bioremediation of poly aromatic hydrocarbon polluted soil using MatLab, *International Journal of Advance Research in Engineering and Technology*, Volume 5, Issue 8, 10-25, (2014)
- ONU, Sustainable Development Goals as defined in Transforming Our World - the 2030 Agenda for Sustainable Development, (2015)
sustainabledevelopment.un.org/topics/sustainabledevelopmentgoals
- Paye, H. de S., Mello, J.W.V. de & Melo, S.B. de. Métodos de análise multivariada no estabelecimento de valores de referência de qualidade para elementos-traço em solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36(3): 1031–1042, (2012).
doi.org/10.1590/S0100-06832012000300033
- Perkins, D.N., Brune Drisse, M.-N., Nxele, T. & Sly, P.D. E-Waste: A Global Hazard. *Annals of Global Health*, 80(4): 286–295, (2014)
doi.org/10.1016/j.aogh.2014.10.001
- Pinelli, D., Fava, F., Nocentini, M., Pasquali, G., Bioremediation of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by using different aerobic batch bioreactor systems. *Soil Sediment. Contam.* 6: 243-256, (1997)
doi.org/10.1080/15320389709383563
- Porto, H., “HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos” Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, (2014)
- Ramos, T. & Gonçalves, M. & Casimiro Martins, J. & Pereira, L. Características de retenção de água no solo para utilização na rega das culturas, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., (2016)
ISBN: 978-972-579-043-4
- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E., A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 49 N. 1: 1-7, (1985)
- Reimann, C., Filzmoser, P. & Garrett, R.G. Background and threshold: critical comparison of methods of determination. *Science of The Total Environment*, 346(1–3): 1–16, (2005)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.023

- Reis, E., Andrade, R., Calapez, T., Melo, P., Estatística Aplicada - Vol. 2, Ed 6, Edições Sílabo, (2019)
ISBN: 9789726189862
- Rillig, M.C. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? *Environmental Science & Technology*, 46(12): 6453–6454, (2012)
doi.org/10.1021/es302011r
- Rocha-Santos, T. & Duarte, A.C. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65: 47–53, (2015)
doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011
- Rodríguez-Eugénio, N., McLaughlin, M.e Pennock, D., *Soil Pollution a Hidden Reality*, FAO, Rome, 142pp, (2018)
ISBN979-92-130505-8
- S. Rabodonirina, R. Rasolomampianina, F. Krier, D. Drider, D. Merhaby, S. Net, B. Ouddane, Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites, *Journal of Environmental Management* 232:1-7, (2019)
doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.005
- Salminen, R. & Gregorauskiene, V. Considerations regarding the definition of a geochemical baseline of elements in the surficial materials in areas differing in basic geology. *Applied Geochemistry*, 15(5): 647–653, (2000).
doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00077-3
- Saranya Kuppusamy, Palanisami Thavamani, Kadiyala Venkateswarlu, Yong Bok Lee, Ravi Naidu, Mallavarapu Megharaj, Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions, *Chemosphere* 168: 944-968, (2017)
doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115
- Schaefer, M., Juliane, F., The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* 36: 53–62, (2007)
doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.11.002
- Serrano, A.; Van Bommel, M.; Hallett, J. – Evaluation between ultrahigh pressure liquid chromatography and high-performance liquid chromatography analytical methods for characterizing natural dyestuffs. *Journal of Chromatography A*, 1318:102-111, (2013)
doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.062
- Shacklette, H.T. & Boerngen, J.G. *Element Concentrations in Soils and Other Surficial Materials of the Conterminous United States.*, p. 63. US Geological Survey, (1984)
- Sharma, P., Mayes, M.A., Tang, G.P., Role of soil organic carbon and colloids in sorption and transport of TNT, RDX and HMX in training range soils. *Chemosphere* 92: 993–1000, (2013)
doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.028
- Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.-M.. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere*, 48:993–1001, (2002)
doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00180-7
- Srogi, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5(4): 169–195, (2007)
doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0
- SSR, *Soil Contamination in West Africa*, Environmental Remediation, Pollution, (2010)
www.scribd.com/doc/71599035/Soil-Contamination-in-West-Africa
- Sthiannopkao, S. & Wong, M.H. Handling e-waste in developed and developing countries: Initiatives, practices, and consequences. *Science of The Total Environment*, 463–464: 1147–1153, (2013)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.088

- Swati, Ghosh, P., Das, M.T. & Thakur, I.S. In vitro toxicity evaluation of organic extract of landfill soil and its detoxification by indigenous pyrene-degrading *Bacillus* sp. ISTPY1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90: 145–151, (2014)
doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.001
- Tavakkoli, E., Juhasz, A., Donner, E., Lombi, E., Characterising the exchangeability of phenanthrene associated with naturally occurring soil colloids using an isotopic dilution technique. *Environ. Pollut.* 199:244–252, (2015)
doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.031
- Thiele, S. & Brümmer, G.W. Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(5): 733– 735, (2002)
doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00204-8
- Thompson, R.C. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672): 838–838, (2004)
doi.org/10.1126/science.1094559
- Trendel, J.M., Lohmann, F., Kintzinger, J.P., Albrecht, P., Chiarone, A., Riche, C., Cesario, M., Guilhem, J. & Pascard, C. Identification of des-A-triterpenoid hydrocarbons occurring in surface sediments. *Tetrahedron*, 45(14): 4457–4470, (1989)
doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89081-5
- US EPA. Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons., p. 25. Cincinnati, Environmental Monitoring and Support Laboratory, (1984)
- US EPA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Office of Solid Waste United States Environmental Protection Agency Washington, (2008)
archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf
- Uzen, N. Use of wastewater for agricultural irrigation and infectious diseases. Diyarbakir example. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 17(2): 488–497, (2016)
- Venuti, A., Alfonsi, L. & Cavallo, A. Anthropogenic pollutants on top soils along a section of the Salaria state road, central Italy. *Annals of Geophysics* (5), (2016)
doi.org/10.4401/ag-7021
- Walker, C.H., Hoplin, S.P., Sibley, S.P., Peakall, D.B., Principles of Ecotoxicology, 4th ed., Taylor & Francis, London, (2018)
ISBN 9781439862667
- Wang, X., Yu, X., Bartha, R., Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil, *Environ. Sci. Technol.* 24 (7) : 1086–1089, (1990)
- WATERS- HPLC: High Performance Liquid Chromatography.(Consultado. 07 maio 2019)
www.waters.com/waters/en_US/HPLC—High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US
- Wawer, M., Magiera, T., Ojha, G., Appel, E., Kusza, G., Hu, S. & Basavaiah, N. Traffic-Related Pollutants in Roadside Soils of Different Countries in Europe and Asia. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(7), (2015)
doi.org/10.1007/s11270-015-2483-6
- Wilcke, W. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, 141(3–4): 157–166, (2007)
doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.07.007
- Wilson, S.C., Jones, K.C., Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 81: 229-249, (1993)
doi.org/10.1016/0269-7491(93)90206-4

Xiaoya Ren, Guangming Zeng, Lin Tang, Jingjing Wang, Jia Wan, Yani Liu, Jiangfang Yu, Huan Yi, Shujing Ye, Rui Deng, Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants, *Science of the Total Environment* 610-611:1154-1163, (2018)
[dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089)

Zeng, G.M., Chen, M., Zeng, Z.T., Shale gas: surface water also at risk. *Nature* 499:154, (2013.)
doi.org/10.1038/499154c

Zhang, H., Wang, Z., Zhang, Y., Ding, M. & Li, L. Identification of traffic-related metals and the effects of different environments on their enrichment in roadside soils along the Qinghai–Tibet highway. *Science of The Total Environment*, 521–522:160–172 (2015)
doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.054

Zhu, B.T., Wu, S., Xia, X.H., Lu, X.X., Zhang, X.T., Xia, N., Liu, T., Effects of carbonaceous materials on microbial bioavailability of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in sediments. *J. Hazard. Mater.* 312: 216–223, (2016)
doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.065

ANEXOS

ANEXO I

- **Contaminação das amostras**
 - **Bioestimulação**

Tabela A.01: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioestimulação

	Amostra Solo para contaminação o (g)	Pireno (g)	Fenantren o (g)	Solo (g)	[Fenantre no] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo)	[Pireno] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo)
Branco_1	20,0051	0	0	180,0	0	0
BE050_1	20,0032	0,0095	0,0102	180,0	51,00	47,50
BE100_1	20,0009	0,0202	0,0201	180,0	100,50	101,00
BE200_1	20,0015	0,0513	0,0513	180,0	256,49	256,49
BE500_1	20,0024	0,1008	0,1009	180,0	504,49	503,99
Branco_2	20,0050	0	0	180,0	0	0
BE050_2	20,0022	0,0109	0,0108	180,0	54,00	54,50
BE100_2	20,0019	0,0201	0,0202	180,0	101,00	100,50
BE200_2	20,0025	0,0505	0,0502	180,0	251,00	252,50
BE500_2	20,0044	0,1007	0,1001	180,0	500,49	503,49

As amostras BE_{xxx}_1 são duplicados das amostras BE_{xxx}_2.

- **Bioaumentação A**

Tabela A.02: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioaumentação A

	Amostra Solo para contaminação o (g)	Pireno (g)	Fenantren o (g)	Solo (g)	[Fenantre no] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo)	[Pireno] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ solo)
BAA050_1	20,0014	0,0109	0,0103	180,0	51,50	54,50
BAA100_1	20,0068	0,0210	0,0211	180,0	105,50	105,00
BAA200_1	20,0046	0,0499	0,0515	180,0	257,49	249,49
BAA500_1	20,0034	0,1009	0,1010	180,0	504,98	504,48

	Amostra Solo para contaminação o (g)	Pireno (g)	Fenantreno (g)	Solo (g)	[Fenantreno] (µg.g⁻¹ solo)	[Pireno] (µg.g⁻¹ solo)
BAA050_2	20,0018	0,0102	0,0103	180,0	51,50	51,00
BAA100_2	20,0086	0,0201	0,0208	180,0	104,00	100,50
BAA200_2	20,0066	0,0501	0,0502	180,0	250,99	250,49
BAA500_2	20,0044	0,1004	0,1022	180,0	510,99	501,99

As amostras BAAxxx_1 são duplicados das amostras BAAxxx_2

▪ Bioaugmentação B

Tabela A.03: Massa de contaminante utilizado para a contaminação da amostra, massa de solo e concentração de cada um dos poluentes, para o ensaio de bioaugmentação B

	Amostra Solo para contaminação (g)	Pireno (g)	Fenantreno (g)	[Fenantreno] (µg.g⁻¹ solo)	[Pireno] (µg.g⁻¹ solo)
BAB050_1	200,1623	0,0104	0,0105	52,46	51,96
BAB100_1	200,1096	0,0204	0,0205	102,44	101,94
BAB200_1	200,0535	0,0510	0,0503	251,43	254,93
BAB500_1	200,0019	0,1002	0,1025	512,50	501,00
BAB050_2	200,1814	0,0105	0,0104	51,95	52,45
BAB100_2	200,0233	0,0199	0,0202	100,99	99,49
BAB200_2	200,2987	0,0511	0,0507	253,12	255,12
BAB500_2	200,1065	0,1015	0,1013	506,23	507,23

As amostras BABxxx_1 são duplicados das amostras BABxxx_2

ANEXO II

- **Extração por Agitação**

Tabela A.04: Resultados da extração dos poluentes e cálculo da concentração teórica de poluentes na solução de n-hexano

AMOSTR	Amostra	PYR_t	PHE_t	VOLUME	[PYR]_t	[PHE]_t
A	solo (g)	(µg)	(µg)	n-hexano	µg.ml⁻¹	(µg.ml⁻¹)
				(ml)		
Branco_1	20,0098	0,00	0,00	100	0,00	0,00
BE050_1	20,0308	951,44	1021,54	100	9,51	10,22
BE100_1	20,0007	2020,00	2010,00	96	21,04	20,94
BE200_1	20,0146	5133,60	5133,60	106	48,43	48,43
BE500_1	20,0159	10087,77	10097,78	100	100,88	100,98
BAA050_1	20,0067	1090,34	1030,32	98	11,13	10,51
BAA100_1	20,0174	2101,78	2111,79	102	20,61	20,70
BAA200_1	20,0238	4995,72	5155,90	104	48,04	49,58
BAA500_1	20,0057	10092,54	10102,54	112	90,11	90,20
Branco_2	20,0238	0,00	0,00	106	0,00	0,00
BE050_2	20,0081	1090,43	1080,43	98	11,13	11,02
BE100_2	20,0070	2010,68	2020,69	96	20,94	21,05
BE200_2	20,0253	5056,33	5026,29	106	47,70	47,42
BE500_2	20,0118	10075,72	10015,69	102	98,78	98,19
BAA050_2	20,0294	1021,49	1031,50	98	10,42	10,53
BAA100_2	20,0130	2011,22	2081,26	102	19,72	20,40
BAA200_2	20,0359	5018,83	5028,84	112	44,81	44,90
BAA500_2	20,0194	10049,52	10229,69	94	106,91	108,83
BAB050_1	20,0149	950,68	1020,73	102	9,32	10,01
BAB100_1	20,0332	2023,28	2013,26	96	21,08	20,97
BAB200_1	20,0663	5146,86	5146,86	108	47,66	47,66
BAB500_1	20,1369	10148,75	10158,82	102	99,50	99,60
BAB050_2	20,0079	1090,40	1030,38	76	14,35	13,56

BAB100_						
2	20,0134	2101,36	2111,37	100	21,01	21,11
BAB200_						
2	20,0846	5010,88	5171,55	108	46,40	47,88
BAB500_						
2	20,0178	10098,64	10108,65	104	97,10	97,20

ANEXO III



cliente - **Vitor J. Moreira Bertoluci**

identificação da amostra

nº laboratório - **10521 (S17)**
 referência - A
 proprietário - Horácio Faria
 morada - Rua da Encosta do Sol, 61 1ªEsq - Rio Covo (Sta Eulá
 parcela - .

data de registo - 13.11.2017
 técnico responsável - *Vitor Bertoluci - Univ. do Minho*

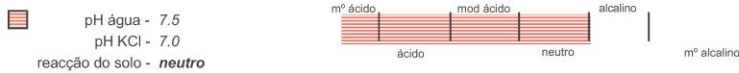
caracterização da amostra

concelho - Póvoa de Varzim
 profundidade(cm) - 0-30

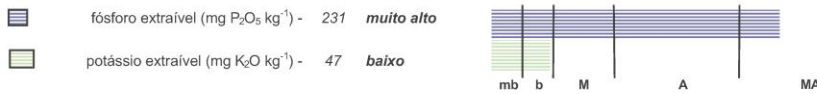
distrito - Porto
 cultura - **não indica**

resultados da análise

textura - **grosseira**



método de Égner-Riehm:



sugestão de fertilização

produção esperada* (t/ha) - **não indica**

- calagem - 0 kg de calcário agrícola por hectare
- azoto - . unidades (ou kg de N por hectare)
- fósforo - . unidades (ou kg de P₂O₅ por hectare)
- potássio - . unidades (ou kg de K₂O por hectare)
- magnésio - . kg de Mg por hectare
- boro - . kg de B por hectare

Notas: - a recomendação de adubação e calagem dependem da cultura a instalar ou instalada
 .
 .
 .

Vila Real, 2-dez-2017

João Coutinho

labsolosplantas@utad.pt
 259 350 212

Laboratório aderente ao IPE (International Plant Exchange Programme) e ao ISE (International Soil Exchange Programme), Wageningen, Holanda





identificação da amostra

nº laboratório - **10521 (S17)**
 referência - A
 proprietário - Horácio Faria
 parcela - .

