

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL  
MESTRADO EM ENGENHARIA CIVIL-SANEAMENTO AMBIENTAL**

**PATRÍCIA MARQUES CARNEIRO**

**REMOÇÃO DE BTEX EM BIORREACTORES ANAERÓBIOS SOB CONDIÇÕES  
METANOGÊNICAS, DESNITRIFICANTES E SULFETOGÊNICAS**

**FORTALEZA  
2012**

PATRÍCIA MARQUES CARNEIRO

**REMOÇÃO DE BTEX EM BIORREACTORES ANAERÓBIOS SOB CONDIÇÕES  
METANOGÊNICAS, DESNITRIFICANTES E SULFETOGÊNICAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Saneamento Ambiental

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.

Co-orientador: Dr. Alexandre Colzi Lopes

FORTALEZA  
2012

PATRÍCIA MARQUES CARNEIRO

**REMOÇÃO DE BTEX EM BIORREACTORES ANAERÓBIOS SOB CONDIÇÕES  
METANOGÊNICAS, DESNITRIFICANTES E SULFETOGÊNICAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil.

Aprovada em: **25 / 01 / 2012** .

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr. Alexandre Colzi Lopes (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Tédde Santaella  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
Escola de Engenharia de São Carlos – USP

Aos meus pais, meu irmão e ao meu amado esposo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por dar-me força e serenidade diante das dificuldades.

Aos meus pais, Luíz e Marilene, pelo amor e educação oferecidos, pela dedicação, compreensão e incentivo constante em minha vida.

Ao meu amado esposo, Hugo, pela compreensão, paciência, amor e cuidado.

Ao meu irmão, Felipe, pelo incentivo e carinho.

Ao professor Dr. André Bezerra dos Santos pela excelente orientação, confiança e apoio.

Ao professor Dr. Alexandre Colzi Lopes pelos ensinamentos, orientação e grande apoio durante a execução dos experimentos.

A professora Dr. Sandra Tédde Santaella e ao professor Dr. Marcelo Zaiat por aceitarem participar da banca examinadora.

Aos colegas de projeto e amigos, Mayara e Paulo Igor pela ajuda indispensável nos experimentos e pela grande amizade.

Aos amigos Gilmar, Germana, Antônio, Neyliane e Márcia pela companhia sempre agradável, ajudas e conselhos.

Aos companheiros do LABOSAN, Raquel, Carla Jamile, Paloma, Michael Douglas e Natam pela ajuda nas análises.

À amiga Karina pela amizade companheirismo, compreensão, apoio, conselhos e momentos divertidos.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Isabelly, Laíz, Ticiane, Geraldo, Atacísio e Livia pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental pelo conhecimento transmitido.

Ao Laboratório de Análises Traços (LAT) da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade na realização de análises cromatográficas, na pessoa do professor Dr. Ronaldo Nascimento e dos amigos, Clerton e Ari pela disposição em contribuir com a execução dessa pesquisa e pelos conselhos valiosos.

À LUBNOR, na pessoa do Engenheiro de Processamento Sênior, Carlos Gurgel, por permitir a coleta da amostra utilizada nos experimentos.

À FUNCAP pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro (Projeto Funcap N°: 078.01.00/09).

Ao CNPQ pelo apoio financeiro (Projeto CNPq N°. 481270/2010-8).

A todos que de alguma forma foram importantes para a realização deste trabalho.

*“Para chegar, onde quer que seja, não é preciso dominar a força, mas sim, é preciso ter paciência, e é preciso, antes de tudo, sonhar.”*

Alejandra Huamán

## RESUMO

Os BTEX são os hidrocarbonetos monoaromáticos que agregam maior risco ao meio ambiente, principalmente devido às características tóxicas e carcinogênicas. Dentre os métodos usualmente aplicados na remoção de BTEX em águas contaminadas, o tratamento anaeróbio tem merecido destaque principalmente em relação aos baixos custos. Nesse sentido, buscou-se avaliar a remoção anaeróbia de BTEX sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas. Adicionalmente, desenvolveu-se uma metodologia analítica de detecção dos BTEX por cromatografia gasosa, utilizando-se a técnica do *headspace*. Foram realizados ensaios em fluxo contínuo em três biorreatores anaeróbios em três fases complementares e subsequentes: 1) aclimatação, com etanol como única fonte de carbono e energia; 2) metanogênica, na presença de etanol e BTEX; e 3) mesmas condições da fase anterior, mas com dois reatores sendo suplementados com os aceptores nitrato e sulfato, respectivamente, numa razão DQO/acceptor de aproximadamente 11. Preliminarmente, avaliou-se a atividade metanogênica específica (AME) do consórcio microbiano utilizando três substratos distintos (glicose, ácido acético, e mistura de ácidos graxos voláteis), por meio do qual o volume produzido de biogás e sua composição em termos de metano e gás carbônico foram determinados, respectivamente, pelo método manométrico e por cromatografia gasosa. Na segunda fase do experimento em fluxo contínuo, os reatores foram alimentados com solução sintética de BTEX (~ 5 mg/L de cada composto) solubilizados em etanol, e operados com um TDH de 48 h, a 27°C. As concentrações dos BTEX foram determinadas por metodologia desenvolvida e validada neste estudo, por meio da qual os BTEX eram extraídos por *headspace* (técnica que foi otimizada utilizando delineamento composto central rotacional), e analisados por cromatografia. Ressalte-se que o método analítico proposto para a determinação de BTEX mostrou-se bastante seletivo, preciso, linear e com baixos valores de limite de detecção e quantificação, 0,13 a 0,48 µg/L e 0,43 a 1,61 µg/L, respectivamente. A glicose foi o melhor substrato para o consórcio microbiano utilizado, sendo obtido um valor de AME de 0,63 gDQO/gSSV.d. Os reatores avaliados mostraram-se bastante estáveis durante todas as fases do experimento, com elevadas remoções de DQO (em média 90%). Com relação à remoção de BTEX, de uma forma geral, as menores eficiências de remoção foram encontradas para o benzeno (40-63%), independente do tipo de acceptor final de elétrons, indicando a difícil biodegradação desse composto sob condições anaeróbias, enquanto que as maiores eficiências foram observadas para os xilenos, chegando a remoções de até 90%. Tais valores levam em conta possíveis interferências de adsorção e de volatilização. Também foi notado que deve haver uma sinergia entre os distintos compostos e esta pode exercer um forte efeito sobre as eficiências de remoção dos BTEX. Comparando-se os três reatores, notou-se que não houve melhora significativa nas eficiências de remoção dos compostos na presença de nitrato ou sulfato, mas sim uma tendência de aumento na eficiência entre os reatores na ordem: reator metanogênico > Reator desnitrificante > Reator sulfetogênico. Tal desempenho pode ser atribuído ao fato de os microrganismos sulfetogênicos e desnitrificantes terem preferido oxidar o etanol e não os BTEX para a redução dos aceptores, diminuindo assim as eficiências de remoção de BTEX nessas condições.

Palavras-chave: tratamento anaeróbio; hidrocarbonetos monoaromáticos; *headspace*; nitrato; sulfato.

## ABSTRACT

BTEX are monoaromatic hydrocarbons compounds which represent a high risk to the environment, mainly due to their toxic and carcinogenic characteristics. Among the methods usually applied to the removal of BTEX from contaminated waters, anaerobic treatment has drawn attention especially because of its low cost. Accordingly, anaerobic biodegradation of BTEX was assessed under methanogenic, denitrifying and sulfidogenic conditions. Additionally, an analytical method for detection of BTEX by gas chromatography using the technique of headspace was developed. Continuous-flow experiments were conducted using three anaerobic bioreactors in three subsequent complementary phases: 1) adaptation, with ethanol as the sole source of carbon and energy, 2) methanogenic, in presence of ethanol and BTEX, and 3) the same conditions as the previous phase but with two reactors supplemented with nitrate and sulfate acceptors, respectively, at a COD/acceptor ratio of approximately 11. Preliminarily, the specific methanogenic activity (SMA) of the microbial consortium was assessed using three different substrates (glucose, acetic acid and a mixture of volatile fatty acids), in which the volume of biogas produced and its composition in terms of methane and carbon dioxide were determined, respectively, by manometric method and gas chromatography. In the second phase of the continuous-flow experiment, the reactors were fed with a synthetic solution of BTEX (~ 5 mg/L of each compound) dissolved in ethanol and were operated at an HRT of 48 h at an average temperature of 27 °C. Concentrations of BTEX compounds were determined by the methodology developed and validated in this study, by which the BTEX were extracted by headspace (technique optimized by central composite rotational design) and analyzed by chromatography. The proposed analytical method for the determination of BTEX was very selective, precise, linear and presented low detection limit and quantification values, from 0.13 to 0.48 µg/L and from 0.43 to 1.61 µg/L, respectively. Glucose was the best substrate for the microbial consortium used, and a SMA value of 0.63 g COD/g SSV·d was obtained. The reactors evaluated were quite stable during all phases of the experiment with high COD removals (90% on average). Regarding BTEX removal, in general, the lowest removal efficiencies were found for benzene (40-63%), regardless of the final electron acceptor used, indicating that the biodegradation of this compound is difficult under anaerobic conditions, whereas the highest efficiencies were observed for xylenes, reaching a 90% removal. These numbers already took into account the possible interference of adsorption and volatilization. It was also noted that there should be a synergy between the different compounds and this may exert a strong effect on the BTEX removal efficiencies. Comparing the three reactors studied, it was not observed a significant improvement in the removal efficiencies of the compounds in the presence of nitrate or sulfate, but a tendency of an increase in efficiency between the reactors was verified as follows: methanogenic reactor > denitrifying reactor > sulfidogenic reactor. This performance can be attributed to the fact that the denitrifying and sulfidogenic microorganisms have preferred to oxidize ethanol instead of BTEX to reduce the acceptors, thus decreasing BTEX removal efficiencies under these conditions.

Keywords: anaerobic treatment; monoaromatic hydrocarbons; headspace; nitrate; sulfate.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular dos BTEX .....	22
Figura 2 – Possibilidades de conduzir experimentos para duas variáveis (fatores A e B): (a) análise univariada; (b) matriz com todas as combinações possíveis; e (c) delineamento composto central rotacional.....	28
Figura 3 - Cromatógrafo HS-GC-PID-FID utilizado na determinação dos BTEX estudados.	47
Figura 4 – Sistema de Topo da Unidade de Destilação à Vácuo da LUBNOR .....	51
Figura 5 – Equipamento utilizado na realização do teste de Atividade Metanogênica Específica (AME). .....	54
Figura 6 – Cromatógrafo GC-TCD utilizado para a determinação e quantificação do metano e gás carbônico no biogás.....	55
Figura 7 – Conjunto de reatores UASB usados na inoculação e na avaliação inicial do lodo anaeróbio utilizado neste estudo.....	56
Figura 8 – Reatores anaeróbios utilizados durante os experimentos em fluxo contínuo .....	58
Figura 9 – Frascos de armazenamento de afluente e bolsas de pressurização. ....	59
Figura 10 – Quadro elétrico onde eram mensurados os pulsos gerados pelo deslocamento do líquido gerado pela produção de biogás .....	60
Figura 11 – Recipiente usado no deslocamento de líquido gerado pela produção de biogás...	61
Figura 12 – Procedimento de diluição do biogás em bulbo de vidro para quantificação de NH <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> S.....	61
Figura 13 – Cromatograma dos BTEX detectado pelo FID na concentração de 50 µg/L.....	69
Figura 14 – Cromatograma dos BTEX detectado pelo PID na concentração de 50 µg/L.....	70
Figura 15 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o BZ extraído por HS .....	73
Figura 16 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o TO extraído por HS .....	73
Figura 17 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o EB extraído por HS .....	73
Figura 18 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o PX/MX extraído por HS....	74
Figura 19 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o OX extraído por HS.....	74
Figura 20 – Superfície de resposta para a mistura de BTEX com valores fixados de volume de amostra (15 mL) e salinidade (0,0).....	75
Figura 21 – Cromatograma dos BTEX presentes na amostra coletada da torre de resfriamento da LUBNOR, adicionadas de clorobenzeno (PI) e analisadas por HS-CG-PID .....	76
Figura 22 – Atividade metanogênica específica (AME) na presença de glicose e de acetato.	80

Figura 23 – Variação das vazões molares de metano, dióxido de carbono, amônia e gás sulfídrico no biogás produzido pelos reatores desde o início da Fase I .....	85
Figura 24 – Valores de DQO monitorados no afluente e no efluente e as correspondentes eficiências de remoção durante as diferentes fases da corrida experimental nos reatores anaeróbios.....	88
Figura 25 – Diagrama de caixa e bigodes para os valores de DQO monitorados no afluente e no efluente durante as diferentes fases experimentais nos reatores anaeróbios. ....	89
Figura 26 – Concentrações afluente e efluente dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-/m-xileno, e o-xileno) nos reatores RM, RN e RS nas Fases II e III.....	93
Figura 27 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações dos BTEX afluentes e efluentes aos reatores, durante a Fase II. ....	98
Figura 28 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações dos BTEX afluentes e efluentes aos reatores, durante a Fase III.....	99
Figura 29 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações afluentes e efluentes dos BTEX, durante a Fase II e a Fase III, nos reatores RM, RN e RS .....	104

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estrutura e parâmetros físico-químicos importantes na mobilidade dos BTEX em água.....	23
Quadro 2 – Estudos validados para a determinação de BTEX por diferentes técnicas de extração e detecção.....	34
Quadro 3 – Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX.....	44
Quadro 4 – Parâmetros avaliados durante a operação dos reatores e os métodos analíticos usados .....	65
Quadro 5 – Recuperação do analito em diferentes concentrações.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições cromatográficas do GC-HS-PID-FID. ....	48
Tabela 2 – Programação de temperatura usado na análise cromatográfica. ....	48
Tabela 3 – Valores utilizados no planejamento composto central rotacional para otimização da extração por <i>headspace</i> dos BTEX. ....	49
Tabela 4 – Concentrações da solução de macronutrientes .....	53
Tabela 5 – Concentrações da solução de micronutrientes.....	53
Tabela 6 – Condições cromatográficas do GC/TCD utilizadas na análise do biogás no teste de AME .....	54
Tabela 7 – Duração das fases e parâmetros operacionais dos reatores metanogênico, desnitrificante e sulfetogênico .....	63
Tabela 8 – Condições cromatográficas para a determinação de AGV por GC-FID .....	65
Tabela 9 – Matriz para o planejamento fatorial ( $2^4$ ), com três pontos centrais e oito axiais, e as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para o método de extração dos BTEX por HS e análise por GC-PID .....	71
Tabela 10 – Parâmetros analíticos avaliados para a validação do método analítico (HS-GC-PID) de determinação de BTEX.....	77
Tabela 11 – Parâmetros operacionais dos reatores durante a etapa de aclimação.....	83
Tabela 12 – Percentual de metano, gás carbônico, gás sulfídrico e amônia presentes no biogás. ....	84
Tabela 13 – Concentrações afluentes e efluentes médias e eficiências de remoção de DQO nos três reatores anaeróbios durante as três fases de operação. ....	87
Tabela 14 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais. ....	90
Tabela 15 – Testes Jonckheere-Terpstra para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais.....	90
Tabela 16 – Concentrações médias afluentes e efluentes e eficiências de remoção dos BTEX nos três reatores anaeróbios durante a Fase II.....	95
Tabela 18 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para os constituintes BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores (fator), na Fase II e na Fase III. ....	100
Tabela 19 – Testes Jonckheere-Terpstra para os constituintes BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores, na Fase II e na Fase III. ....	101