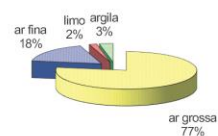
resultados da análise

azoto total -	0.52 g N kg ⁻¹	azoto amoniacal -	3.5 mg N kg ⁻¹
relação C/N -	8.8	azoto nítrico -	5.9 mg N kg ⁻¹
		azoto mineral -	9.4 mg N kg ⁻¹

análise granulométrica

teor de areia grossa (0,2 - 2 mm) -	775 g kg ⁻¹
teor de areia fina (0,02 - 0,2 mm) -	177 g kg ⁻¹
teor de limo (0,002 - 0,02 mm) -	17 g kg ⁻¹
teor de argila (< 0,002 mm) -	31 g kg ⁻¹

classe de textura - **arenoso**



Vila Real, 2-dez-2017

João Coutinho

Laboratório aderente ao IPE (International Plant Exchange Programme) e ao ISE (International Soil Exchange Programme), Wageningen, Holanda



LABORATÓRIO ANÁLISES DE SOLOS E PLANTAS

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

5000 - 811 VILA REAL

PORTUGAL

labsolosplantas@utad.pt

259 350 212

ANEXO IV

- **Dados UPLC**

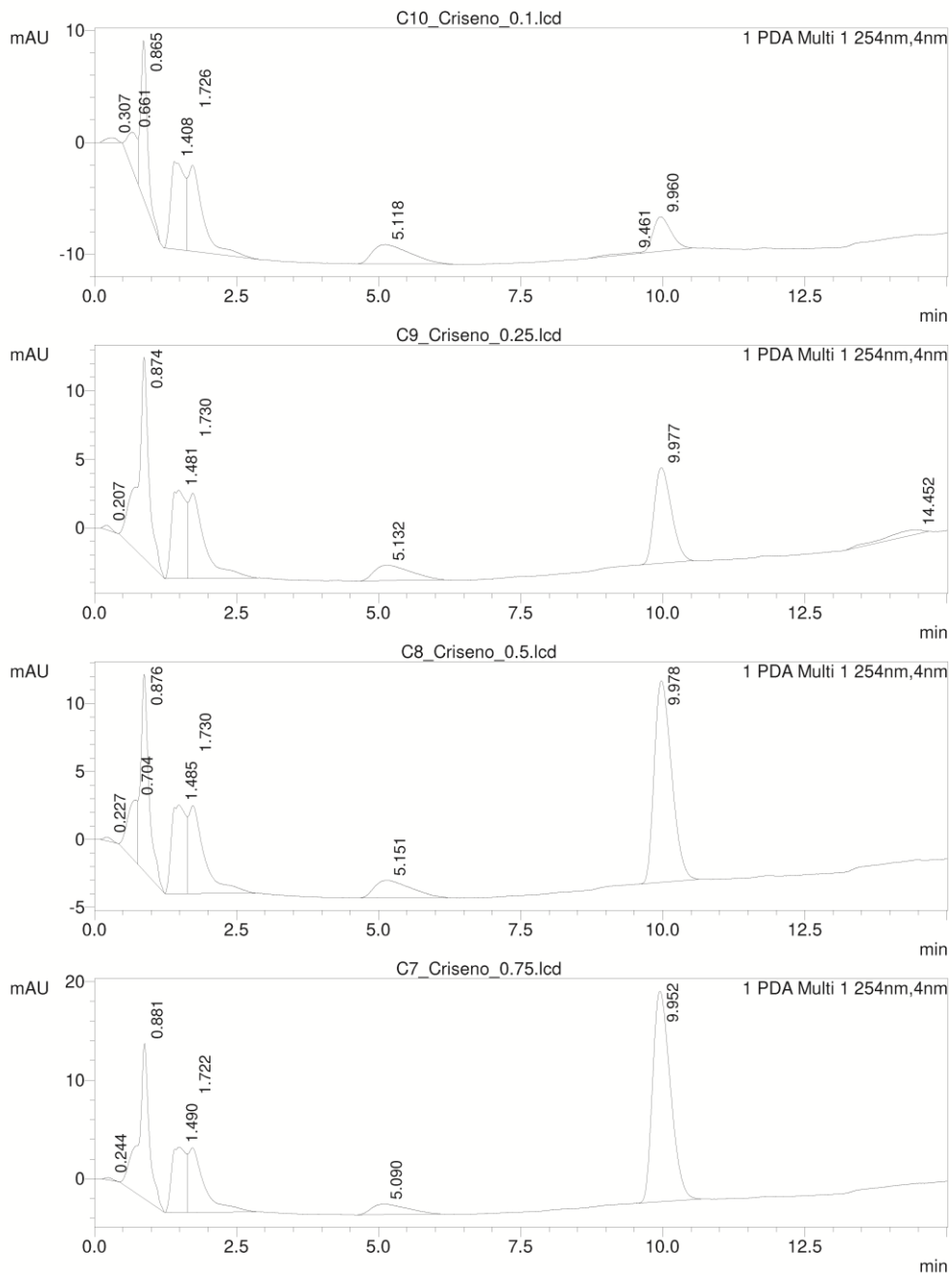
Tabela A.05: Correspondência dos códigos das amostras com o código utilizado na análise UPLC

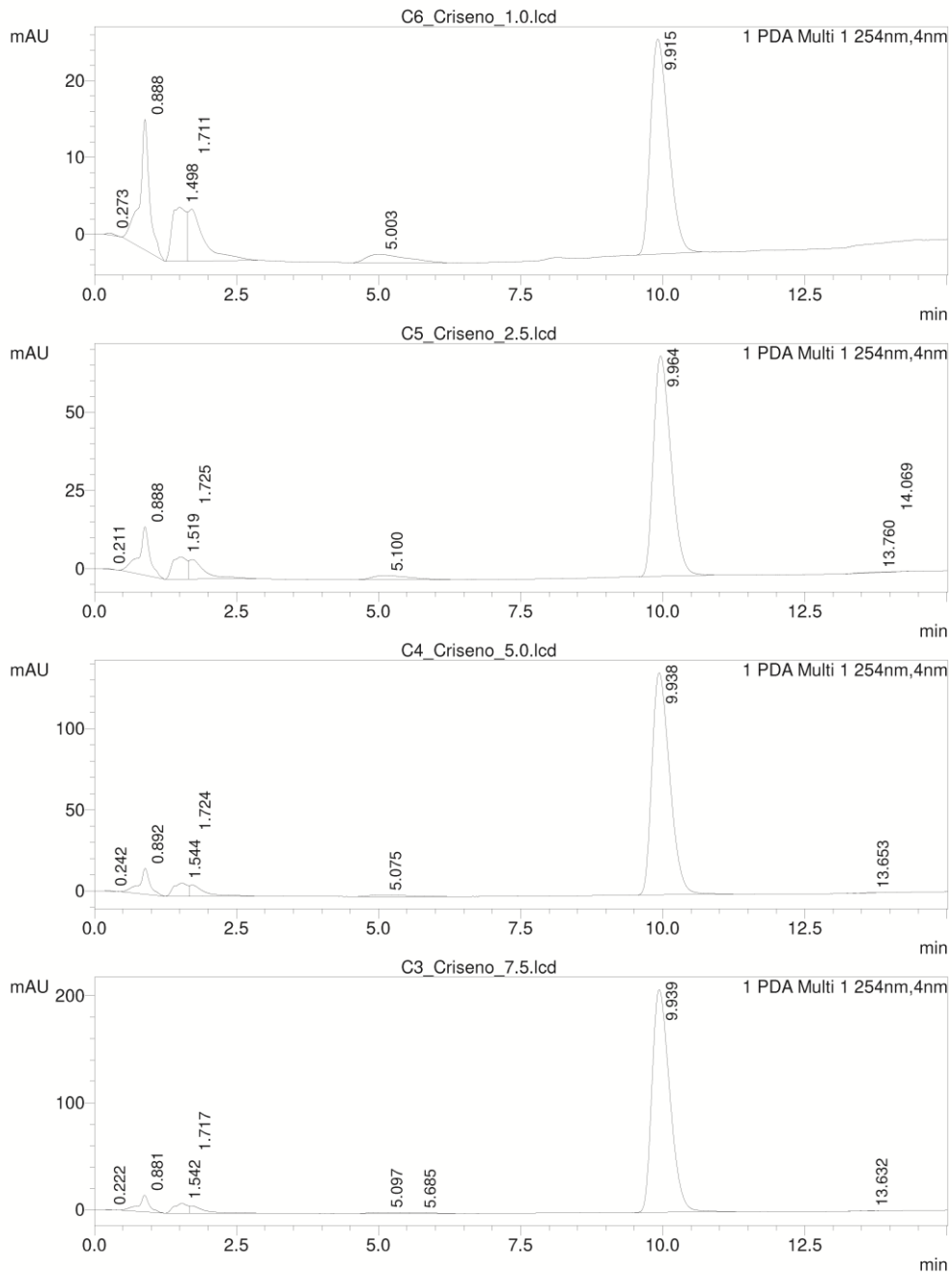
AMOSTRA	CÓDIGO
Branco_1	C2.0B
BE050_1	C2.01
BE100_1	C2.02
BE200_1	C2.03
BE500_1	C2.04
BAA050_1	C2.11
BAA100_1	C2.12
BAA200_1	C2.13
BAA500_1	C2.14
Branco_1 * 10⁻¹	C2.0B * 10 ⁻¹
BE050_1 * 10⁻¹	C2.01 * 10 ⁻¹
BE100_1 * 10⁻¹	C2.02 * 10 ⁻¹
BE200_1 * 10⁻¹	C2.03 * 10 ⁻¹
BE500_1 * 10⁻¹	C2.04 * 10 ⁻¹
BAA050_1 * 10⁻¹	C2.11 * 10 ⁻¹
BAA100_1 * 10⁻¹	C2.12 * 10 ⁻¹
BAA200_1 * 10⁻¹	C2.13 * 10 ⁻¹
BAA500_1 * 10⁻¹	C2.14 * 10 ⁻¹
Branco_2	C3.0B/A
BE050_2 * 10⁻¹	C3.01/A * 10 ⁻¹
BE100_2 * 10⁻¹	C3.02/A * 10 ⁻¹
BE200_2 * 10⁻¹	C3.03/A * 10 ⁻¹
BE500_2 * 10⁻¹	C3.04/A * 10 ⁻¹
BAA050_2 * 10⁻¹	C3.11/A * 10 ⁻¹
BAA100_2 * 10⁻¹	C3.12/A * 10 ⁻¹
BAA200_2 * 10⁻¹	C3.13/A * 10 ⁻¹
BAA500_2 * 10⁻¹	C3.14/A * 10 ⁻¹
BE050_2	C3.01/A

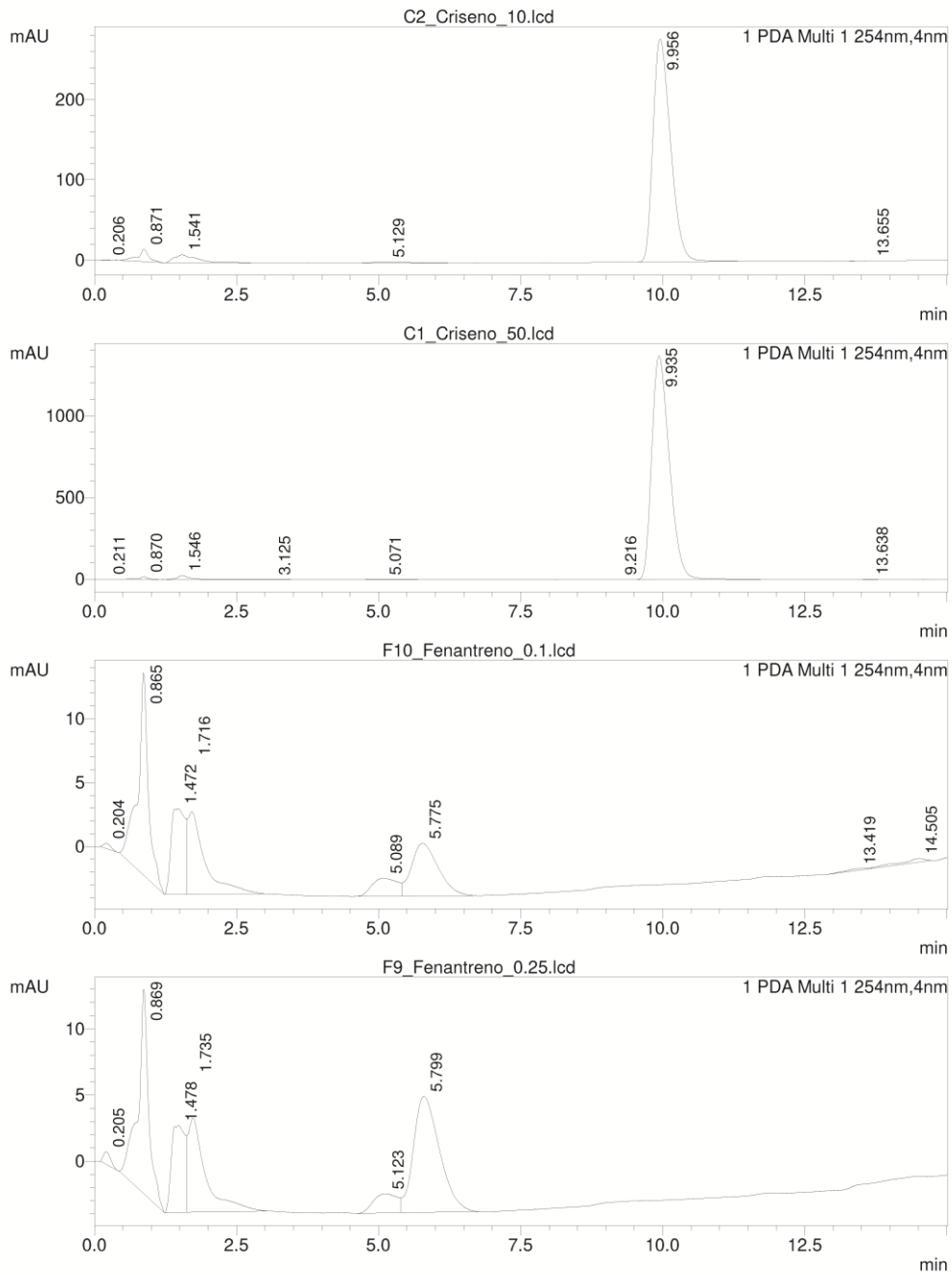
BE100_2	C3.02/A
BE200_2	C3.03/A
BE500_2	C3.04/A
BAA050_2	C3.11/A
BAA100_2	C3.12/A
BAA200_2	C3.13/A
BAA500_2	C3.14/A
BAB050_1	C5.01
BAB100_1	C5.02
BAB200_1	C5.03
BAB500_1	C5.04
BAB050_2	C5.11
BAB100_2	C5.12
AMOSTRA	AMOSTRA
BAB200_2	C5.13
BAB500_2	C5.14
BAB050_1* 10⁻¹	C5.01 * 10 ⁻¹
BAB100_1* 10⁻¹	C5.02 * 10 ⁻¹
BAB200_1* 10⁻¹	C5.03 * 10 ⁻¹
BAB500_1* 10⁻¹	C5.04 * 10 ⁻¹
BAB050_2* 10⁻¹	C5.11 * 10 ⁻¹
BAB100_2* 10⁻¹	C5.12 * 10 ⁻¹
BAB200_2* 10⁻¹	C5.13 * 10 ⁻¹
BAB500_2* 10⁻¹	C5.14 * 10 ⁻¹

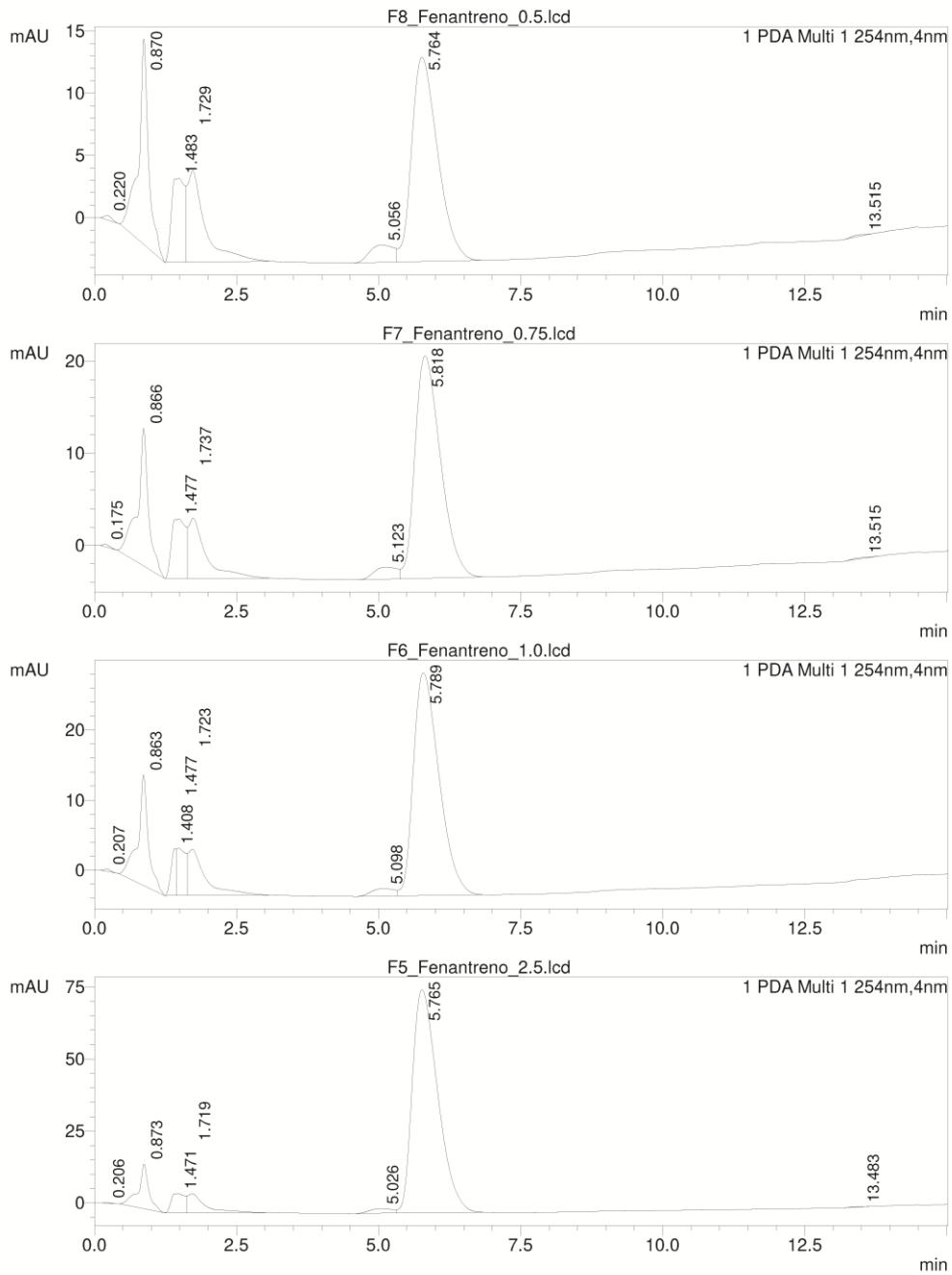
Tabela A.05: Correspondência dos códigos das amostras com o código utilizado na análise UPLC) (continuação)