Tabela 20 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para a concentração total BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores (fator), na Fase II e na Fase III.....	105
Tabela 21 – Testes Jonckheere-Terpstra para a concentração total BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores, na Fase II e na Fase III.....	105
Tabela 22 – Valores médios e diferenças de biogás teórico e medido nos três reatores estudados .....	107
Tabela 23 – Valores médios das frações nitrogenadas quantificadas para o cálculo do balanço de massa.....	108
Tabela 24 – Valores médios das frações de enxofre quantificadas para o cálculo do balanço de massa. ....	109
Tabela 25 – Testes de normalidade para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais.....	127
Tabela 26 – Testes de Levene (homogeneidade da variância) para DQO de afluentes e efluentes dos reatores nas três fases experimentais.....	127
Tabela 27 – Testes de normalidade para as concentrações dos BTEX no afluente e no efluente dos reatores na Fase II e na Fase III. ....	128
Tabela 28 – Testes de Levene para as concentrações dos BTEX no afluente e no efluente, em relação aos três reatores na Fase II e na Fase III .....	129

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>AB<sub>e</sub></b>	Alcalinidade a bicarbonato
<b>AGV</b>	Ácidos Graxos Voláteis
<b>AME</b>	Atividade Metanogênica Específica
<b>ANOVA</b>	Análise de variância (teste de comparação de médias)
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AT</b>	Alcalinidade total
<b>BTEX</b>	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
<b>BZ</b>	Benzeno
<b>CAP</b>	Cimento asfáltico processado
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DCCR</b>	Delineamento composto central rotacional
<b>DEHA</b>	Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental
<b>DQO</b>	Demanda química de oxigênio
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EB</b>	Etilbenzeno
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector por captura de elétrons)
<b>EFS</b>	Extração em fase sólida
<b>ELL</b>	Extração líquido-líquido
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de proteção ambiental)
<b>FBR</b>	<i>Fluidized Bed Reactor</i> (reator de leito fluidizado)
<b>FID</b>	<i>Detector of flame ionization</i> (detector de ionização de chama)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia gasosa)
<b>GLP</b>	Gás liquefeito do petróleo
<b>HS</b>	<i>Headspace</i>
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfeto de hidrogênio (gás sulfídrico)
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>J-T</b>	Teste de tendência de ordenação de Jonckheere-Terpstra.

<b>K-S</b>	Teste de normalidade <i>Kolmogorov-Smirnov</i>
<b>K-W</b>	Teste de comparação de médias de <i>Kruskal Wallis</i>
<b>LABOSAN</b>	Laboratório de Saneamento
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>LAT</b>	Laboratório de Análises Traços
<b>LUBNOR</b>	Lubrificantes e Derivados de Petróleo do Nordeste
<b>MEFS</b>	Micro extração em fase sólida
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa)
<b>MX</b>	m-Xileno
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio gasoso
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrogênio na forma de nitrito
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrogênio na forma de nitrato
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amônia livre
<b>N-NTK</b>	Nitrogênio na forma de nitrogênio total kjedal
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OX</b>	o-Xileno
<b>p</b>	Significância de teste estatístico
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>POA</b>	Processos oxidativos avançados
<b>PID</b>	<i>Detector of photoionization</i> (detector de fotoionização)
<b>PX</b>	p-Xileno
<b>RAHLF</b>	Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
<b>RM</b>	Reator metanogênico
<b>RN</b>	Reator de nitrato
<b>RS</b>	Reator sulfetogênico
<b>SFFR</b>	<i>Submerged Fixed Film Reactor</i> (reator de leito fixo submerso)
<b>SSV</b>	Sólidos suspensos voláteis
<b>TCD</b>	Detector de condutividade térmica
<b>TDH</b>	Tempo de detenção hidráulica
<b>TO</b>	Tolueno
<b>t<sub>r</sub></b>	Tempo de retenção

<b>UASB</b>	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> (reator de manta de lodo e fluxo ascendente)
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>S-W</b>	Teste de normalidade <i>Shapiro-Wilk</i>
<b>VOC</b>	Compostos orgânicos voláteis



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1 A indústria do petróleo e o meio ambiente.....	21
3.2 Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) .....	22
3.3 Determinação dos BTEX .....	25
3.4 Otimização e validação da metodologia analítica para determinação de BTEX por meio de cromatografia gasosa aliada à técnica de <i>headspace</i> .....	27
3.4.1 Otimização experimental.....	27
3.4.2 Validação de metodologia analítica.....	29
3.5 Processos de remoção de hidrocarbonetos monoaromáticos.....	38
3.5.1 Processos não biológicos .....	38
3.5.2 Processos biológicos.....	39
3.6 Remoção de BTEX em sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo .....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação dos BTEX .....	46
4.1.1 Reagentes e soluções .....	46
4.1.2 Métodos de extração e determinação dos BTEX.....	47
4.1.3 Otimização da extração dos BTEX .....	49
4.2 Teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) .....	51
4.3 Ensaios em fluxo contínuo .....	56
4.3.1 Confeção e operação dos reatores anaeróbios .....	56
4.3.2 Inóculo .....	62
4.3.3 Efluente sintético .....	62
4.3.4 Corridas experimentais nos reatores anaeróbios .....	62
4.4 Métodos analíticos .....	64
4.5 Tratamento estatístico dos dados de remoção de DQO e de BTEX.....	66
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
5.1 Otimização e validação de metodologia analítica de determinação de BTEX.....	69
5.1.1 Otimização multivariada dos parâmetros de extração .....	70
5.1.2 Validação do método analítico .....	76
5.2 Avaliação do teste de AME do lodo utilizado nos experimentos contínuos .....	80
5.3 Ensaios de remoção dos BTEX em reatores anaeróbios .....	82

5.3.1 Testes iniciais .....	82
5.3.2 Desempenho dos sistemas na fase de aclimação .....	82
5.3.3 Avaliação da produção e características do biogás produzido .....	83
5.3.4 Remoção de DQO nos reatores anaeróbios .....	86
5.3.5 Remoção dos BTEX .....	91
5.3.6 Balanços de massa para os sistemas .....	106
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>7 RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>127</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos compostos que compõem o petróleo e os seus derivados estão os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, pertencentes ao grupo denominado BTEX, os quais possuem como característica principal a presença do anel benzênico em sua estrutura, o que os torna compostos bastante estáveis, dificultando, assim, as suas remoções no meio ambiente (JO *et al.*, 2008; YANG, JIANG, SHI, 2006).

Esses compostos representam a classe dos hidrocarbonetos monoaromáticos que agregam maior risco ao meio ambiente, principalmente devido suas características tóxicas e carcinogênicas, e também devido a sua elevada mobilidade em água, podendo alcançar grandes volumes de contaminação, (CERVANTES *et al.*, 2011; COSTA, NUNES, CORSEUIL, 2009; DOU *et al.*, 2008, MEHLMANA, 1992; PAIXÃO *et al.*, 2007; TIBURTIUS, PERALTA-ZAMORA, LEAL, 2004), alcançando o meio ambiente por meio da má disposição de efluentes industriais, de derrames durante o transporte de petróleo e seus derivados, vazamentos em postos de gasolina e deposição atmosférica (FARHADIAN *et al.*, 2008; HELENO *et al.*, 2010; JO *et al.*, 2008; MORLETT-CHÁVEZ *et al.*, 2010; TRIGUEROS *et al.*, 2010; VIDALI, 2001; VIEIRA *et al.*, 2007).