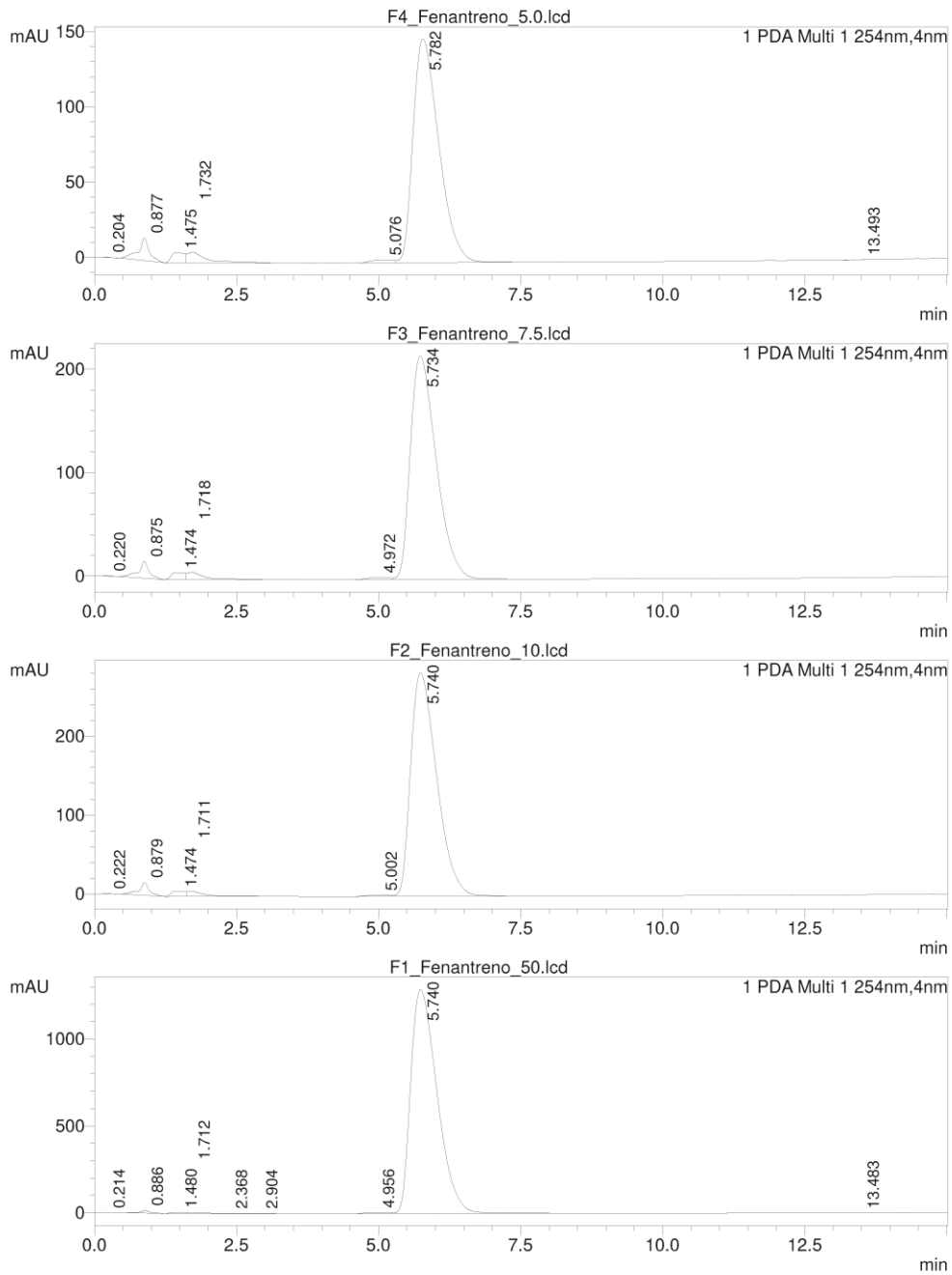
==== Shimadzu LabSolutions Browser Report ====