A presença dos BTEX em águas contaminadas, mesmo em baixas concentrações, e a conseqüente exposição humana a tais compostos podem gerar desde danos ao sistema nervoso central, até o desenvolvimento de câncer, no caso do benzeno, reconhecidamente o composto mais tóxico do grupo e classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como potente agente carcinogênico, podendo causar leucemia e até levar o indivíduo à morte, em caso de exposição aguda ao composto (ES'HAGHI, EBRAHIMI, HOSSEINI, 2011; RANA, VERMA, 2005; SINGH, FULEKAR, 2010). Os demais compostos, tolueno, etilbenzeno e xilenos, também são considerados tóxicos, porém nenhum tipo de câncer foi comprovadamente atribuído a estes (FORTE, 2007; BRITO *et al.*, 2005).

Segundo Es'haghi, Ebrahimi, Hosseni (2011), a obtenção de um maior conhecimento sobre o comportamento dos BTEX no meio ambiente exige o desenvolvimento de técnicas analíticas precisas e exatas. Nesse sentido, a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID) e por fotoionização (PID) tem se destacado, pois consegue manter grande eficiência na separação, identificação e quantificação dessas espécies químicas (CAVALCANTI *et al.*, 2010; CHAI *et al.* 2005; DEMEESTERE *et al.*, 2007; GOBATO, LANÇAS, 2001).

Porém, como as amostras em estudo se apresentam geralmente em baixas

oncentrações em matrizes ambientais aquosas (em ng/L ou µg/L), esses métodos analíticos recorrem a um processo de pré-concentração, tais como: extração líquido-líquido (ELL), análise por *headspace* (HS), extração em fase sólida (EFS) e micro-extração em fase sólida (MEFS) (CAVALCANTI *et al.*, 2010; ES'HAGHIA, EBRAHIMIB, HOSSEINIB, 2011; GOBATO, LANÇAS, 2001; HELENO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2002).

Assim, devido às características voláteis dos BTEX, a técnica de extração por *headspace* aliado a cromatografia gasosa (HS-CG) tem se apresentado bastante eficiente, obtendo vantagens como boa repetibilidade, simples instrumentação e elevadas recuperações (KETOLA *et al.*, 1997; MENÉNDEZ *et al.*, 2002; SAFAROVA *et al.*, 2004). No entanto, para aumentar a sensibilidade das análises e melhorar a extração dos analitos em estudo, técnicas estatísticas como delineamento composto central rotacional (DCCR) vem sendo utilizadas na otimização dos processos de extração e a validação das metodologias de análise também têm sido práticas constantes (ARROYO, ORTIZ, SARABIA, 2007; CAVALCANTI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2007; GAUJAC *et al.*, 2008).

Os tratamentos físico-químicos convencionais utilizados para a remoção de BTEX do meio ambiente além de demandarem elevados custos operacionais, alguns métodos não destroem os contaminantes, mas apenas os transportam de fase, produzindo um acúmulo de resíduos tóxicos. Nesse sentido, os processos biológicos são considerados como uma tecnologia eficiente na remoção de BTEX de efluentes contaminados, especialmente por causa da sua simplicidade operacional e baixo custo quando comparado a outros métodos (BERTIN *et al.*, 2007; MASSALHA *et al.*, 2007; MAZZEO *et al.*, 2010).

Avanços significativos foram realizados nos últimos anos no que diz respeito à remoção anaeróbia de hidrocarbonetos monoaromáticos em reatores contínuos e em batelada (DOU *et al.*, 2010; COATES, ANDERSON, 2000). De acordo com Dou *et al.* (2008) o uso de aceptores finais de elétrons, tais como  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , tem melhorado consideravelmente a remediação anaeróbia de águas subterrâneas e de efluentes contendo BTEX.

Diversas configurações de reatores anaeróbios, como os biorreatores anaeróbios horizontais imobilizado (HAIB) (DE NARDI *et al.*, 2002, 2005; CATTONY *et al.*, 2005; GUSMÃO *et al.*, 2006, 2007) e reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), têm sido usadas para remediação de efluentes contaminados com compostos monoaromáticos (MARTÍNEZ, CUERVO-LÓPEZ, GOMEZ, 2007). No entanto, há poucos estudos em fluxo contínuo que avaliem simultaneamente a remoção anaeróbia de BTEX em biorreatores operados sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico de concentração e detecção de BTEX e avaliar a remoção desses compostos em reatores anaeróbios de manto de lodo e fluxo ascendente sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia analítica de detecção dos BTEX por cromatografia gasosa, utilizando-se a técnica de *headspace*.
- Avaliar a capacidade máxima de produção de metano do consórcio microbiano em estudo por intermédio do teste de atividade metanogênica específica (AME).
- Estudar a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) na presença de diferentes receptores de elétrons, tais como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , e sob condições metanogênicas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A indústria do petróleo e o meio ambiente

A indústria do petróleo tem fundamental importância na sociedade, haja vista que os seus derivados servem como matéria-prima para a manufatura de inúmeros bens de consumo, além de sua grande contribuição para a geração de energia (MARIANO, 2001).

Contudo, são responsáveis por muitos impactos ambientais, decorrentes de vazamentos, derrames e outros acidentes que podem acontecer durante as atividades de exploração, refino, transporte e armazenamento do petróleo e de seus derivados, prejudicando consideravelmente o meio ambiente (CALLADO; SILVA; LOPES, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Desde a descoberta do primeiro poço de petróleo em Lobato, na Bahia, em 1939, passando pela criação da PETROBRÁS em 1953, desenvolveu-se uma importante estrutura de exploração, produção, refino e distribuição de petróleo e seus derivados (MELLO, 2007).

As refinarias de petróleo são as indústrias responsáveis pela transformação do óleo cru em derivados, tais como o diesel, a gasolina e o óleo combustível (AVCI; KAÇMAZ; DURAK, 2003; MILHOME, 2006). Essas atividades, do ponto de vista ambiental, são consideradas fontes geradoras de poluição, haja vista que consomem bastante água durante o processo de conversão do petróleo e geram, ao final do processamento, diversos gases nocivos, produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição, e geram grandes quantidades de efluentes líquidos (MARIANO, 2001; WAKE, 2005).

Esses efluentes consistem de águas de resfriamento (principal função), águas de processo, esgotos sanitários e águas de chuva. As águas de processo são, normalmente, mais contaminadas do que as águas de refrigeração, visto que entram frequentemente em contato direto com o óleo (MARIANO, 2001).

As águas residuárias oriundas de indústrias de refino apresentam elevada DQO, uma diversidade de poluentes orgânicos e inorgânicos de difícil degradação, incluindo compostos fenólicos, sulfetos, amônia, cianetos, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos (ALVA-ARGÁEZ; KOKOSSIS; SMITH, 2007; MILHOME, 2006; SOUSA *et al.*, 2006; AVCI; KAÇMAZ; DURAK, 2003), os quais podem ser tóxicos para diversos organismos e potencialmente carcinogênicos (ALAJBEG *et al.*, 2000; BARRON *et al.*, 1999; MARIANO, 2001).

Com relação aos hidrocarbonetos, enquanto a fração alifática inclui as cadeias de alcanos lineares, alcanos ramificados e cicloalcanos, a fração aromática, mais tóxica e recalcitrante, contém os hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, tais como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos naftenoaromáticos, compostos aromáticos de enxofre e compostos fenólicos (REDDY; QUINN, 1999; JO *et al.*, 2008).

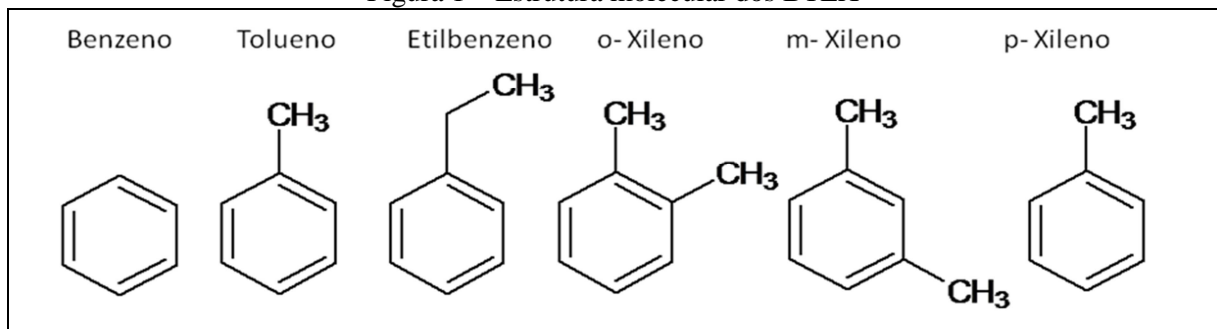
Os BTEX se destacam na lista de poluentes prioritários da USEPA devido ao seu elevado potencial carcinogênico e mutagênico, além de sua elevada solubilidade em água, o que facilita a migração e contaminação rápida de águas subterrâneas, solos e ar por esses compostos, que, mesmo em baixas concentrações, podem trazer sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana (PAIXÃO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2008; SANTAELLA *et al.*, 2009; MAZZEO *et al.*, 2010; AIVALIOTI *et al.*, 2011).

Portanto, a disposição das águas residuárias oriundas do processamento do petróleo, bem como o derramamento de combustíveis nos corpos hídricos receptores ou no solo, tem se tornado uma preocupação constante a nível mundial (MANOHAR; KAREGOUDAR, 1998; MARIANO, 2001).

### 3.2 Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX)

Os hidrocarbonetos monoaromáticos – benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (o-, m- e p-xileno) – são os componentes do grupo denominado BTEX (Figura 1). Tais compostos são amplamente utilizados como solventes industriais nas indústrias químicas e petroquímicas, compondo cerca de 18% da gasolina (MANOHAR; KAREGOUDAR, 1998; JO *et al.*, 2008; MAZZEO *et al.*, 2010).

Figura 1 – Estrutura molecular dos BTEX



Fonte: a autora.

Os BTEX possuem como principais características a presença do anel benzênico em sua estrutura molecular, o caráter volátil, bem como a elevada solubilidade em água, quando comparado a outros hidrocarbonetos presentes na gasolina, como os alifáticos (DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2009). A solubilidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos é da ordem de 3 a 5 vezes maior que a dos alifáticos com o mesmo número de carbonos (TIBURTIUS, PERALTA-ZAMORA, LEAL, 2004).

Hidrocarbonetos monoaromáticos também apresentam maior mobilidade em sistemas solo-água, o que pode ser justificado pelo baixo coeficiente de partição octanol-água desses compostos (Quadro 1), resultando numa menor absorção no solo e, por consequência, a preferência pelo transporte de tais compostos por via hídrica, favorecendo a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (NAKHLA, 2003; TIBURTIUS, PERALTA-ZAMORA, LEAL, 2004).

Quadro 1 – Estrutura e parâmetros físico-químicos importantes na mobilidade dos BTEX em água.

Composto	Fórmula química	Solubilidade em água (mg/L)	Log $K_{ow}$
Benzeno	$C_6H_6$	1760	2,13
Tolueno	$C_7H_8$	532	2,73
Etilbenzeno	$C_8H_{10}$	161,5	3,15
o-Xileno	$C_8H_{10}$	161,5	3,20
m-Xileno	$C_8H_{10}$	171,5	3,12
p-Xileno	$C_8H_{10}$	181,6	3,15

Fonte: Tiburtius *et al.* (2004).

Notas: As fórmulas químicas dos compostos foram incluídas pela autora.

$K_{ow}$  é o coeficiente de partição octanol-água.

BTEX são frequentemente encontrados no meio ambiente através de processo bioquímicos naturais, deposição atmosférica, como resultado de vazamentos de tanques subterrâneos de armazenamento de gasolina ou dutos, disposição imprópria de efluentes, derrames acidentais no transporte de produtos petrolíferos e lixiviação dos aterros sanitários (PHELPS, YOUNG, 2001; DE NARDI *et al.*, 2007; CAVALVANTI *et al.*, 2010).

Devido a sua elevada volatilidade, os BTEX, geralmente, se encontram em baixas concentrações (nível de ppb) em águas superficiais. No entanto, em águas subterrâneas essas concentrações podem ser mais elevadas, sendo, então, prioridade o monitoramento desses compostos em lençóis subterrâneos, os quais podem ser fonte de água destinada ao consumo humano (FALCÓ, MOYA, 2007 *apud* MAZZEO *et al.*, 2010).



Dentre os BTEX, aquele que confere maior risco à saúde humana é o benzeno devido a sua maior solubilidade em água e a sua volatilidade. Estudos realizados por diversas agências de saúde também comprovam que o seu caráter tóxico está diretamente ligado ao seu potencial carcinogênico e mutagênico, principalmente alterações cromossômicas na medula óssea, o que acarreta em leucemia, câncer mais comum relacionado à exposição prolongada por benzeno (TIBURTIUS, PERALTA-ZAMORA, 2004; PEREZ-PAVÓN *et al.*, 2007; GAUJAC *et al.*, 2008; HELENO *et al.*, 2010).

Os demais compostos não têm relação direta com o surgimento de câncer, porém exposições crônicas a tolueno podem acarretar disfunções hepáticas e gastrointestinais, enquanto o etilbenzeno, quando inalado, causa danos ao sistema respiratório, além de provocar irritações nos olhos e tonturas. Já os isômeros dos xilenos afetam o cérebro, podendo causar confusão mental, dores de cabeça, perda de memória e, em elevadas concentrações, pode levar a inconsciência e morte por depressão do sistema nervoso central (GUSMÃO, 2005; HELENO *et al.*, 2010).

Portanto, devido aos sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana, a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva quanto à presença dos BTEX em águas. Tanto a Agência de Proteção Ambiental norte americana (EPA) quanto o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 518 de 2004, estabelecem limites máximos para a concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno em água destinada ao consumo humano. A legislação brasileira determina que não haja concentração maior que 5, 170, 200 e 300 µg/L para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente.

Também, preocupados com a disposição de esgotos industriais, entre os quais os provenientes da indústria do petróleo, entrou em vigor a Resolução do Conama nº 430 de 13 de maio de 2011, a qual impõe o limite para o lançamento em corpos hídricos de 1,2, 1,2, 0,84 e 1,6 mg/L para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente. Assim, a má disposição das águas residuárias, aliada à presença de compostos monoaromáticos, pode acarretar uma série de danos à fauna, flora e aos humanos.

### 3.3 Determinação dos BTEX

Os métodos normalizados nacionais e internacionais não apresentam uma metodologia analítica exclusiva para a determinação de BTEX em matrizes aquosas. Geralmente, abordam a determinação desses compostos de maneira indireta, na análise dos compostos orgânicos voláteis (VOC) (APHA, 2005). A maioria dos métodos normalizados apresenta metodologia analítica para a determinação desses compostos na gasolina.

Por isso, na literatura, podem-se encontrar vários estudos no que diz respeito à criação, otimização e validação de metodologias analíticas capazes de identificar e quantificar BTEX em matrizes aquosas (EZQUERRO *et al.*, 2004; GAUJAC *et al.*, 2008; HELENO *et al.*, 2010; MENÉNDEZ *et al.*, 2000; PÉREZ-PAVÓN *et al.*, 2007; SAKATA *et al.*, 2004).

Os métodos analíticos cromatográficos se mostram bastantes atrativos por apresentarem facilidade na separação, identificação e quantificação dessas espécies químicas, e por serem capazes de detectar baixas concentrações dos compostos em matrizes aquosas. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia gasosa (CG) é a técnica mais indicada para a determinação dos BTEX, haja vista que se trata de compostos bastante voláteis (CARO, SERRANO, GALLEGO, 2007; DEMEESTERE, *et al.*, 2007; PÉREZ-PAVÓN *et al.*, 2007).