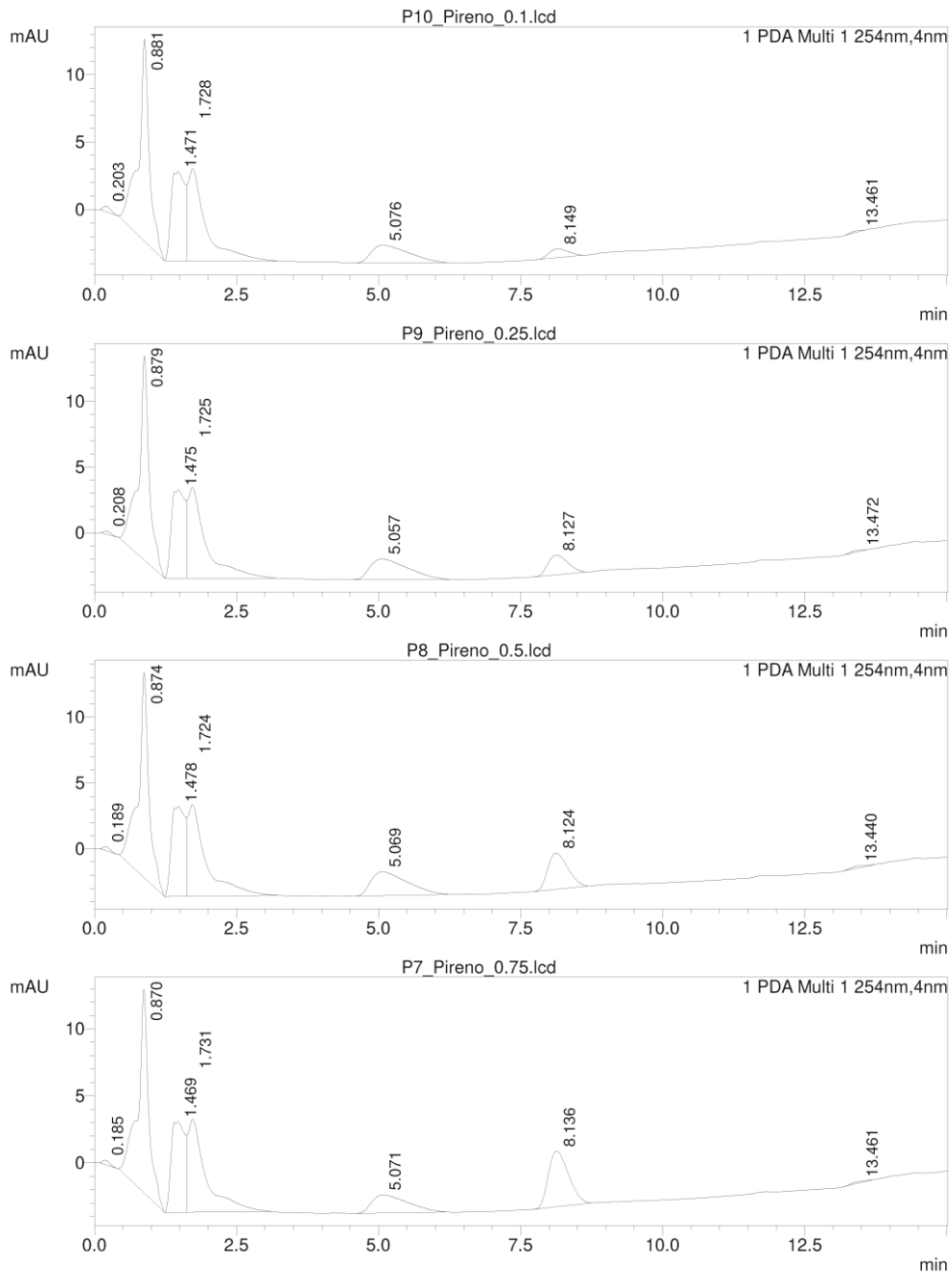


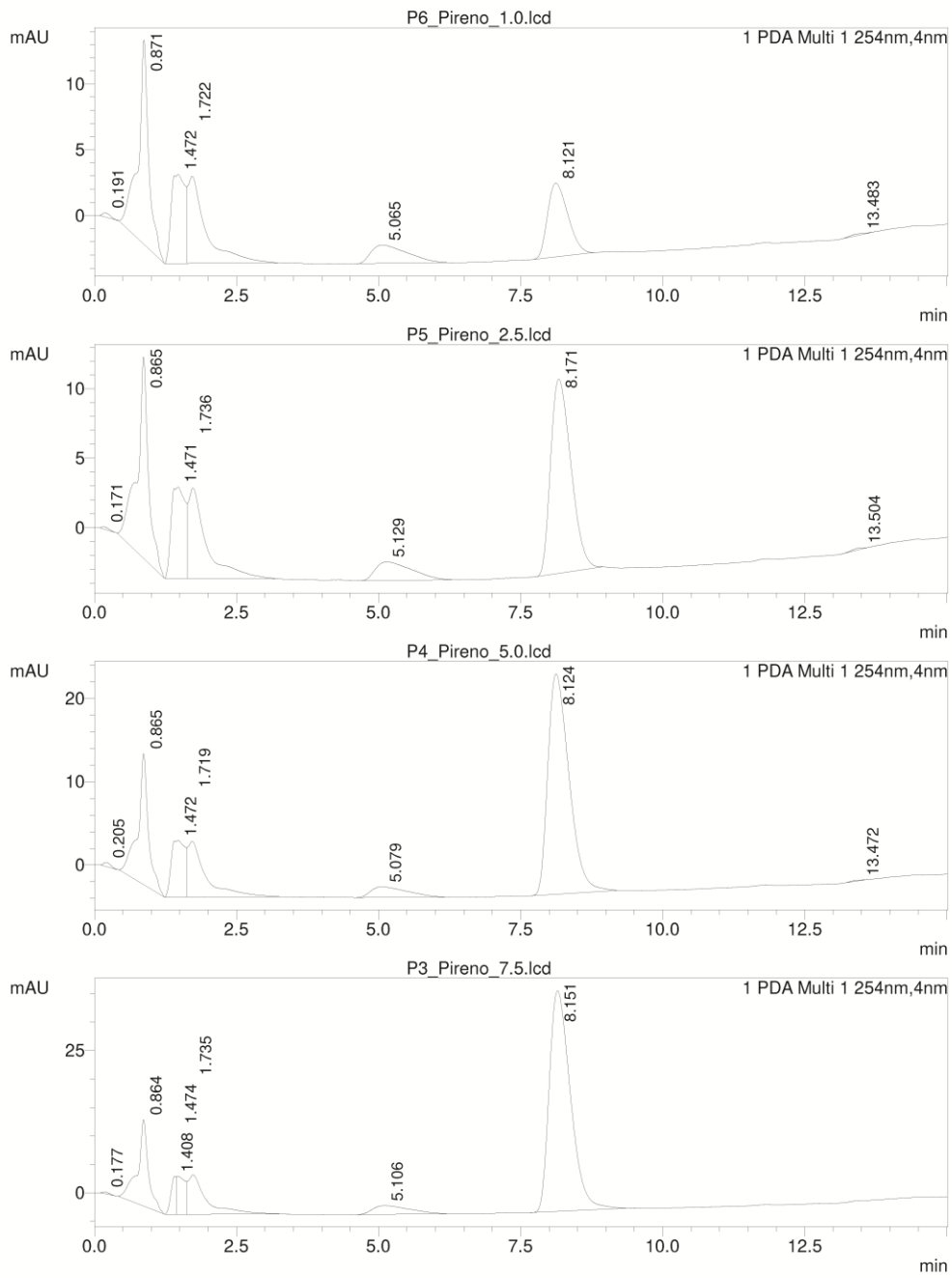


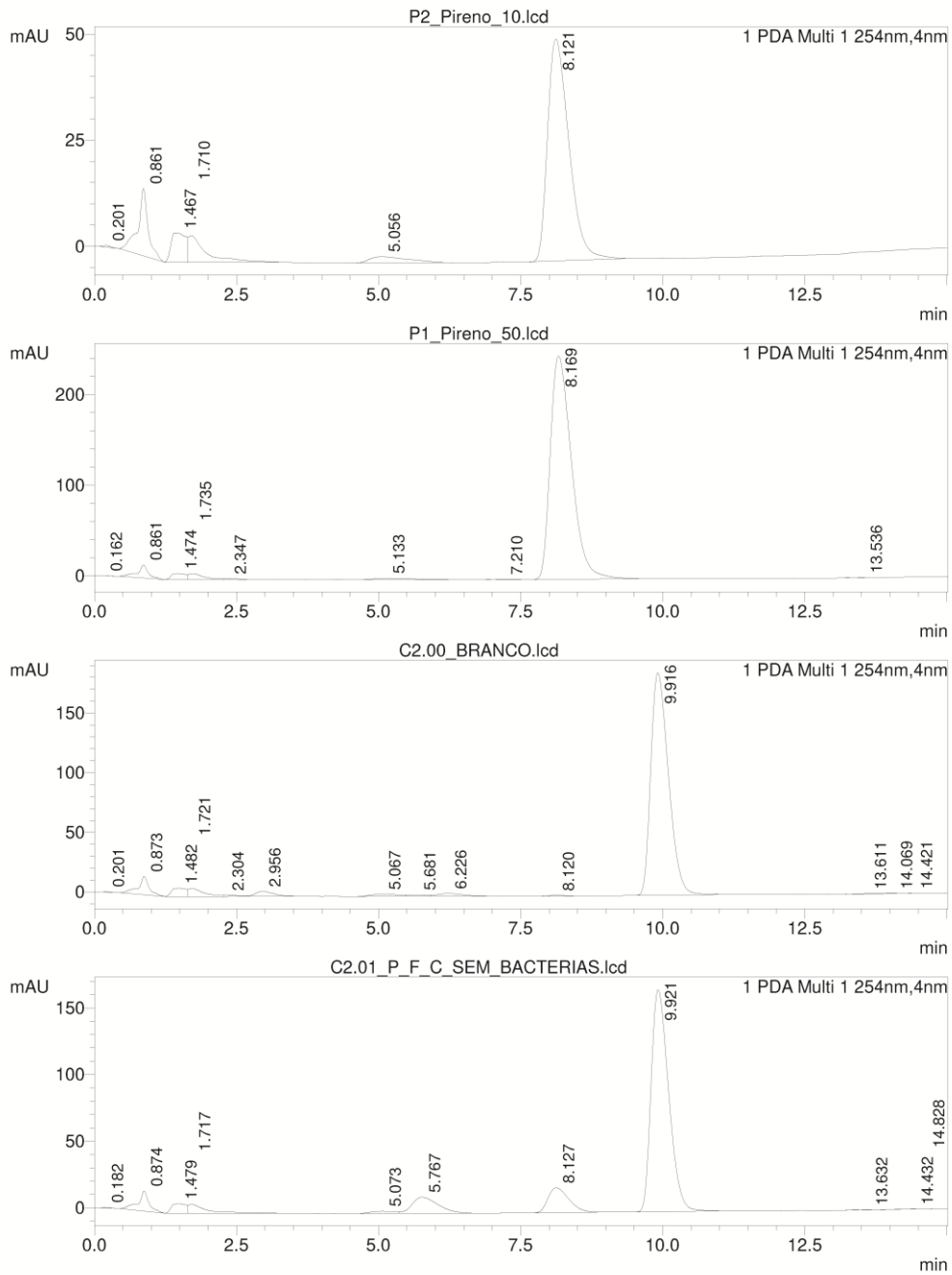


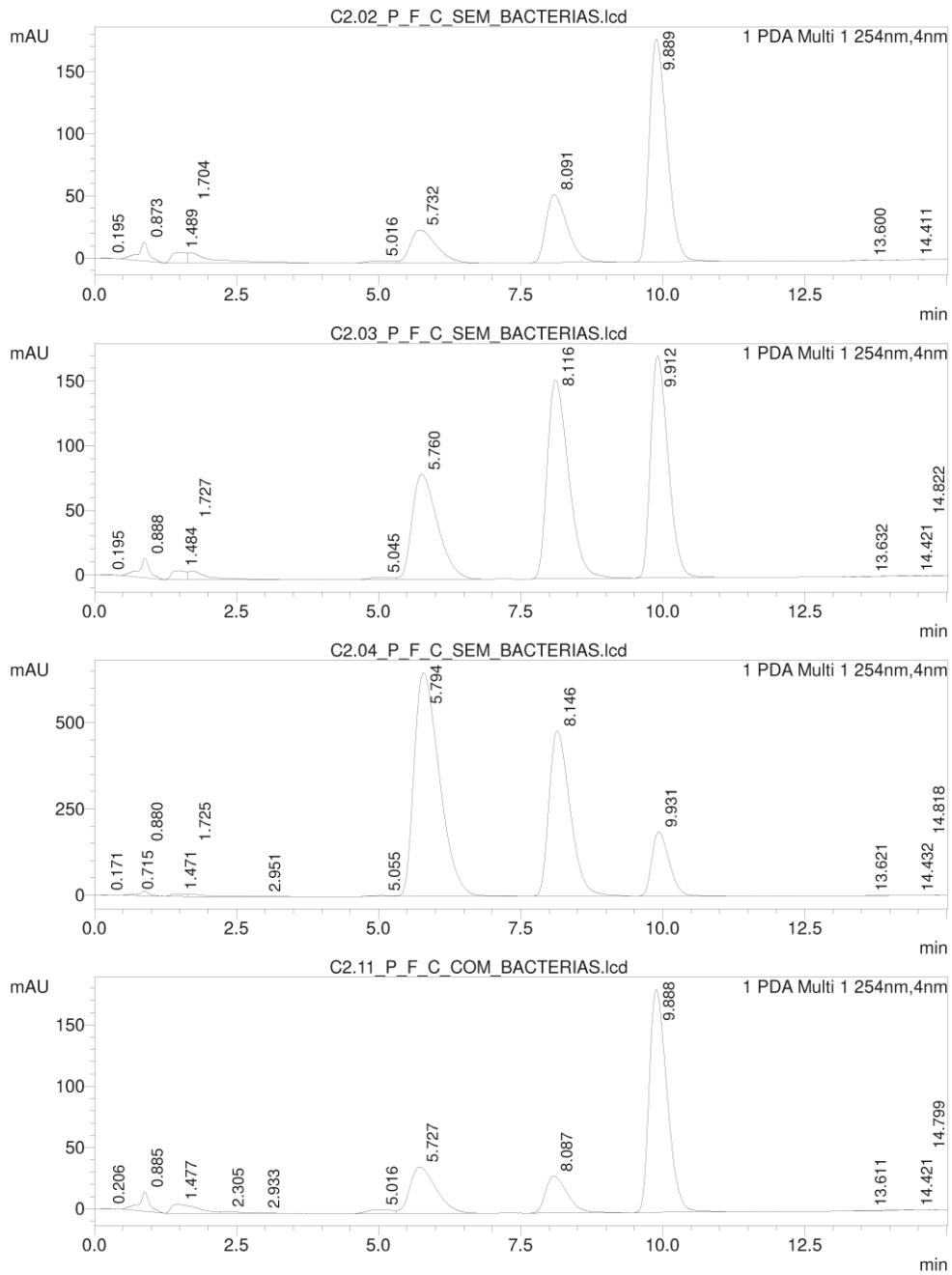


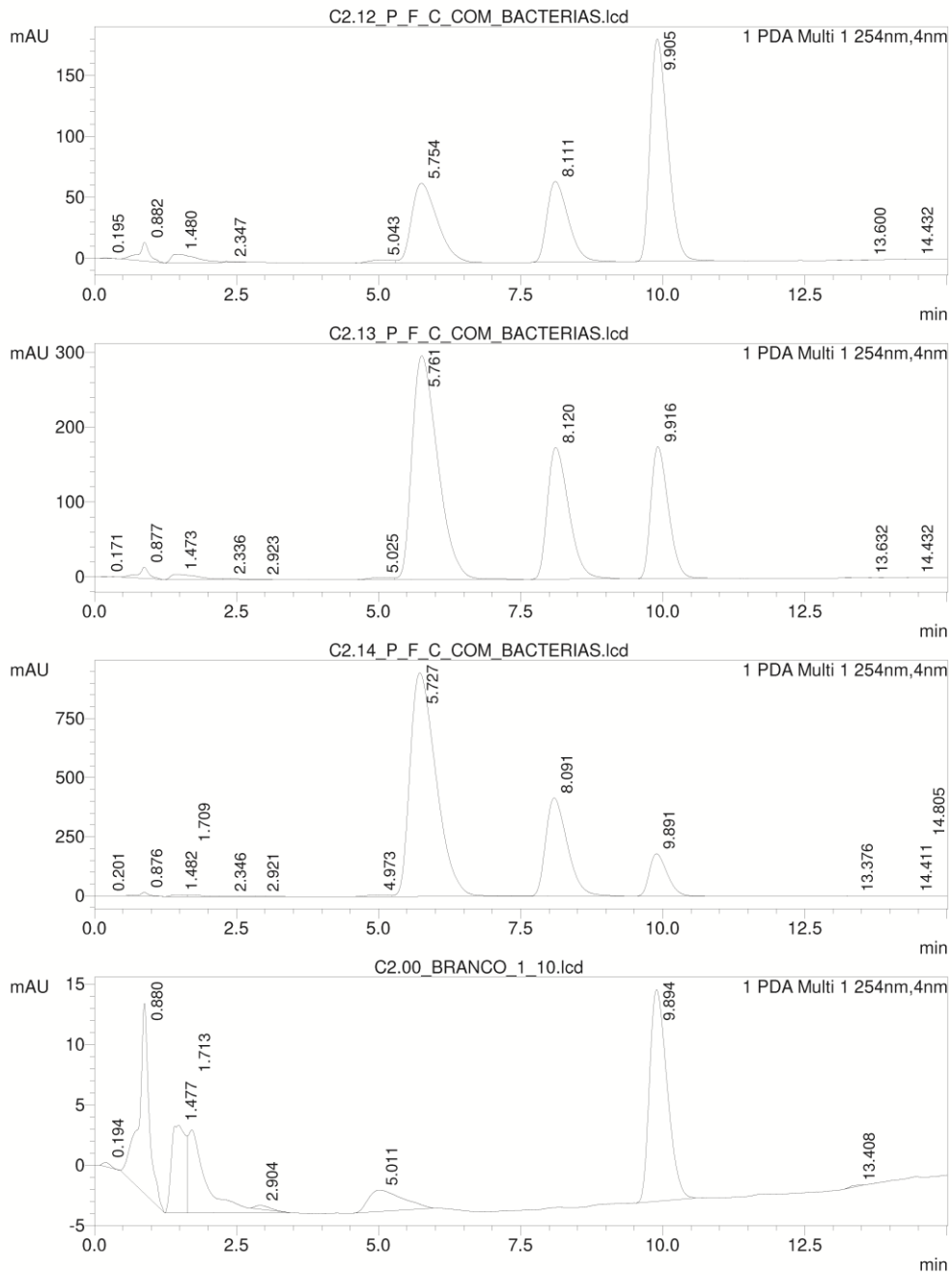


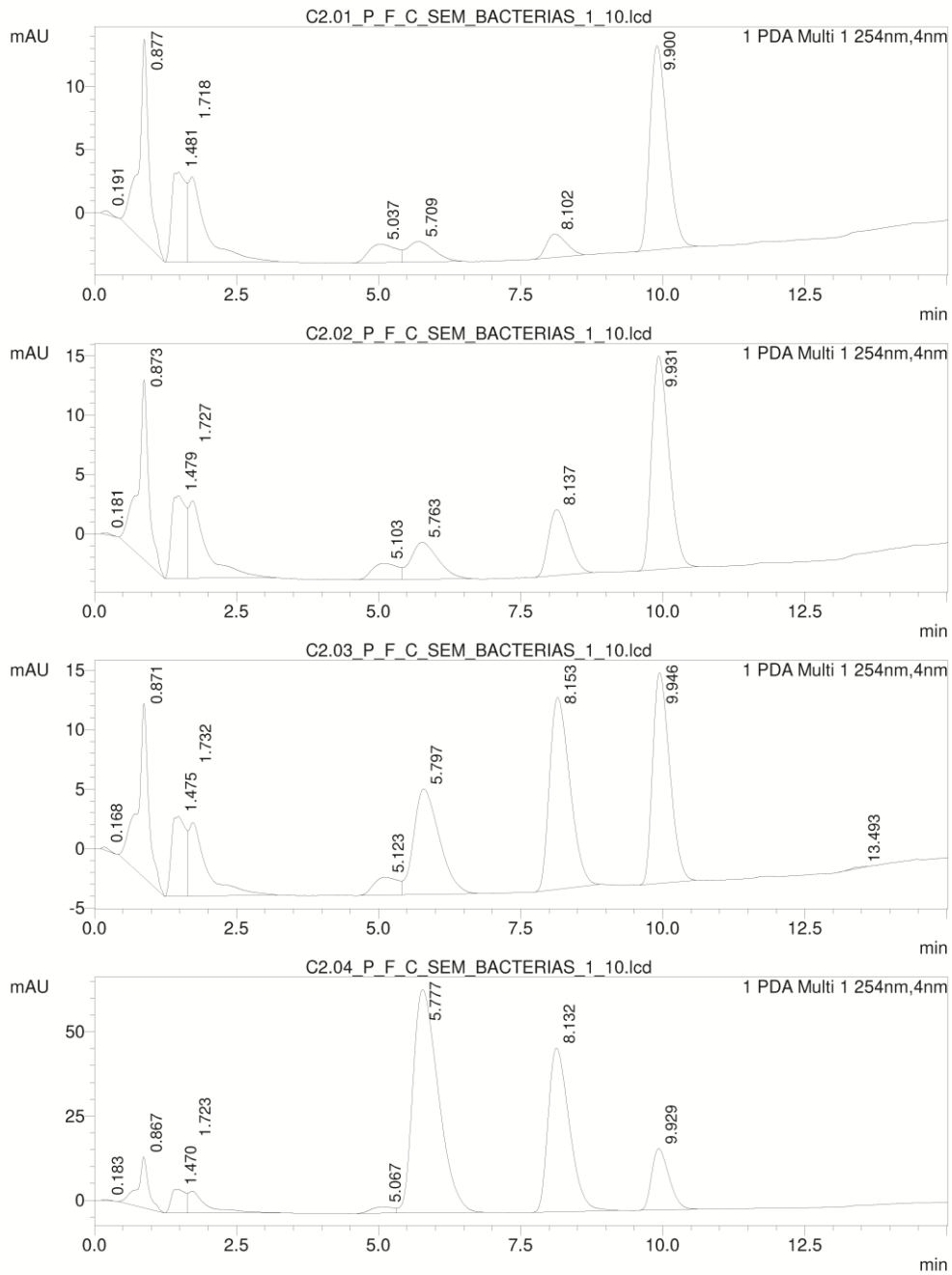


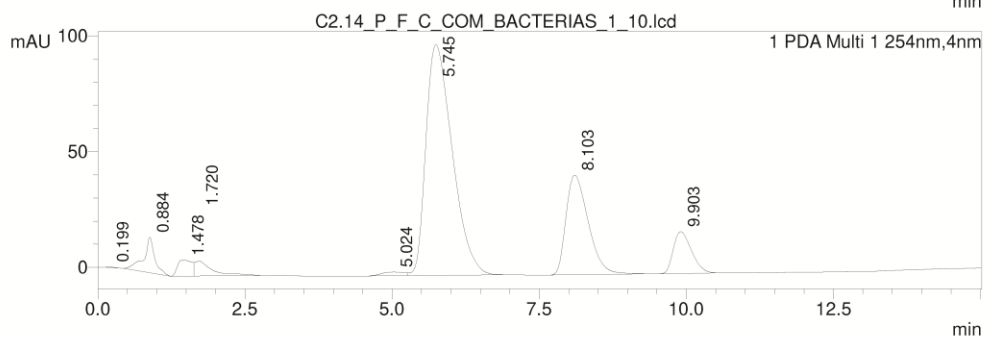
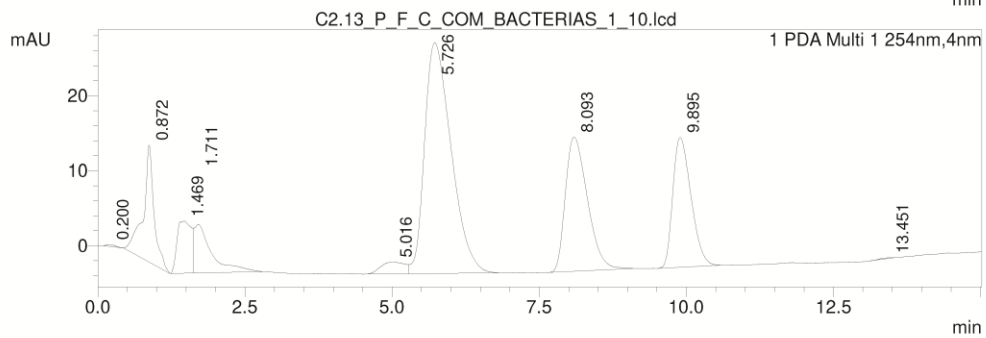
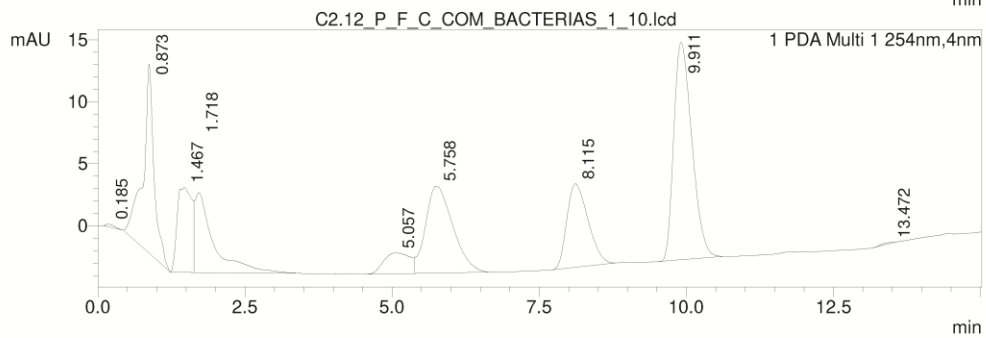
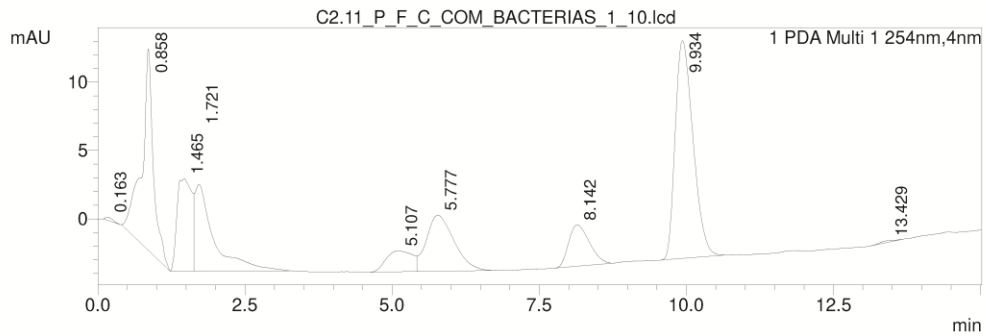












<< PDA >>

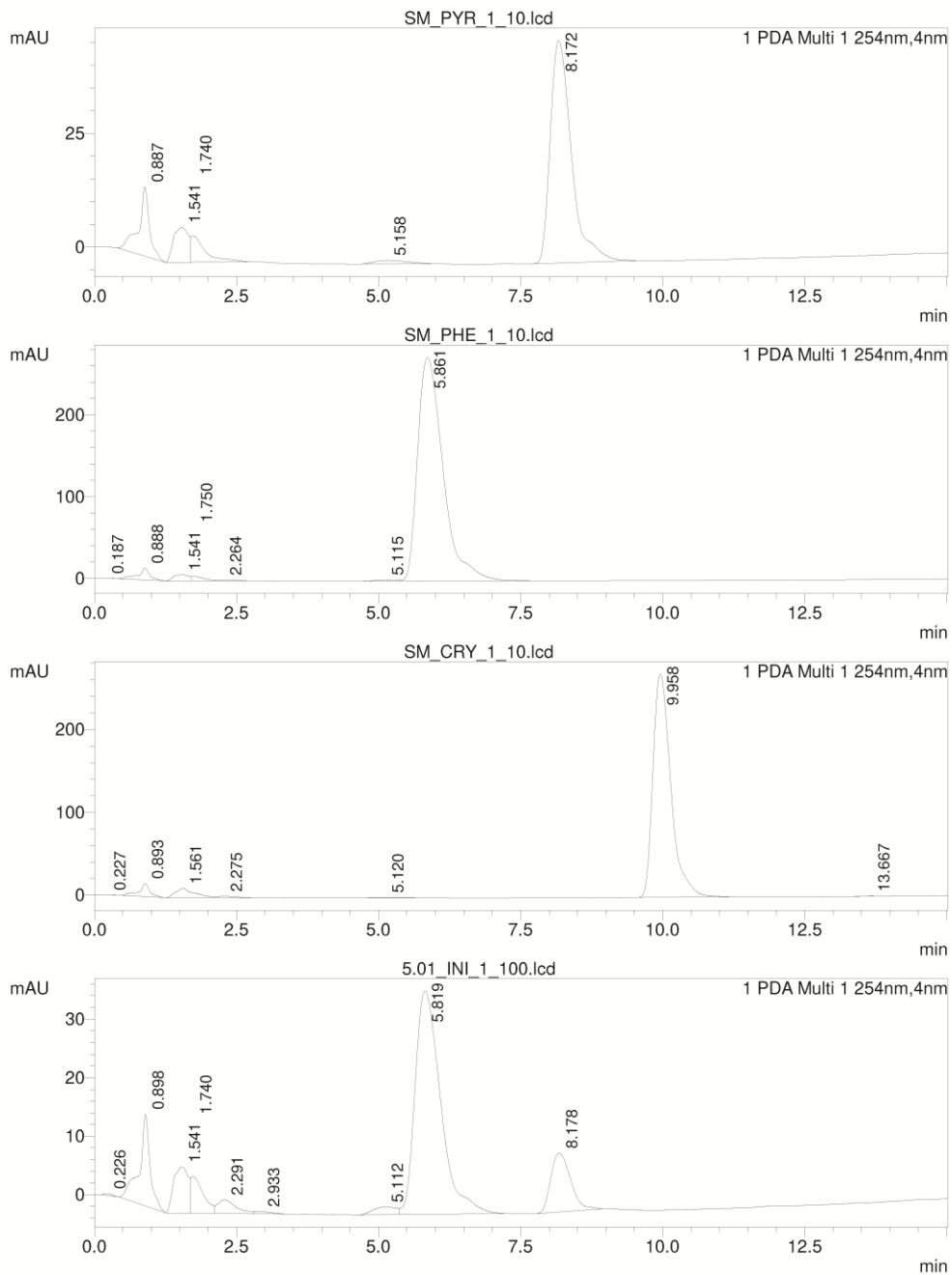
ID#1 Compound Name: Pireno

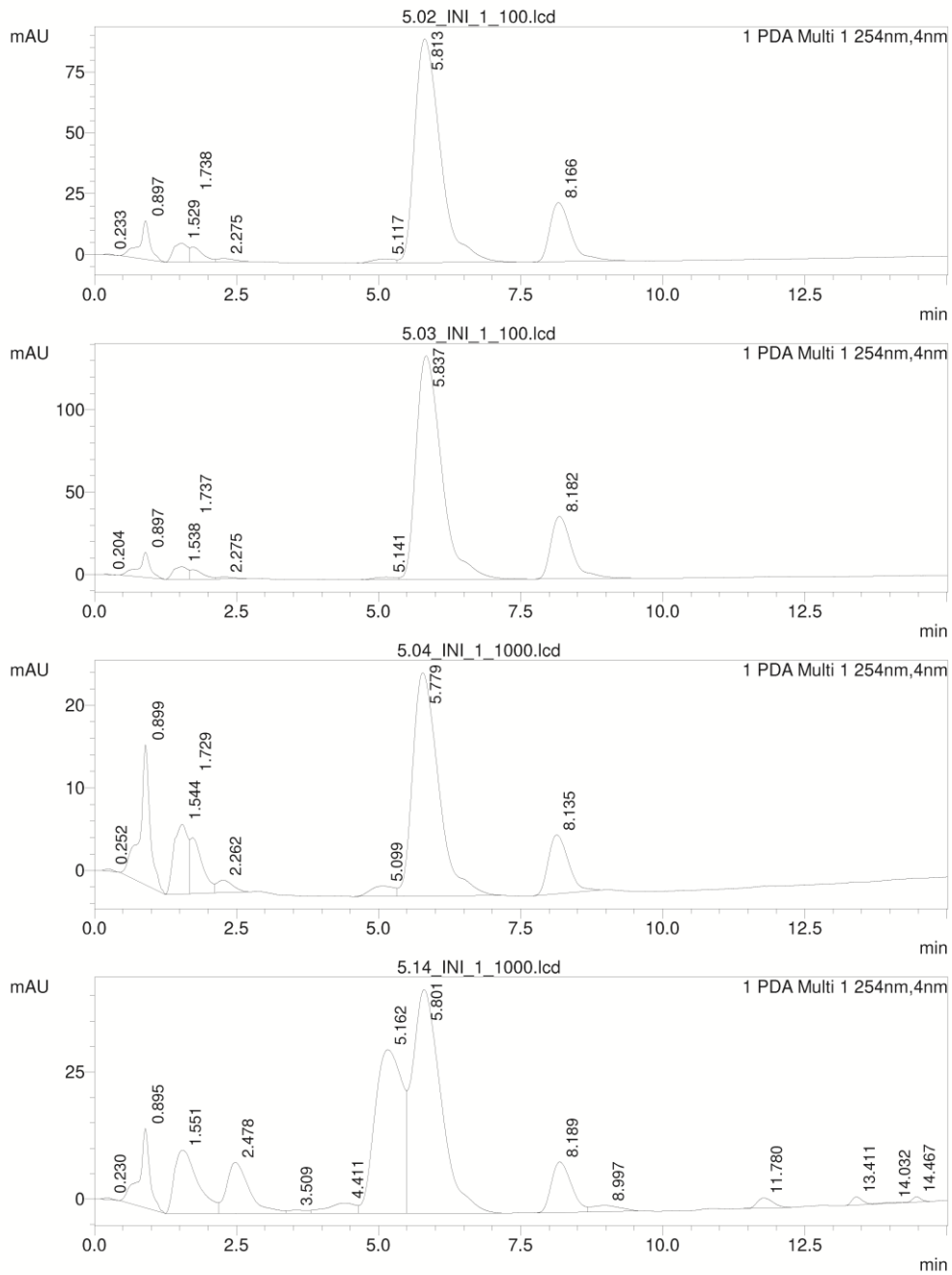
Data File Name	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
C10_Criseno_0.1.lcd	C10_Criseno_0.1		0.000	0	0	0.000
C9_Criseno_0.25.lcd	C9_Criseno_0.25		0.000	0	0	0.000
C8_Criseno_0.5.lcd	C8_Criseno_0.5		0.000	0	0	0.000

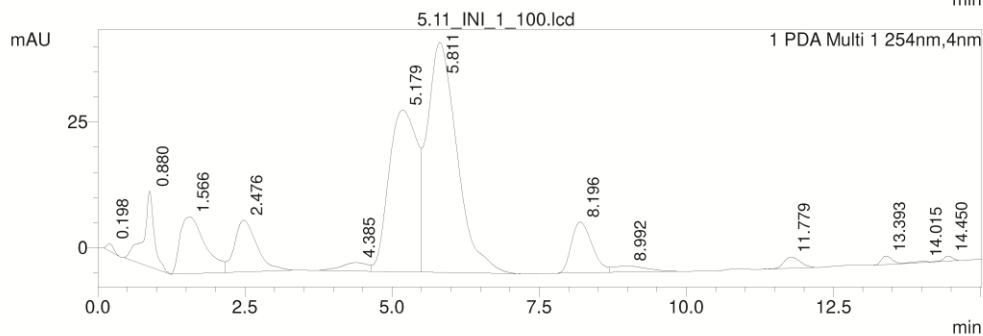
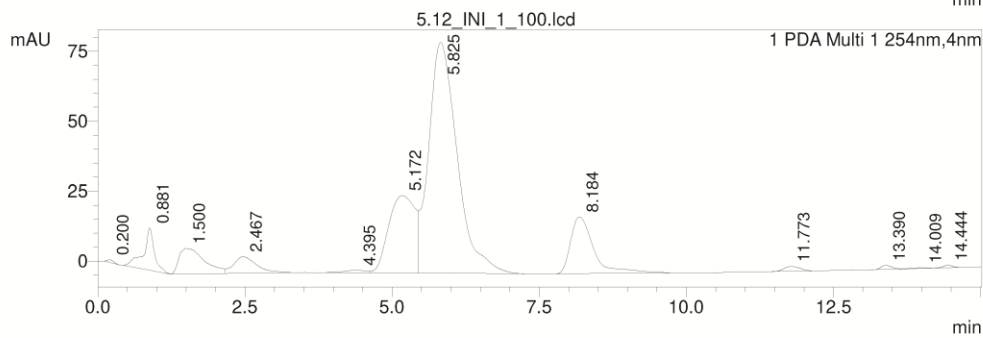
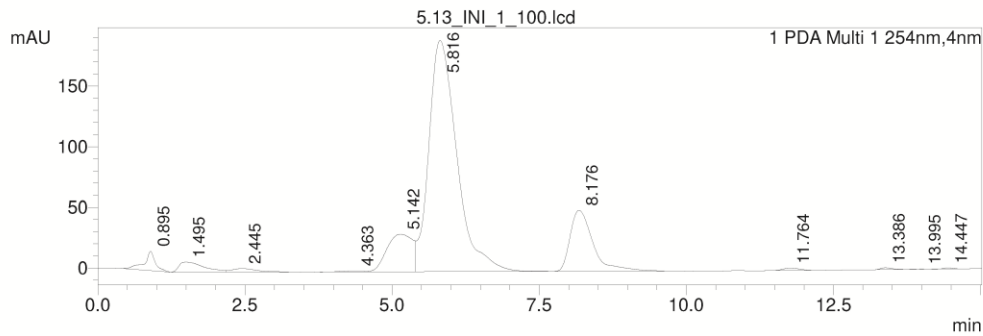
10-04-2018 15:36:05 Page 13 / 13

Data File Name	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
C7_Criseno_0.75.lcd	C7_Criseno_0.75		0.000	0	0	0.000
C6_Criseno_1.0.lcd	C6_Criseno_1.0		0.000	0	0	0.000
C5_Criseno_2.5.lcd	C5_Criseno_2.5		0.000	0	0	0.000
C4_Criseno_5.0.lcd	C4_Criseno_5.0		0.000	0	0	0.000
C3_Criseno_7.5.lcd	C3_Criseno_7.5		0.000	0	0	0.000
C2_Criseno_10.lcd	C2_Criseno_10		0.000	0	0	0.000
C1_Criseno_50.lcd	C1_Criseno_50		0.000	0	0	0.000
F10_Fenantreno_0.1.lcd	F10_Fenantreno_0.1		0.000	0	0	0.000
F9_Fenantreno_0.25.lcd	F9_Fenantreno_0.25		0.000	0	0	0.000
F8_Fenantreno_0.5.lcd	F8_Fenantreno_0.5		0.000	0	0	0.000
F7_Fenantreno_0.75.lcd	F7_Fenantreno_0.75		0.000	0	0	0.000
F6_Fenantreno_1.0.lcd	F6_Fenantreno_1.0		0.000	0	0	0.000
F5_Fenantreno_2.5.lcd	F5_Fenantreno_2.5		0.000	0	0	0.000
F4_Fenantreno_5.0.lcd	F4_Fenantreno_5.0		0.000	0	0	0.000
F3_Fenantreno_7.5.lcd	F3_Fenantreno_7.5		0.000	0	0	0.000
F2_Fenantreno_10.lcd	F2_Fenantreno_10		0.000	0	0	0.000
F1_Fenantreno_50.lcd	F1_Fenantreno_50		0.000	0	0	0.000
P10_Pireno_0.1.lcd	P10_Pireno_0.1		8.149	15480	652	-0.082
P9_Pireno_0.25.lcd	P9_Pireno_0.25		8.127	36644	1498	0.085
P8_Pireno_0.5.lcd	P8_Pireno_0.5		8.124	67472	2748	0.327
P7_Pireno_0.75.lcd	P7_Pireno_0.75		8.136	102918	4154	0.605
P6_Pireno_1.0.lcd	P6_Pireno_1.0		8.121	138955	5596	0.889
P5_Pireno_2.5.lcd	P5_Pireno_2.5		8.171	347510	13997	2.528
P4_Pireno_5.0.lcd	P4_Pireno_5.0		8.124	687128	26482	5.197
P3_Pireno_7.5.lcd	P3_Pireno_7.5		8.151	1002580	38764	7.676
P2_Pireno_10.lcd	P2_Pireno_10		8.121	1364398	52228	10.520
P1_Pireno_50.lcd	P1_Pireno_50		8.169	6369412	246487	49.856
C2.00_BRANCO.lcd	C2.00_BRANCO		8.120	13222	564	-0.100
C2.01_P_F_C_SEM_BACTER	C2.01_P_F_C_SEM_BACTER		8.127	479293	18734	3.563
C2.02_P_F_C_SEM_BACTER	C2.02_P_F_C_SEM_BACTER		8.091	1421058	54543	10.965
C2.03_P_F_C_SEM_BACTER	C2.03_P_F_C_SEM_BACTER		8.116	4026449	154166	31.442
C2.04_P_F_C_SEM_BACTER	C2.04_P_F_C_SEM_BACTER		8.146	12337509	478565	96.761
C2.11_P_F_C_COM_BACTER	C2.11_P_F_C_COM_BACTER		8.087	793192	30258	6.030
C2.12_P_F_C_COM_BACTER	C2.12_P_F_C_COM_BACTER		8.111	1729394	66065	13.388
C2.13_P_F_C_COM_BACTER	C2.13_P_F_C_COM_BACTER		8.120	4591137	175648	35.880
C2.14_P_F_C_COM_BACTER	C2.14_P_F_C_COM_BACTER		8.091	11071388	416559	86.810
C2.00_BRANCO_1_10.lcd	C2.00_BRANCO_1_10		0.000	0	0	0.000
C2.01_P_F_C_SEM_BACTER	C2.01_P_F_C_SEM_BACTER		8.102	45330	1848	0.153
C2.02_P_F_C_SEM_BACTER	C2.02_P_F_C_SEM_BACTER		8.137	138165	5565	0.882
C2.03_P_F_C_SEM_BACTER	C2.03_P_F_C_SEM_BACTER		8.153	401492	16125	2.952
C2.04_P_F_C_SEM_BACTER	C2.04_P_F_C_SEM_BACTER		8.132	1262721	48657	9.721
C2.11_P_F_C_COM_BACTER	C2.11_P_F_C_COM_BACTER		8.142	74324	3030	0.381
C2.12_P_F_C_COM_BACTER	C2.12_P_F_C_COM_BACTER		8.115	168810	6718	1.123
C2.13_P_F_C_COM_BACTER	C2.13_P_F_C_COM_BACTER		8.093	467432	17898	3.470
C2.14_P_F_C_COM_BACTER	C2.14_P_F_C_COM_BACTER		8.103	1128481	43011	8.666
Average			8.125	1862292	71502	14.433
%RSD			0.280	173.577	173.157	176.024
Maximum			8.171	12337509	478565	96.761
Minimum			8.087	13222	564	-0.100
Standard Deviation			0.023	3232516	123811	25.405