O método de detecção dos compostos pelo uso de cromatografia gasosa se dá por meio de um detector sensível aos analitos em estudo, sendo os mais utilizados na detecção de compostos monoaromáticos: detector por ionização em chama (FID), detector por captura de elétrons (ECD), detector por fotoionização (PID) e espectrometria de massas (MS) (CAVALCANTI *et al.*, 2010; CHAI, FALABELLA, TEJA, 2005; DONGQIANG, WANYUN, DIEYAN, 2006; ES'HAGHI, EBRAHIMI, HOSSEINI, 2011; KAMAL, KLEIN, 2010).

Devido à elevada volatilidade dos BTEX, à sensibilidade do método analítico supracitado e à necessidade de analisá-los em baixas concentrações (traços), é recomendado que a amostra a ser analisada passe por um processo de pré-concentração (CAVALCANTI *et al.*, 2010; DEMEESTERE, *et al.*, 2007). Raros são os estudos para a determinação de BTEX em água por injeção direta da amostra devido aos baixos limites de detecção exigidos pela análise e às inúmeras desvantagens que esse método de injeção pode trazer, tais como possíveis interferências devido ao efeito de matriz e a não compatibilidade da água com a maioria das fases estacionárias das colunas capilares utilizadas para a separação dos compostos por CG (KUBINEC *et al.*, 2005).

Vários estudos utilizando técnicas de extração baseadas em princípios físico-químicos estão disponíveis na literatura, tais como: extração líquido-líquido (ELL) (DEWULF, LANGENHOVE, 1999; GOLFINOPOULOS, LEKKAS, NIKOLAOU, 2001) destilação, análise por *headspace* (HS), extração em fase sólida (EFS) e micro-extração em fase sólida (MEFS) (CARO, SERRANO, GALLEGO, 2007; CAVALCANTI *et al.*, 2010; ES'HAGHIA, EBRAHIMIB, HOSSEINIB, 2011; KAMAL, KLEIN, 2010).

A extração por *headspace* (HS) é considerada uma técnica bastante sensível, estando atualmente em destaque na análise de compostos monoaromáticos, haja vista que é capaz de extrair compostos voláteis de diferentes matrizes, dentre elas a água. Nessa técnica, o analito é volatilizado, sendo determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra a partir da análise do vapor desprendido da amostra (GOBATO, LANÇAS, 2001; KOLB, 1999).

Sakata *et al.* (2004) definem a extração por HS como uma técnica simples e que envolve o equilíbrio termodinâmico entre a fase aquosa e gasosa de substâncias voláteis dentro de um frasco fechado sob condições constantes de temperatura.

Assim, o *headspace* aliado à cromatografia gasosa (HS-CG) é uma técnica que pode acontecer de duas formas: no modo estático e dinâmico (por exemplo, *Purge-and-trap*, P&T). Nesses dois modos, a fase gasosa é amostrada e injetada diretamente no cromatógrafo evitando a perda do analito e possíveis contaminações (KOLB, 2006).

A técnica de extração por *headspace* estático apresenta uma série de vantagens em relação à metodologia por *headspace* dinâmico, tais como boa repetibilidade (coeficiente de variação entre 4 e 10%), instrumentação mais simples e elevadas recuperações (entre 89 e 110%) (DEMEESTERE *et al.* 2007; KETOLA *et al.*, 1997; MENÉNDEZ *et al.*, 2000; SAFAROVA *et al.*, 2004; RIDGWAY, LALLJIE, SMITH, 2007). Já o sistema *Purge-and-trap* (P&T), por exemplo, exige uma instrumentação mais complexa, pode gerar interferência pelo vapor de água e há riscos de contaminação, além de apresentar um tempo de análise muito longo por amostra. Por isso, a técnica de HS estático tem sido preferivelmente utilizada em diversas investigações (KETOLA *et al.*, 1997; KOLB, 1999).

Alguns parâmetros experimentais podem influenciar diretamente na eficiência do método de extração por HS, tais como temperatura, tempo de extração, volume de amostra e salinidade. Existem algumas recomendações da literatura para tais parâmetros experimentais, como, por exemplo, a adoção de elevadas temperaturas na extração por HS, pois se acredita que se melhore a transferência de massa dos analitos em estudo. Porém, para que se obtenham

condições experimentais capazes de melhorar a sensibilidade da análise e extrair melhor os analitos de sua matriz, esses parâmetros têm sido frequentemente otimizados utilizando técnicas estatísticas multivariadas (ARROYO, ORTIZ, SARABIA, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007; GAUJAC *et al.*, 2008; HELENO *et al.*, 2010).

### **3.4 Otimização e validação da metodologia analítica para determinação de BTEX por meio de cromatografia gasosa aliada à técnica de *headspace***

#### 3.4.1 Otimização experimental

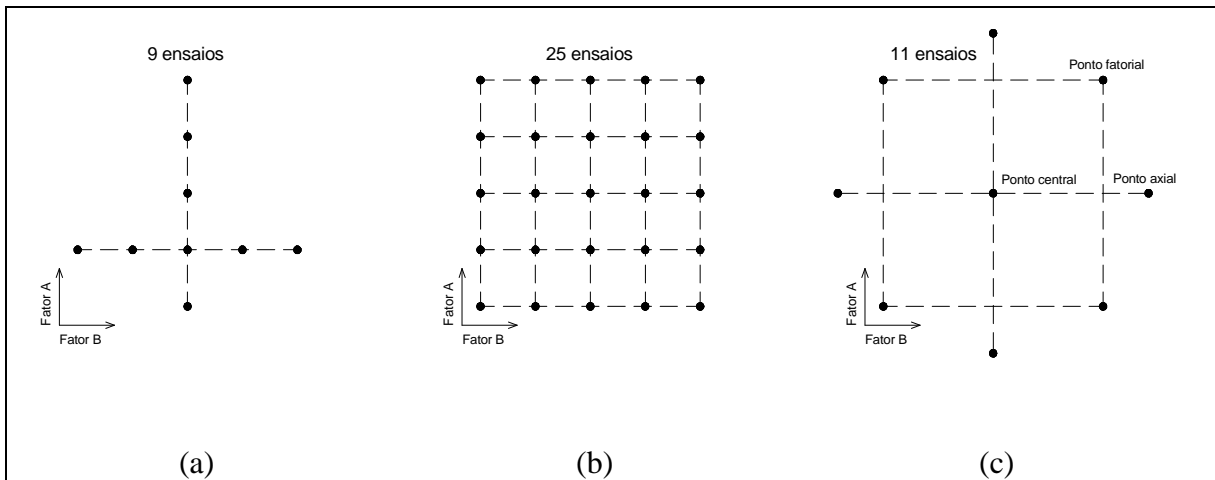
A otimização de parâmetros experimentais é, provavelmente, uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente quando se objetiva o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala. Entretanto, na maioria dos casos, o processo de otimização é realizado de maneira univariada, ou seja, utilizando-se o clássico sistema de uma variável por vez. No entanto, por não considerar a interação entre as variáveis, o resultado obtido não necessariamente corresponde às condições que levam ao ótimo verdadeiro, pois, em sistemas químicos, as variáveis costumam se correlacionar fortemente, interagindo através de mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e antagônicos. Portanto, caso a interação entre as variáveis não seja considerada, o processo de otimização pode apresentar pouco valor (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Outro método tradicional é a busca do resultado procurado através de uma matriz, na qual todas as combinações são investigadas até a obtenção de uma solução final. O método da matriz tem a vantagem de explorar todo o domínio experimental, entretanto possui a grande desvantagem de necessitar de um grande número de experimentos (RODRIGUES, IEMMA, 2009).

Dentre as demais alternativas existentes, destacam-se também os sistemas de planejamento fatorial, os quais permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A Figura 2 ilustra o número de ensaios (representados por pontos), quando se avalia a interação entre dois fatores, num planejamento fatorial.