==== Shimadzu LabSolutions Browser Report ====



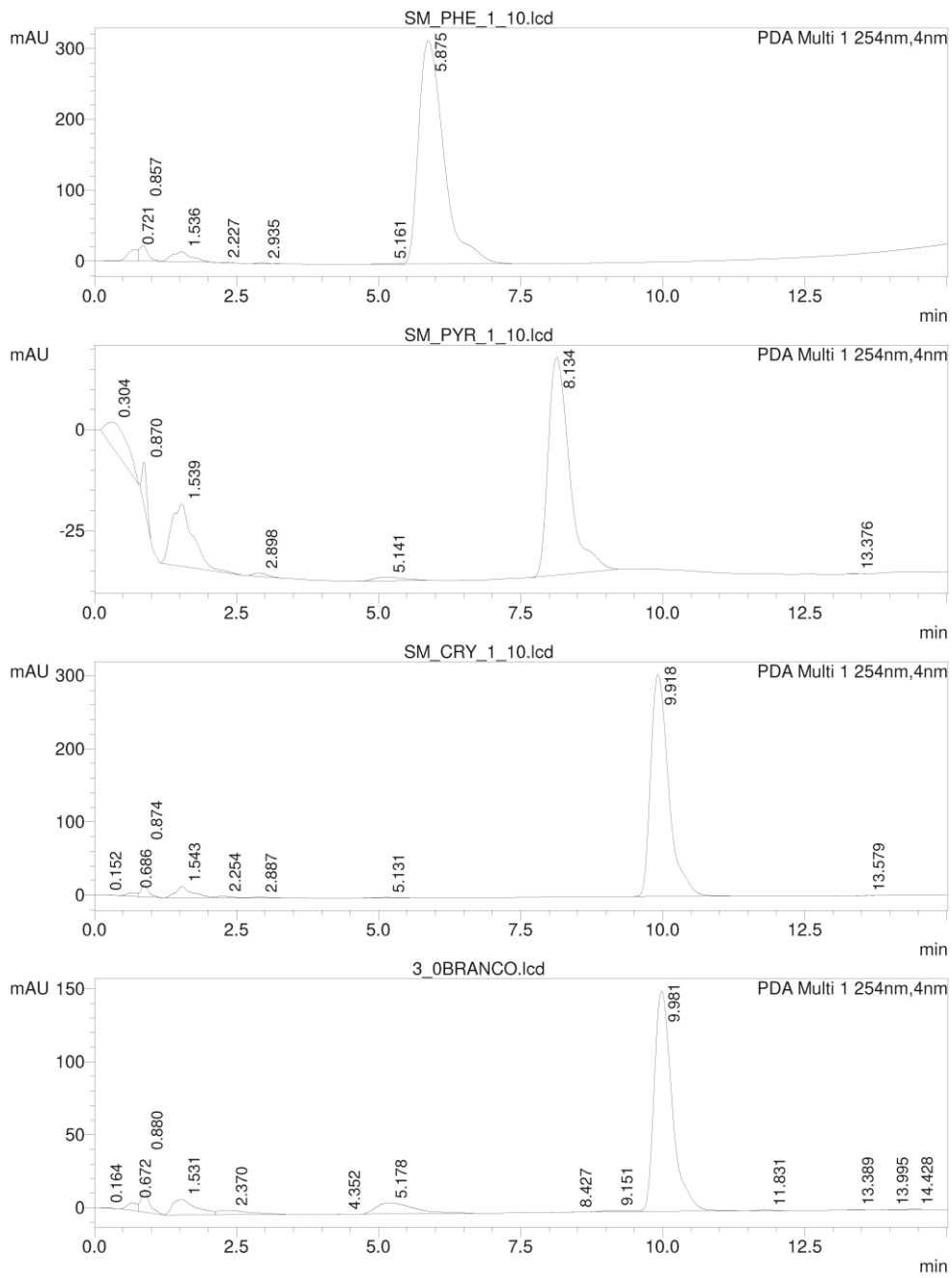


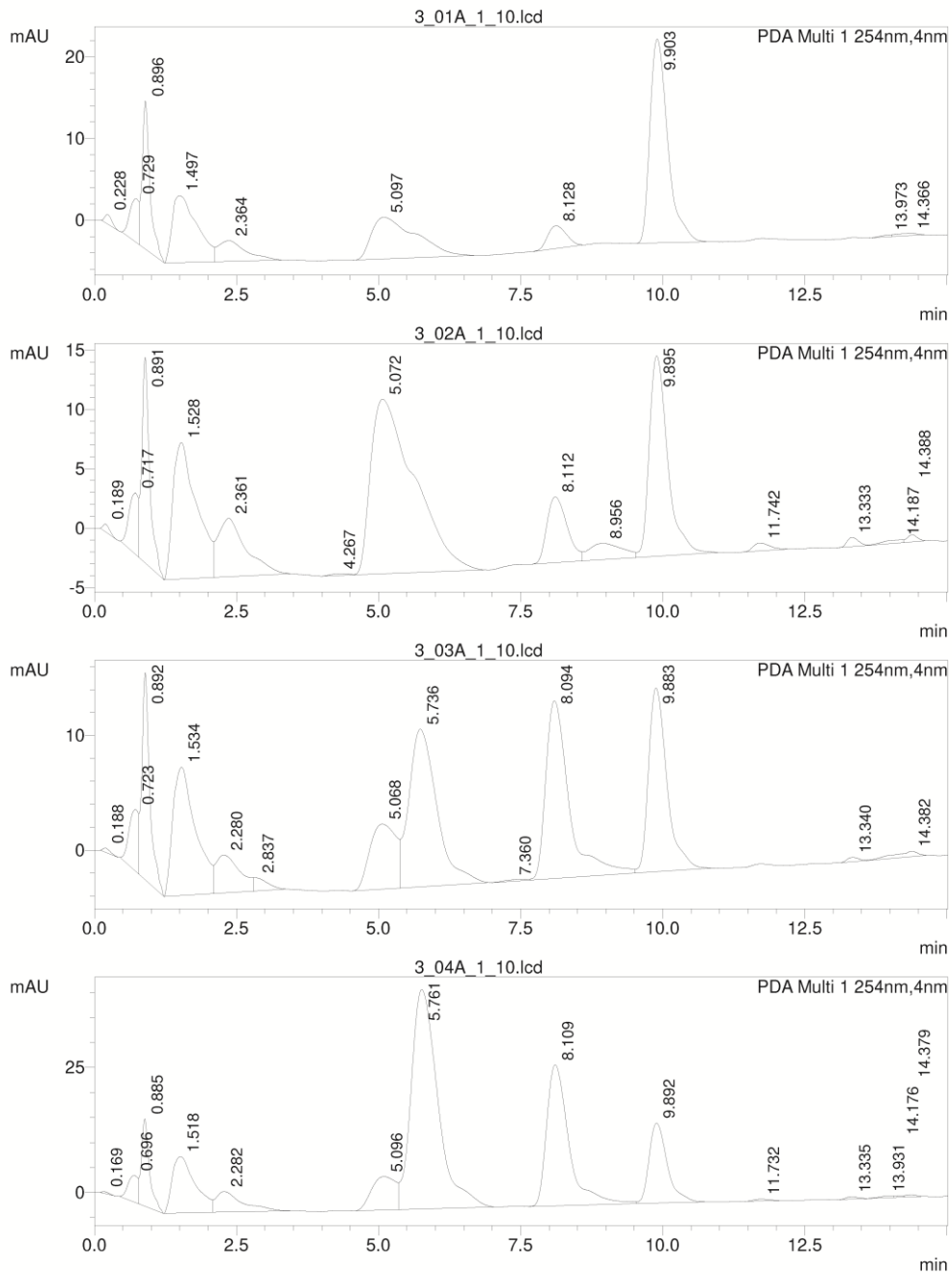


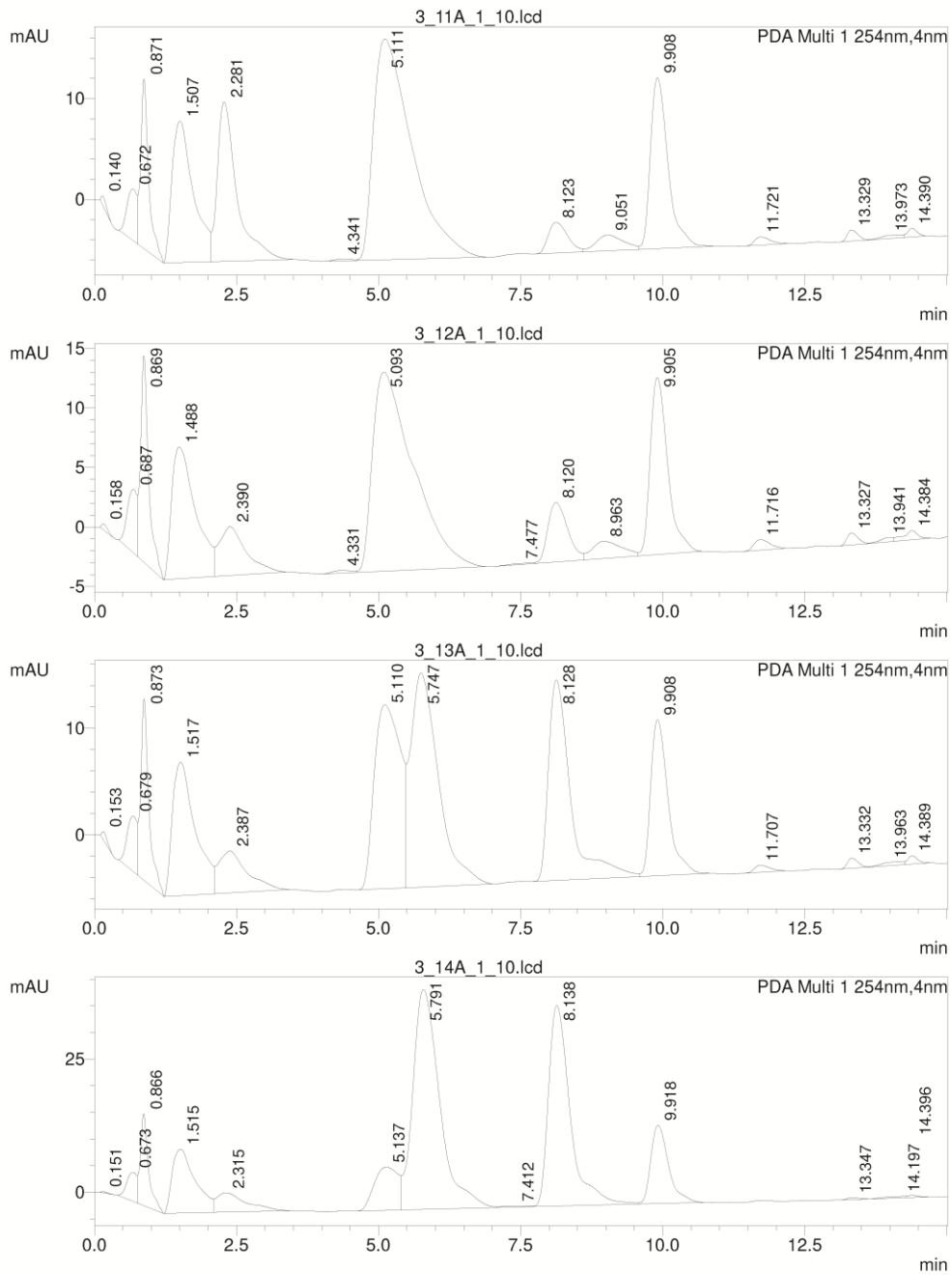
<< PDA >>
ID#1 Compound Name: Criseno

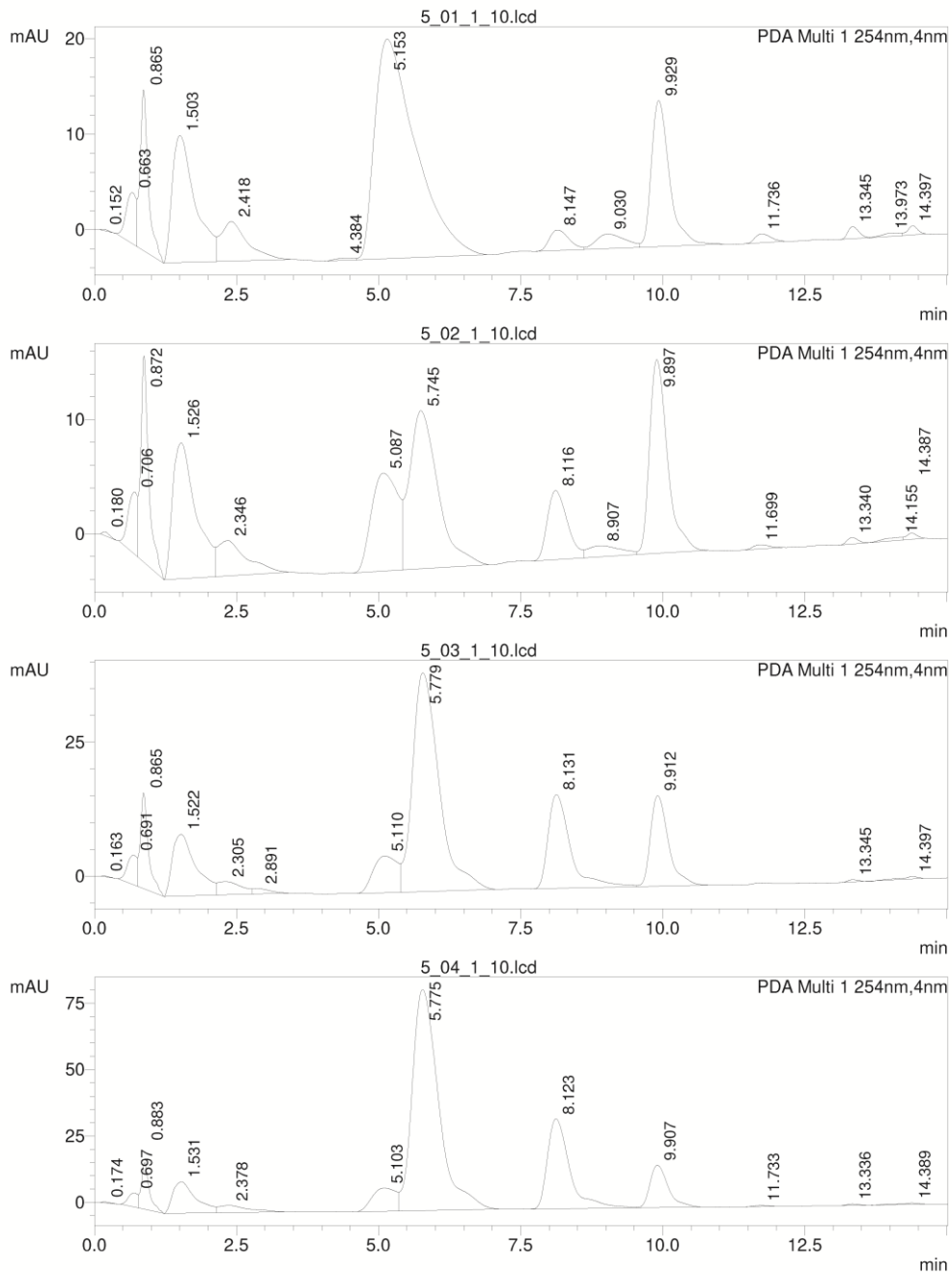
Data File Name	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SM_PYR_1_10.lcd	SM_PYR_1_10		0.000	0	0	0.000
SM_PHE_1_10.lcd	SM_PHE_1_10		0.000	0	0	0.000
SM_CRY_1_10.lcd	SM_CRY_1_10		9.958	5901874	269307	9.947
5.01_INI_1_100.lcd	5.01_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
5.02_INI_1_100.lcd	5.02_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
5.03_INI_1_100.lcd	5.03_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
5.04_INI_1_1000.lcd	5.04_INI_1_1000		0.000	0	0	0.000
5.14_INI_1_1000.lcd	5.14_INI_1_1000		0.000	0	0	0.000
5.13_INI_1_100.lcd	5.13_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
5.12_INI_1_100.lcd	5.12_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
5.11_INI_1_100.lcd	5.11_INI_1_100		0.000	0	0	0.000
Average			9.958	5901874	269307	9.947
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			9.958	5901874	269307	9.947
Minimum			9.958	5901874	269307	9.947
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

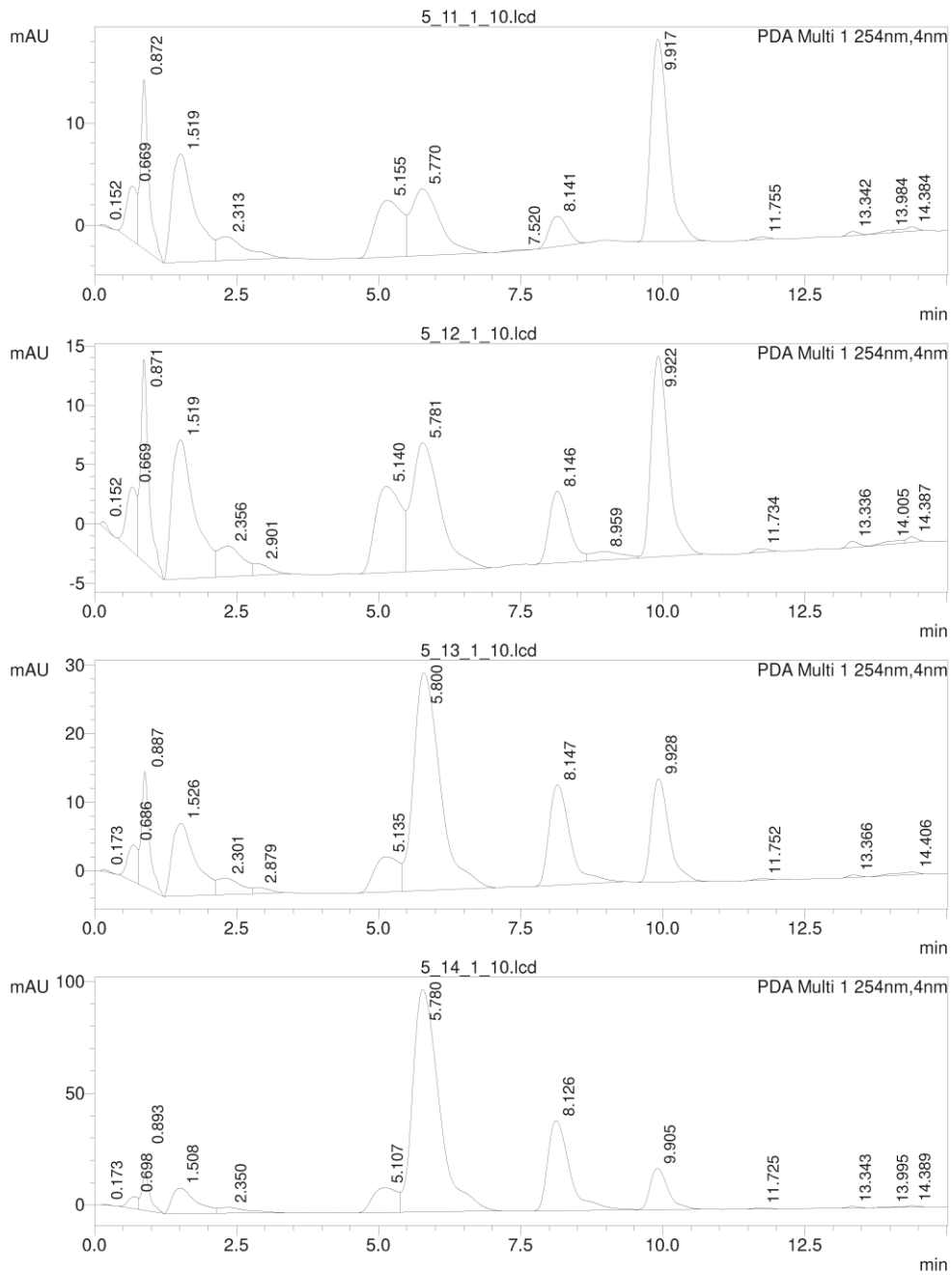
==== Shimadzu LabSolutions Browser Report ====

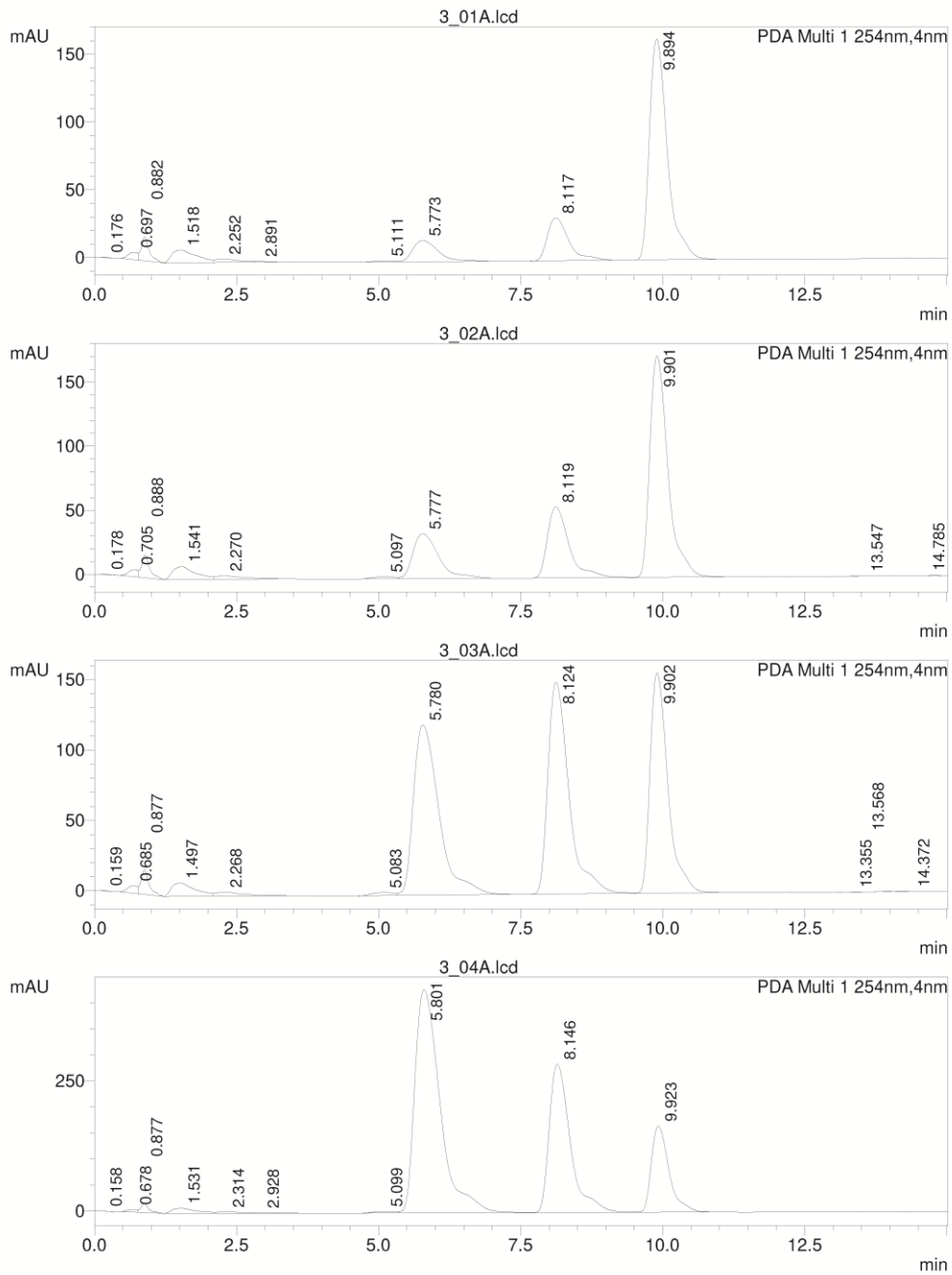


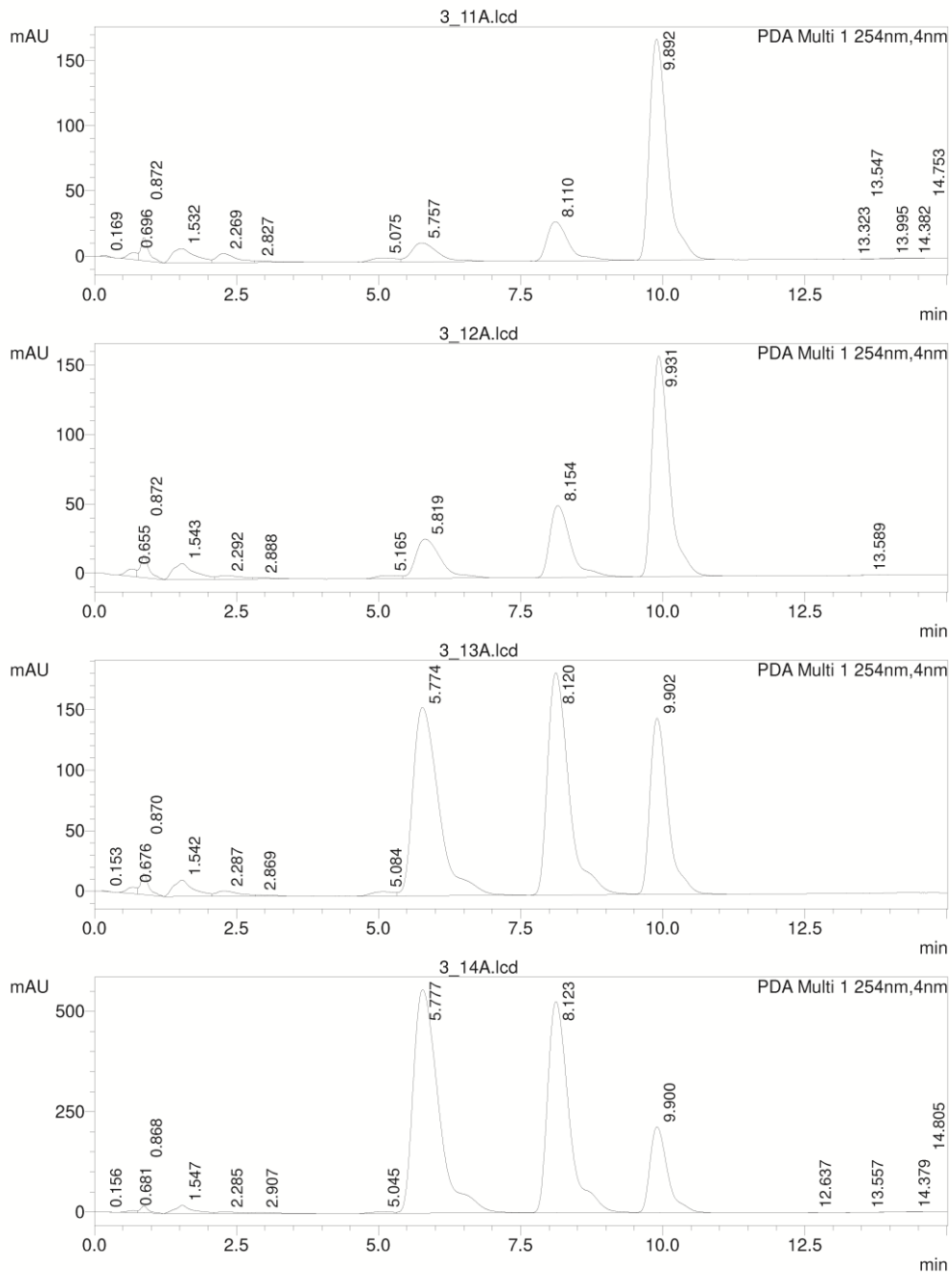


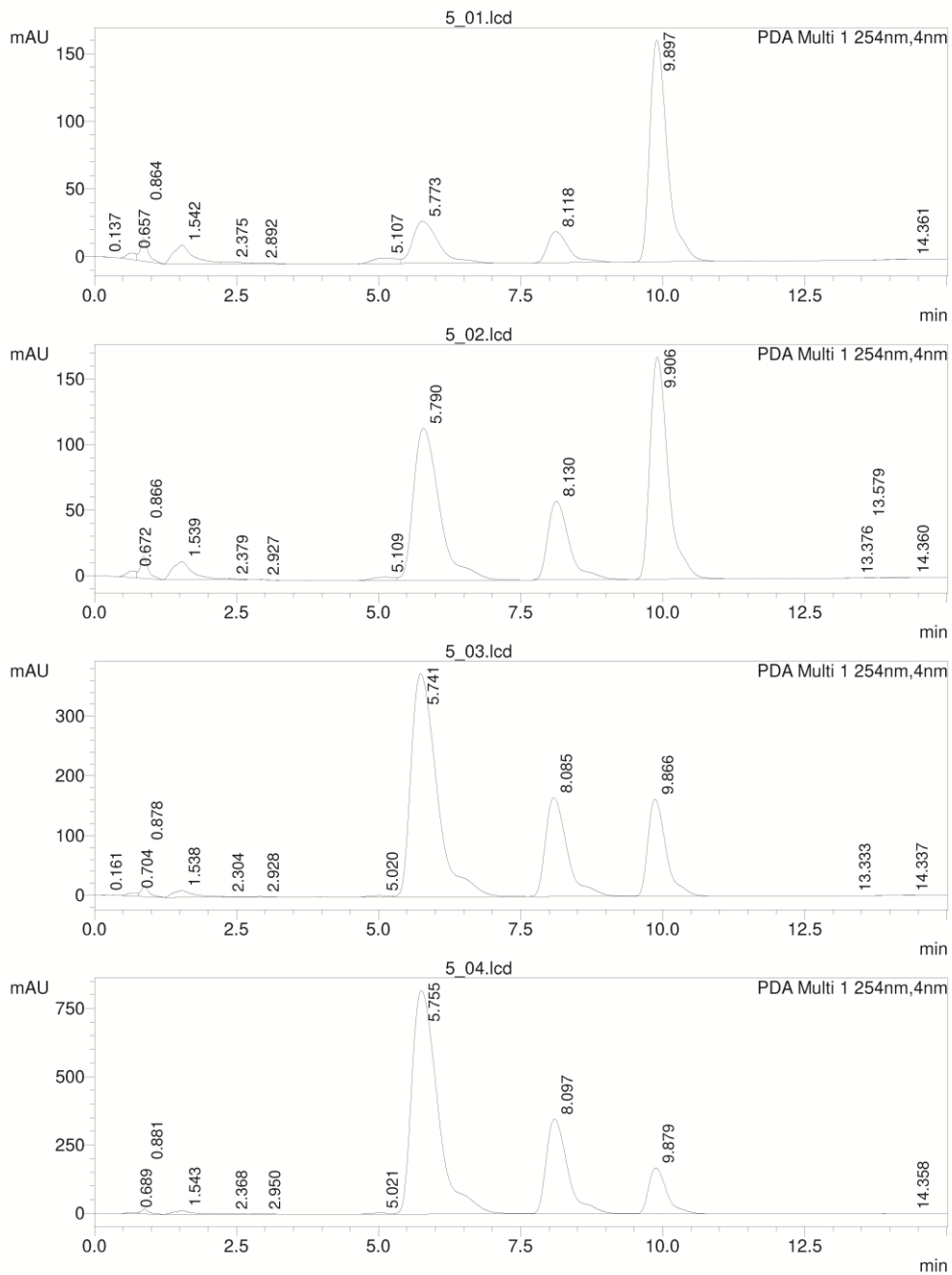


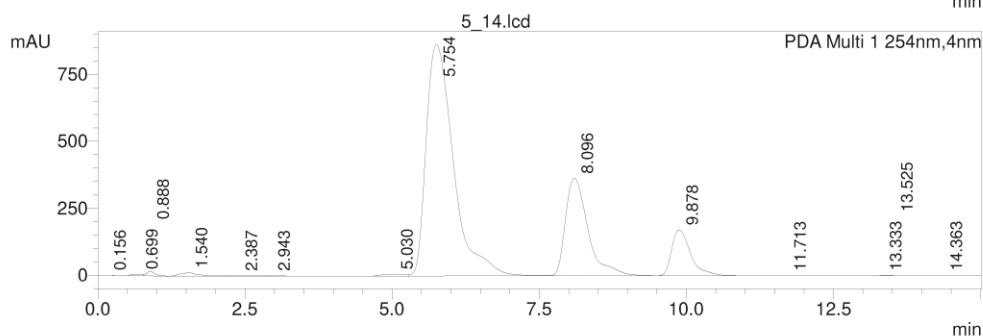
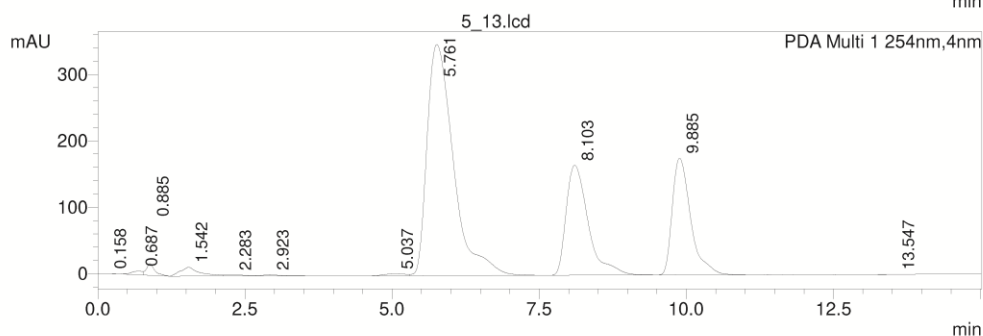
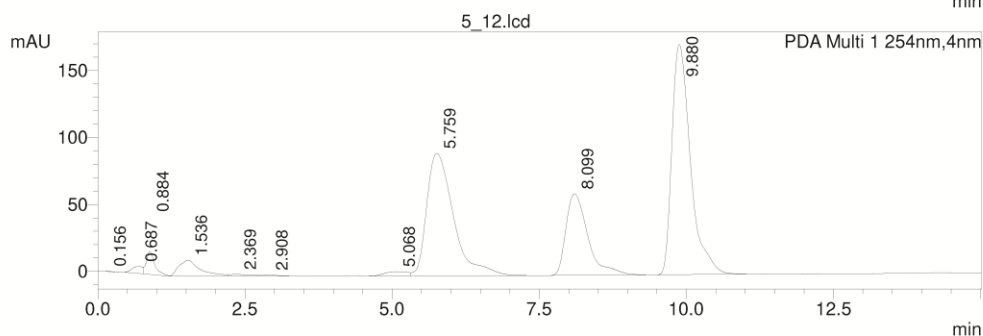
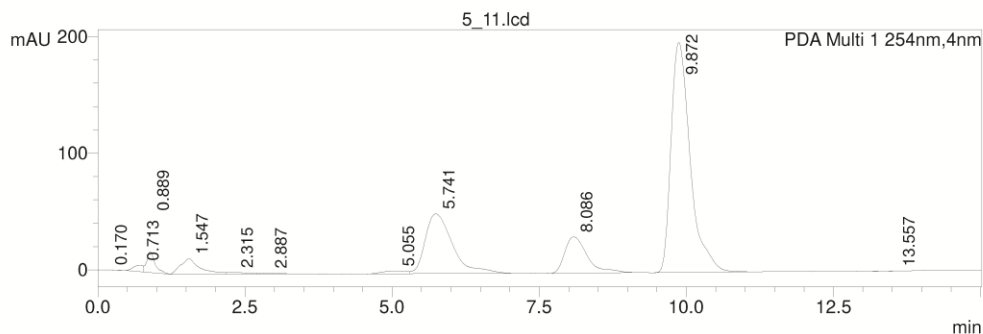












<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Criseno

Data File Name	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SM_PHE_1_10.lcd	SM_PHE_1_10		0.000	0	0	0.000
SM_PYR_1_10.lcd	SM_PYR_1_10		0.000	0	0	0.000
SM_CRY_1_10.lcd	SM_CRY_1_10		9.918	6688108	303352	11.279

06-07-2018 14:51:19 Page 10 / 10

Data File Name	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
3_OBRANCO.lcd	3_OBRANCO		9.981	3316588	150846	5.569
3_01A_1_10.lcd	3_01A_1_10		9.903	547317	24941	0.880
3_02A_1_10.lcd	3_02A_1_10		9.895	381979	16864	0.600
3_03A_1_10.lcd	3_03A_1_10		9.883	363111	16024	0.568
3_04A_1_10.lcd	3_04A_1_10		9.892	355787	16012	0.556
3_11A_1_10.lcd	3_11A_1_10		9.908	364676	16949	0.571
3_12A_1_10.lcd	3_12A_1_10		9.905	319392	14872	0.494
3_13A_1_10.lcd	3_13A_1_10		9.908	310865	14625	0.480
3_14A_1_10.lcd	3_14A_1_10		9.918	319035	14721	0.493
5_01_1_10.lcd	5_01_1_10		9.929	338348	15271	0.526
5_02_1_10.lcd	5_02_1_10		9.897	374976	16971	0.588
5_03_1_10.lcd	5_03_1_10		9.912	371004	16914	0.581
5_04_1_10.lcd	5_04_1_10		9.907	355560	15973	0.555
5_11_1_10.lcd	5_11_1_10		9.917	426175	19829	0.675
5_12_1_10.lcd	5_12_1_10		9.922	361307	16923	0.565
5_13_1_10.lcd	5_13_1_10		9.928	325678	15037	0.505
5_14_1_10.lcd	5_14_1_10		9.905	405968	18538	0.641
3_01A.lcd	3_01A		9.894	3567518	162804	5.994
3_02A.lcd	3_02A		9.901	3818183	172634	6.419
3_03A.lcd	3_03A		9.902	3414246	156539	5.735
3_04A.lcd	3_04A		9.923	3574878	165872	6.007
3_11A.lcd	3_11A		9.892	3713781	169758	6.242
3_12A.lcd	3_12A		9.931	3353606	159058	5.632
3_13A.lcd	3_13A		9.902	3195767	145823	5.365
3_14A.lcd	3_14A		9.900	4604052	214398	7.750
5_01.lcd	5_01		9.897	3535373	163714	5.940
5_02.lcd	5_02		9.906	3770727	169600	6.338
5_03.lcd	5_03		9.866	3588954	162962	6.031
5_04.lcd	5_04		9.879	3718811	168913	6.251
5_11.lcd	5_11		9.872	4458447	197040	7.503
5_12.lcd	5_12		9.880	3760431	171767	6.321
5_13.lcd	5_13		9.885	3822472	175670	6.426
5_14.lcd	5_14		9.878	3776308	170502	6.348
Average			9.904	2223513	101521	3.718
%RSD			0.215	83.731	83.584	84.785
Maximum			9.981	6688108	303352	11.279
Minimum			9.866	310865	14625	0.480
Standard Deviation			0.021	1861762	84855	3.153

ANEXO V

- **Retas de Calibração**

- Criseno

Tabela A.06: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de criseno

Solução	Solução Padrão	Concentração [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Área do pico $\lambda=254\text{ nm}$
Criseno 9	Sol. Criseno $5 \cdot 10^{-1}$	0,10	68,024
Criseno 8	0,25	0,25	147,755
Criseno 7	0,50	0,50	315,441
Criseno 6	0,75	0,75	464,631
Criseno 5	Sol. Criseno $1 \cdot 10^{-1}$	1,00	620,002
Criseno 4	2,50	2,50	1508,273
Criseno 3	5,00	5,00	2975,74
Criseno 2	7,50	7,50	4517,554
Criseno 1	Sol. Stock $\cdot 10^{-1}$	10,00	5940,323
Stock Criseno	—	100,00	

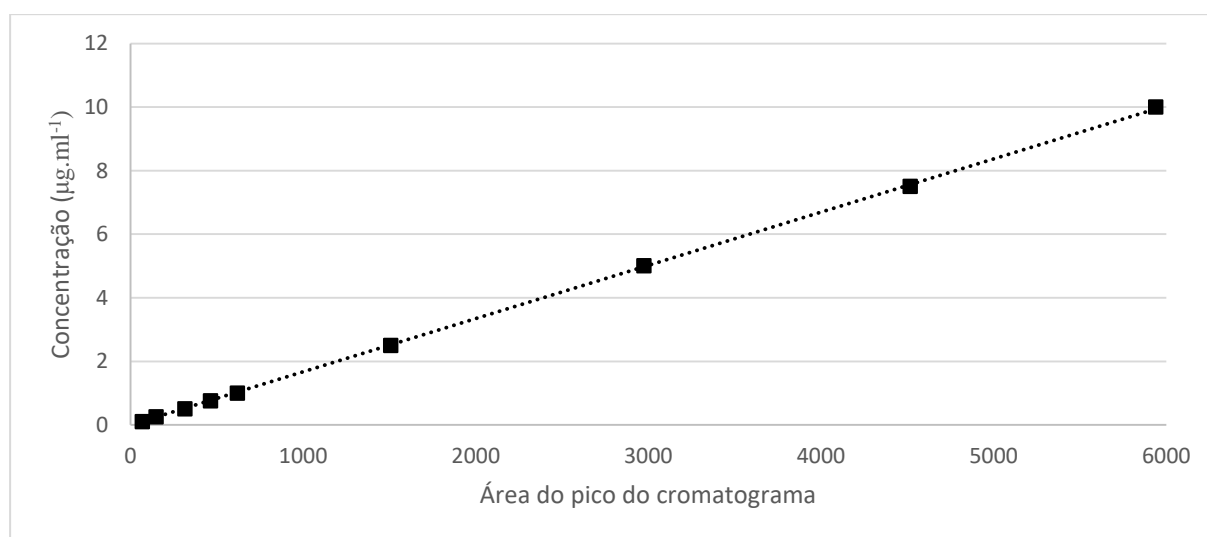


Figura A.01: Reta de calibração obtida a partir de concentrações conhecidas de criseno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0017x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999.