Figura 2 – Possibilidades de conduzir experimentos para duas variáveis (fatores A e B): (a) análise univariada; (b) matriz com todas as combinações possíveis; e (c) delineamento composto central rotacional.



Fonte: Rodrigues e Iemma (2009).

Nota: a figura relacionada ao planejamento composto central rotacional (c) foi adaptada pela autora.

No caso de duas variáveis (fatores) independentes a serem estudadas em cinco situações (níveis) diferentes, o primeiro procedimento (univariado) necessitaria de, no mínimo, nove ensaios para obtenção da resposta considerada ótima, conforme visto na Figura 2a. Contudo, as condições estudadas se limitariam àquela região espacial, não se conseguindo detectar os efeitos interativos, e, logo, o melhor resultado obtido pode ser bem aquém do valor ótimo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O segundo caso requer uma grande quantidade de ensaios para explorar todas as cinco combinações dos dois fatores, como ilustra a Figura 2b. Tal procedimento requer tempo e possui custo muito alto e desnecessário. Ademais, como os ensaios não são feitos em replicata, não se pode calcular nenhum tipo de erro padrão inerente às manipulações experimentais (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

No caso do planejamento fatorial completo, se a combinação de  $k$  fatores (variáveis) é investigada em dois níveis (situações), os quais definem o domínio a ser investigado no processo de otimização, o planejamento fatorial consistirá de  $2^k$  experimentos (FERREIRA *et al.*, 2007). Adicionalmente, para se obter uma boa estimativa do erro experimental, um ensaio com, no mínimo, três repetições é normalmente incluído no centro do planejamento, ilustrado na Figura 2c, em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado (ponto central) (TEÓFILO, FERREIRA, 2006), sendo indispensável para a avaliação da reprodutibilidade do processo (RODRIGUES, IEMMA, 2009).

Ainda, a adição de ensaios nos pontos axiais ( $2k$ ) ao planejamento experimental permite testar o modelo de segunda ordem. Assim, em sistemas de planejamento

experimental, a região de estudo é maior com um número menor de ensaios ( $2^k$  ensaios fatoriais +  $2k$  ensaios nos pontos axiais + 3 ensaios repetidos no ponto central) a serem realizados, sendo possível elaborar um modelo matemático que, se validado estatisticamente, pode ser usado para a obtenção de uma superfície de resposta, pela qual se podem determinar as condições otimizadas, conhecendo-se a significância estatística das respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Análises cromatográficas geralmente envolvem três etapas: preparo da amostra, separação e quantificação dos compostos. Destas, as etapas de preparação de amostra e separação dos compostos tem sido frequentemente otimizados por meio de técnicas estatísticas multivariadas (FERREIRA *et al.*, 2007). Entretanto, a literatura é escassa quanto a estudos de otimização (uni ou multivariados) de processos de extração por *headspace* estático (BIANCHI *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2010; HELENO *et al.*, 2010; MENÉNDEZ *et al.*, 2000), sendo raros os estudos que utilizam técnicas de otimização multivariada como os planejamentos experimentais (HELENO *et al.*, 2010).

#### 3.4.2 Validação de metodologia analítica

Lanças (2004) definiu a validação como sendo o ato ou efeito de dar validade, o qual visa diminuir ou controlar os fatores que podem levar a imprecisão ou inexatidão de um determinado dado gerado. No Brasil, há duas agências que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos: a ANVISA (RE nº 899, de 29/05/2003) e o INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de março/2003).

Para que um sistema analítico funcione de maneira adequada dentro das condições de análise para as quais foi desenvolvido, é necessário que, após sua otimização, seja validado (HELENO *et al.*, 2010). Os parâmetros que necessitam ser avaliados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio. Geralmente, os parâmetros analíticos encontrados para validação são: seletividade, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção e quantificação (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009). Estes parâmetros são sucintamente descritos nas alíneas a seguir.

### *a) Seletividade*

Segundo Ribani *et al.* (2004), a seletividade de um método de separação instrumental é a capacidade de avaliar as substâncias em análise na presença de compostos que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Caso não haja seletividade no método, a precisão, a exatidão e a linearidade estarão seriamente comprometidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

A seletividade pode ser avaliada por meio de uma comparação entre a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância, um padrão, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse, o qual deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra (VALDERRAMA, BRAGA, POPPI, 2009).

### *b) Linearidade*

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um intervalo apropriado (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

Geralmente, não se sabe qual a correlação entre o sinal gerado (área do pico) e a concentração do analito que se pretende quantificar. Por isso, deve-se determinar empiricamente a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie de interesse, a partir dos sinais obtidos com concentrações conhecidas do analito (CUSTÓDIO, ANDRADE, AUGUSTO, 2004; LANÇAS, 2004). Pode-se utilizar a padronização interna ou externa para obter a linearidade e formular a equação da relação matemática, que pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, conforme Equação 1 (INMETRO, 2003; LEITE, 2008).

$$y = ax + b, \tag{1}$$

onde  $a$  é coeficiente angular da reta (inclinação da reta), e  $b$ , o coeficiente linear da reta (ponto de intersecção).

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados é a técnica pela qual são estimados os coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais. Além dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$ , também é possível calcular o coeficiente de correlação  $r$ , que dá uma estimativa da qualidade da curva obtida. Um

coeficiente de correlação maior que 0,99 indica que os dados foram bem ajustados, pois quanto mais próximo de um, menor a dispersão dos dados experimentais e, conseqüentemente, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (INMETRO, 2003).

Segundo Leite (2008), para que se obtenha uma curva analítica de boa qualidade e confiabilidade, deve haver, no mínimo, cinco pontos, sem incluir o ponto zero da curva. Alguns pontos da curva podem ser excluídos, desde que não sejam excluídos pontos em sequência. A curva pode ser iniciada pelo menor valor mensurável ou pelo menor valor de interesse para a quantificação.

### c) *Precisão*

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições definidas. Quanto mais próximos forem os resultados obtidos, menor será a dispersão e maior será a precisão (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

De acordo com Lanças (2004) e Ribani *et al.* (2004), normalmente, a precisão é expressa de três formas: precisão intermediária, reprodutibilidade e repetitividade. Esta é bastante utilizada para expressar a precisão em uma validação analítica e é definida como a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as mesmas condições de análise: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão pode ser expressa por meio da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV), de no mínimo sete replicatas, como mostra a Equação 2 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100, \quad (2)$$

em que “s” é o desvio padrão amostral, e “x” a média amostral.



#### d) *Recuperação*

A medição de recuperação é uma das técnicas utilizadas para avaliar a exatidão de um método. Nela, o fator de recuperação,  $F_r$ , é definido como sendo uma proporção entre a quantidade de analito de interesse, presente ou adicionado na porção analítica do material teste, o qual pode ser extraído e quantificado. Ou seja, é o número obtido a partir da porcentagem de erro ou perda da espécie em análise (LEITE, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). O analito de interesse pode ser adicionado ao material teste por meio de dopagem.

Segundo o Inmetro (2003) e Ribani *et al.* (2004), a recuperação pode ter uma limitação devido ao fato de que o analito adicionado pode não se encontrar necessariamente da mesma forma que a amostra, podendo implicar, por exemplo, em resultados bastante otimistas de recuperação devido à presença de substâncias que podem melhorar a detecção dos compostos.

No entanto, as medições de recuperação ainda são muito utilizadas e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, de acordo com a Equação 3 (RIBANI *et al.*, 2004).

$$Fr(\%) = \frac{\text{Quantidade quantificada da espécie}}{\text{Quantidade adicionada na espécie}} \quad (3)$$

#### e) *Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)*

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O limite de detecção é representado pela menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada por um método definido. Já o LQ representa a menor concentração do analito de interesse que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Tanto o LD como o LQ pode ser calculado de três maneiras distintas: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva de calibração. Dentre os métodos supracitados, o mais utilizado é o da relação sinal-ruído, porém para técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído não é trivial e, além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas.