- Pireno

Tabela A.07: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de pireno

Solução	Solução Padrão	Concentração [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Área do pico $\lambda=254\text{ nm}$
Pireno 9	Sol. Pireno5 * 10^{-1}	0,10	15,48
Pireno 8	0,25	0,25	36,64
Pireno 7	0,50	0,50	67,47
Pireno 6	0,75	0,75	102,92
Pireno 5	Sol. Pireno 1 * 10^{-1}	1,00	138,96
Pireno 4	2,50	2,50	347,51
Pireno 3	5,00	5,00	687,13
Pireno 2	7,50	7,50	1002,58
Pireno 1	Sol. Stock * 10^{-1}	10,00	1364,40
Stock Pireno	—	100,00	

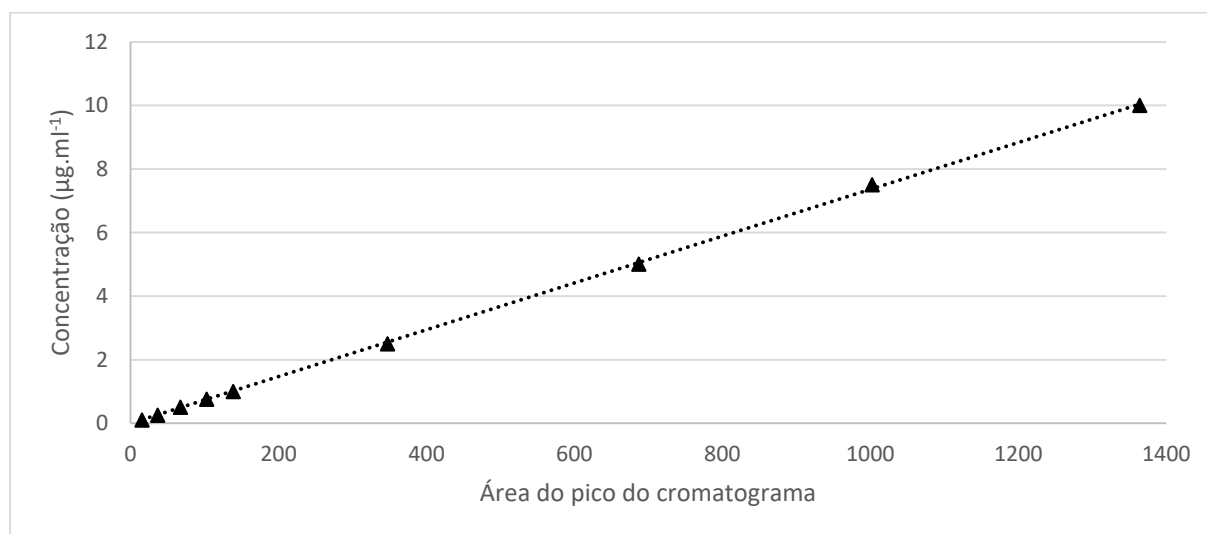


Figura A.02: Retas de calibração obtidas a partir de concentrações conhecidas de pireno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0074x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9998.

- Fenantreno

Tabela A.08: Resultados da análise UPLC para as soluções padrão de fenantreno

Solução	Solução Padrão	Concentração [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Área do pico $\lambda=254\text{ nm}$
Fenantreno 9	Sol. Fenantreno5 * 10^{-1}	0,10	
Fenantreno 8	0,25	0,25	281,136
Fenantreno 7	0,50	0,50	524,021
Fenantreno 6	0,75	0,75	754,056
Fenantreno 5	Sol. Fenantreno 1 * 10^{-1}	1,00	998,777
Fenantreno 4	2,50	2,50	2415,873
Fenantreno 3	5,00	5,00	4649,831
Fenantreno 2	7,50	7,50	6830,725
Fenantreno 1	Sol.Stock * 10^{-1}	10,00	8997,124
Stock Fenantreno	—	100,00	

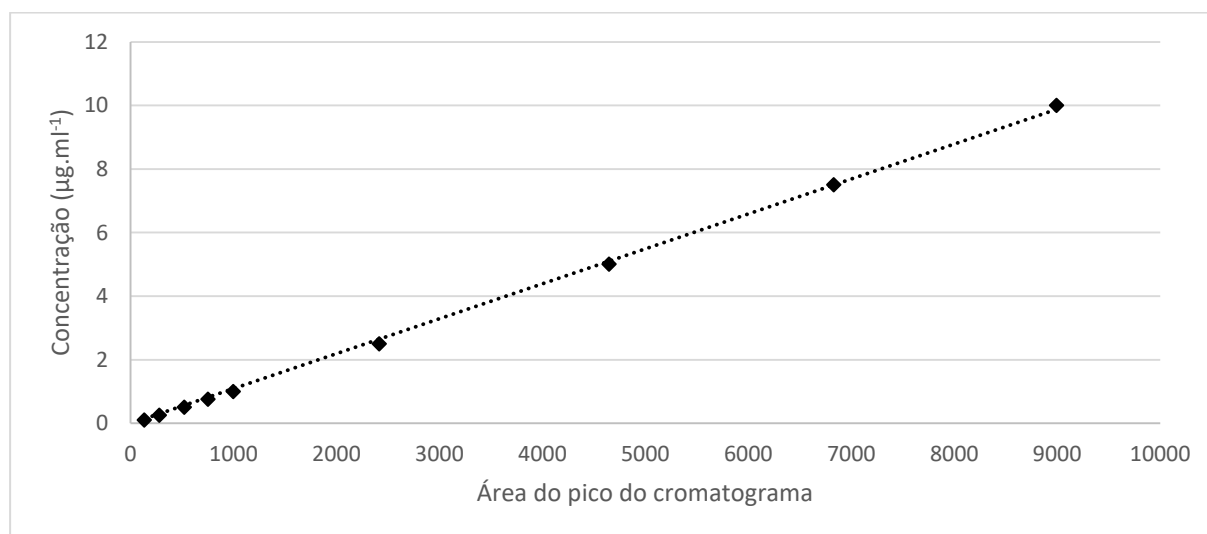


Figura A.03: Retas de calibração obtidas a partir de concentrações conhecidas de fenantreno dissolvido em acetonitrilo para o comprimento de onda (λ) de 254 nm. A reta obtida é $y = 0,0011x$, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9993.

ANEXO VI

- **Taxa de eficiência da extração dos PAH por agitação**

Antes do início de cada extração foi adicionado a cada amostra 7,5 ml de solução de criseno com uma concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Assim, e como não existe degradação de criseno durante a extração, sabemos a quantidade exata de criseno que deveria existir após a extração.

Tabela A.09: Resultados da extração com n-hexano e cálculo da taxa de recuperação utilizando como testemunho solução de criseno.

AMOSTRA	VOLUME (ml)	CRY (μg)	VOLUME n-hexano (ml)	[CRY]_i $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	[CRY]_m $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	TAXA DE RECUPERAÇÃO (TR_{CRY})
Branco_1	7,5	750,6	100	7,51	6,87	0,92
BE050_1	7,5	750,6	100	7,51	6,08	0,81
BE100_1	7,5	750,6	96	7,82	6,55	0,84
BE200_1	7,5	750,6	106	7,08	6,27	0,89
BE500_1	7,5	750,6	110	6,82	6,66	0,98
BAA050_1	7,5	750,6	98	7,66	6,71	0,88
BAA100_1	7,5	750,6	102	7,36	6,69	0,91
BAA200_1	7,5	750,6	104	7,22	6,42	0,89
BAA500_1	7,5	750,6	112	6,70	6,66	0,99
Branco_2	7,5	750,6	106	7,08	5,64	0,80
BE050_2	7,5	750,6	98	7,66	6,06	0,79
BE100_2	7,5	750,6	96	7,82	6,49	0,83
BE200_2	7,5	750,6	106	7,08	5,80	0,82
BE500_2	7,5	750,6	102	7,36	6,08	0,83
BAA050_2	7,5	750,6	98	7,66	6,31	0,82
BAA100_2	7,5	750,6	102	7,36	5,70	0,77
BAA200_2	7,5	750,6	112	6,70	5,43	0,81
BAA500_2	7,5	750,6	94	7,99	7,83	0,98
BAB050_1	7,5	750,6	102	7,36	5,88	0,80
BAB100_1	7,5	750,6	96	7,82	6,39	0,82
BAB200_1	7,5	750,6	108	6,95	6,20	0,89
BAB500_1	7,5	750,6	102	7,36	6,18	0,84

BAB050_2	7,5	750,6	76	9,88	7,41	0,75
BAB100_2	7,5	750,6	100	7,51	6,27	0,83
BAB200_2	7,5	750,6	108	6,95	6,02	0,87
BAB500_2	7,5	750,6	104	7,22	6,66	0,92

$$[CRY]_m = 0,0017 * AP_{CRY}$$

$$[CRY]_t = \frac{[CRY]_{sm} (\mu\text{g. ml}^{-1}) * V_{sm} (ml)}{V_{n \text{ hexano}} (ml)}$$

$$TR_{CRY} = \frac{[CRY]_m (\mu\text{g.ml}^{-1})}{[CRY]_t (\mu\text{g.ml}^{-1})}$$

Exemplo cálculo para a amostra BAA050_1

$$[CRY]_m = 0,0017 * APC_{CRY} = 0,0017 * 3945,58 = 6,71 (\mu\text{g. ml}^{-1})$$

$$[CRY]_t = \frac{[CRY]_{sm} (\mu\text{g. ml}^{-1}) * V_{sm} (ml)}{V_{n \text{ hexano}} (ml)} = \frac{100,08 (\mu\text{g. ml}^{-1}) * 7,5 (ml)}{98 (ml)} = 7,66 (\mu\text{g. ml}^{-1})$$

$$TR_{CRY} = \frac{[CRY]_m (\mu\text{g.ml}^{-1})}{[CRY]_t (\mu\text{g.ml}^{-1})} = \frac{6,71 (\mu\text{g.ml}^{-1})}{7,66 (\mu\text{g.ml}^{-1})} = 0,88$$

ANEXO VII

- **Resultados Cromatograma UPLC**

Tabela A.10: Resultados UPLC para cada uma das amostras (APC – Área do Pico do Cromatograma)

AMOSTRA	APC_{CRY}	APC_{PYR}	APC_{PHE}
Branco_1	4041,69	-	-
BE050_1	3578,70	479,29	381,98
BE100_1	3852,51	-	831,32
BE200_1	3690,50	-	2517,51
BE500_1	3915,05	-	-
BAA050_1	3945,58	793,19	1200,14
BAA100_1	3936,53	-	2035,66
BAA200_1	3774,07	-	-
BAA500_1	3916,55	-	-
Branco_1* 10⁻¹	-	-	-
BE050_1* 10⁻¹	-	45,33	-
BE100_1* 10⁻¹	-	138,17	-
BE200_1* 10⁻¹	-	401,49	-
BE500_1* 10⁻¹	-	1262,72	2069,74
BAA050_1* 10⁻¹	-	74,32	-
BAA100_1* 10⁻¹	-	168,81	-
BAA200_1* 10⁻¹	-	467,43	967,64
BAA500_1* 10⁻¹	-	1128,48	3108,35
Branco_2	3316,59	-	-
BE050_2*10⁻¹	-	64,33	-
BE100_2*10⁻¹	-	136,62	-
BE200_2*10⁻¹	-	444,92	471,77
BE500_2*10⁻¹	-	770,61	1435,67
BAA050_2*10⁻¹	-	72,11	-
BAA100_2*10⁻¹	-	120,56	-
BAA200_2*10⁻¹	-	511,02	683,62
BAA500_2*10⁻¹	-	1001,83	1355,95
BE050_2	3567,52	819,79	490,40
BE100_2	3818,18	-	1103,71
BE200_2	3414,25	-	3775,87

AMOSTRA	APC_{CRY}	APC_{PYR}	APC_{PHE}
BE500_2	3574,88	-	-
BAA050_2	3713,78	-	469,84
BAA100_2	3353,61	-	866,12
BAA200_2	3195,77	-	4922,93
BAA500_2	4604,05	-	-
BAB050_1	3535,37	583,69	979,96
BAB100_1	3770,73	-	3685,23
BAB200_1	3588,95	-	-
BAB500_1	3718,81	-	-
BAB050_2	4458,45	827,76	1650,95
BAB100_2	3760,43	-	2883,26
BAB200_2	3822,47	-	-
BAB500_2	3776,31	-	-
BAB050_1* 10⁻¹	-	-	-
BAB100_1* 10⁻¹	-	148,44	-
BAB200_1* 10⁻¹	-	478,59	1326,35
BAB500_1* 10⁻¹	-	922,99	2699,44
BAB050_2* 10⁻¹	-	-	-
BAB100_2* 10⁻¹	-	144,99	-
BAB200_2* 10⁻¹	-	379,81	1031,78
BAB500_2* 10⁻¹	-	1083,19	3220,24

Tabela A.10: Resultados UPLC para cada uma das amostras (APC – Área do Pico do Cromatograma) (continuação)

- **Resultados UPLC – Bioestimulação**

Tabela A.11: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioestimulação

	$[PYR]_t$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PHE]_t$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PYR]_m$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PHE]_m$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PYR]_c$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$[PHE]_c$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Branco_1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BE050_1	9,51	10,22	3,45	0,42	4,26	0,52
BE100_1	21,04	20,94	10,22	0,91	12,21	1,09
BE200_1	48,43	48,43	29,71	2,77	33,53	3,13
BE500_1	100,88	100,98	93,44	22,77	95,80	23,34
Branco_2	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0
BE050_2	11,13	11,02	5,41	0,54	6,84	0,68
BE100_2	20,94	21,05	10,11	1,21	12,18	1,46
BE200_2	47,70	47,42	32,92	4,67	40,17	5,70
BE500_2	98,78	98,19	57,02	15,79	69,05	19,12

$$[PYR]_m = 0,0074 * APC_{PYR} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PYR]_c = \frac{[PYR]_m}{TR_{CRY}} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PHE]_m = 0,0011 * APC_{PHE} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PHE]_c = \frac{[PHE]_m}{TR_{CRY}} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

Exemplo cálculo para a amostra BE050_1

$$[PYR]_m = 0,0074 * APC_{PYR} = 0,0074 * 466,30 = 3,45 (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PYR]_c = \frac{[PYR]_m}{TR_{CRY}} = \frac{3,45}{0,81} = 4,26 (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PHE]_m = 0,0011 * APC_{PHE} = 0,0011 * 381,98 = 0,42 (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

$$[PHE]_c = \frac{[PHE]_m}{TR_{CRY}} = \frac{0,42}{0,81} = 0,52 (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$$

- **Resultados UPLC – Bioaugmentação A**

Tabela A.12: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioaugmentação A

	[PYR]_t (μg.ml⁻¹)	[PHE]_t (μg.ml⁻¹)	[PYR]_m (μg.ml⁻¹)	[PHE]_m (μg.ml⁻¹)	[PYR]_c (μg.ml⁻¹)	[PHE]_c (μg.ml⁻¹)
BAA050_1	11,13	10,51	5,68	1,32	6,49	1,51
BAA100_1	20,61	20,70	12,49	2,24	13,74	2,46
BAA200_1	48,04	49,58	34,59	10,64	38,91	11,97
BAA500_1	90,11	90,20	83,51	34,19	84,06	34,42
BAA050_2	10,42	10,53	5,63	0,52	6,83	0,63
BAA100_2	19,72	20,40	9,33	0,95	12,05	1,23
BAA200_2	44,81	44,90	37,82	6,47	46,65	7,98
BAA500_2	106,91	108,83	74,14	14,92	75,63	15,22

$$[\text{PYR}]_m = 0,0074 * \text{APC}_{\text{PYR}}$$

$$[\text{PYR}]_c = \frac{[\text{PYR}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}}$$

$$[\text{PHE}]_m = 0,0011 * \text{APC}_{\text{PHE}}$$

$$[\text{PHE}]_c = \frac{[\text{PHE}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}}$$

Exemplo cálculo para a amostra BAA050_1

$$[\text{PYR}]_m = 0,0074 * \text{APC}_{\text{PYR}} = 0,0074 * 768,25 = 5,68 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PYR}]_c = \frac{[\text{PYR}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}} = \frac{5,68}{0,88} = 6,49 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PHE}]_m = 0,0011 * \text{APC}_{\text{PHE}} = 0,0011 * 1200,14 = 1,32 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PHE}]_c = \frac{[\text{PHE}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}} = \frac{1,32}{0,88} = 1,51 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

- **Resultados UPLC – Bioaugmentação B**

Tabela A.13: Resultado dos cálculos das concentrações teóricas, medidas e corrigidas dos poluentes para o ensaio de bioaugmentação B

	[PYR]_t (μg.ml⁻¹)	[PHE]_t (μg.ml⁻¹)	[PYR]_m (μg.ml⁻¹)	[PHE]_m (μg.ml⁻¹)	[PYR]_c (μg.ml⁻¹)	[PHE]_c (μg.ml⁻¹)
BAB050_1	9,32	10,01	4,32	1,08	5,40	1,35
BAB100_1	21,08	20,97	10,98	4,05	13,44	4,96
BAB200_1	47,66	47,66	35,42	14,59	39,67	16,34
BAB500_1	99,50	99,60	68,30	29,69	81,29	35,34
BAB050_2	14,35	13,56	6,13	1,82	8,16	2,42
BAB100_2	21,01	21,11	10,73	3,17	12,85	3,80
BAB200_2	46,40	47,88	28,11	11,35	32,46	13,11
BAB500_2	97,10	97,20	80,16	35,42	86,86	38,38

$$[\text{PYR}]_m = 0,0074 * \text{APC}_{\text{PYR}}$$

$$[\text{PYR}]_c = \frac{[\text{PYR}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}}$$

$$[\text{PHE}]_m = 0,0011 * \text{APC}_{\text{PHE}}$$

$$[\text{PHE}]_c = \frac{[\text{PHE}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}}$$

Exemplo cálculo para a amostra BAB050_2

$$[\text{PYR}]_m = 0,0074 * \text{APC}_{\text{PYR}} = 0,0074 * 827,76 = 6,13 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PYR}]_c = \frac{[\text{PYR}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}} = \frac{6,13}{0,75} = 8,16 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PHE}]_m = 0,0011 * \text{APC}_{\text{PHE}} = 0,0011 * 1650,95 = 1,82 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$

$$[\text{PHE}]_c = \frac{[\text{PHE}]_m}{\text{TR}_{\text{CRY}}} = \frac{1,82}{0,75} = 2,42 \text{ (}\mu\text{g. ml}^{-1}\text{)}$$