Portanto, o método baseado nos parâmetros da curva analítica é o mais confiável, porque leva em consideração o intervalo de confiança da regressão (BACCAN, *et al.* 2001; RIBANI *et al.*, 2004). O LD e LQ podem ser expressos de acordo com as equações 4 e 5 (BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{3 \cdot DP_a}{IC} \quad (4)$$

e

$$LQ = \frac{10 \cdot DP_a}{IC}, \quad (5)$$

em que  $DP_a$  é a estimativa do desvio padrão da resposta de no mínimo sete injeções do branco, ou de amostras com a menor concentração da curva analítica; e  $IC$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003).

A cromatografia em fase gasosa é um método analítico que exige elevada confiabilidade, precisão e exatidão (CAVALCANTI *et al.*, 2010). Assim, a literatura reporta vários trabalhos que realizaram a validação de seus métodos, a fim de demonstrar que tais metodologias para a determinação dos BTEX conduzem a resultados confiáveis. O Quadro 2 relaciona alguns dos estudos publicados nos principais periódicos nacionais e internacionais, no período de 2000 a 2011, os quais utilizaram várias técnicas de extração, inclusive a extração por *headspace* (HS), aliados à cromatografia gasosa (CG), por meio de diferentes métodos de detecção.

Quadro 2 – Estudos validados para a determinação de BTEX por diferentes técnicas de extração e detecção.

(continua)

Composto	Técnica/Deteção	Linearidade ( $\mu\text{g/L}$ )	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Repetibilidade* (%)	Exatidão (%)	Referência
Benzeno	HS/CG-FID	10-8000	1,0	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	SPME/CG-FID	10-2000	1,0	-	8,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS-SPME/CG-MS	6-2000	0,6	-	7,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS/GC-MS	0,5-10	0,2	-	-	44-112 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	0,5-10	0,1	-	-	50-147 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	12-1200	0,006	-	3,0	-	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
	ID/CG-FID	5-5000	0,6	2,0	-	-	Kubinec <i>et al.</i> (2005)
	HS-PVT/CG-MS	0-35	2,0	5,0	5,5	-	Pérez-Pavón <i>et al.</i> (2007)
	HS-SPDE/CG-MS	0,013-15	0,013	-	3,2	-	Jochman, Yuan, Schmidt (2007)
	HS/CG-MS	0,01-5,00	0,4	-	-	95-102 <sup>b</sup>	Ridgway, Lalljie, Smith (2007)
	ID/CG-MS	3-520	0,59	-	10	212 <sup>c</sup>	Aeppli <i>et al.</i> (2008)
	SPME/CG-FID	2-200	0,28	0,84	0,86	-	Gaujac <i>et al.</i> (2008)
	HS/CG-PID	0,5-250	0,22	-	7,93	-	Cavalcanti <i>et al.</i> (2010)
	HS/CG-FID	-	0,088	0,293	13,39	101,49 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
HS-SPME/CG-MS	-	0,097	0,325	4,7	104,3 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)	
Tolueno	HS/CG-FID	10-8000	1,0	-	5,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	SPME/CG-FID	3-2000	0,3	-	5,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS-SPME/CG-MS	2-2000	0,2	-	5,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	P & T/CG-MS	27-2700	0,01	-	7,2 <sup>b</sup>	-	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
	ID/CG-FID	5-5000	0,9	3,0	-	-	Kubinec <i>et al.</i> (2005)
	HS-PVT/CG-MS	0-17	2,0	5,0	12 <sup>c</sup>	-	Pérez-Pavón <i>et al.</i> (2007)

Quadro 2 – Estudos validados para a determinação de BTEX por diferentes técnicas de extração e detecção.

(continuação)

Composto	Técnica/Deteção	Linearidade ( $\mu\text{g/L}$ )	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Repetibilidade* (%)	Exatidão (%)	Referência
Tolueno	HS/CG-MS	0,01-5,00	0,1	-	-	103 <sup>b</sup>	Ridgway, Lalljie, Smith (2007)
	ID/CG-MS	3-520	0,98	-	5,6	73 <sup>c</sup>	Aeppli <i>et al.</i> (2008)
	SPME/CG-FID	2-200	0,19	0,57	1,05	-	Gaujac <i>et al.</i> (2008)
	HS/CG-PID	0,5-250	7,48	-	5,62	-	Cavalcanti <i>et al.</i> (2010)
	HS/CG-FID	-	0,092	0,306	10,82	101,49 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
	HS-SPME/CG-MS	-	0,089	0,297	3,77	97,95 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
Etilbenzeno	HS/CG-FID	10-8000	2,0	-	4	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	SPME/CG-FID	2-2000	0,2	-	5	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS-SPME/CG-MS	0,8-2000	0,08	-	3	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS/GC-MS	0,5-10	0,05	-	-	60-104 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	0,5-10	0,05	-	-	49-145 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	40-4000	0,003	-	8,9	-	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
	ID/CG-FID	5-5000	0,9	3,0	-	-	Kubinec <i>et al.</i> (2005)
	HS-PVT/CG-MS	0-17	0,7	2,0	12	-	Pérez-Pavón <i>et al.</i> (2007)
	HS/CG-MS	0,01-5,00	0,34	-	-	93-110 <sup>b</sup>	Ridgway, Lalljie, Smith (2007)
	ID/CG-MS	3-520	0,24	-	21	100 <sup>c</sup>	Aeppli <i>et al.</i> (2008)
	SPME/CG-FID	2-200	0,06	0,19	1,87	-	Gaujac <i>et al.</i> (2008)
	HS/CG-PID	0,5-250	0,33	-	8,15	-	Cavalcanti <i>et al.</i> (2010)
	HS/CG-FID	-	0,702	2,34	12,26	92,35 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
HS-SPME/CG-MS	-	0,310	1,032	2,82	99,54 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)	

Quadro 2 – Estudos validados para a determinação de BTEX por diferentes técnicas de extração e detecção.

(continuação)

Composto	Técnica/Deteção	Linearidade ( $\mu\text{g/L}$ )	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Repetibilidade* (%)	Exatidão (%)	Referência
m-p-Xileno	HS/CG-FID	10-8000	2,0	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	SPME/CG-FID	2-2000	0,2	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS-SPME/CG-MS	0,8-2000	0,08	-	3,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS/GC-MS	0,5-10	0,05	-	-	62-106 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	0,5-10	0,05	-	-	49-147 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	6,5-650	0,005	-	1,0	-	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
	ID/CG-FID	5-5000	1,0	3,3	-	-	Kubinec <i>et al.</i> (2005)
	HS-PVT/CG-MS	0-17	0,6	2,0	6,9	-	Pérez-Pavón <i>et al.</i> (2007)
	HS/CG-MS**	0,01-5,00	0,81/0,31	-	-	93-107/94-107 <sup>b</sup>	Ridgway, Lalljie, Smith (2007)
	ID/CG-MS	3-520	0,29/0,43	-	17/11	140/124 <sup>c</sup>	Aeppli <i>et al.</i> (2008)
	SPME/CG-FID	2-200	0,05	0,14	2,07	-	Gaujac <i>et al.</i> (2008)
	HS/CG-PID	0,5-250	0,31	-	8,19	-	Cavalcanti <i>et al.</i> (2010)
	HS/CG-FID	-	0,617	2,057	8,89	107,67 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
HS-SPME/CG-MS	-	0,052	0,173	2,28	102,76 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)	
o-Xileno	HS/CG-FID	10-8000	2,0	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	SPME/CG-FID	2-2000	0,2	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS-SPME/CG-MS	0,8-2000	0,08	-	4,0	-	Menéndez <i>et al.</i> (2000)
	HS/GC-MS	0,5-10	0,05	-	-	62-106 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)
	P & T/CG-MS	0,5-10	0,05	-	-	53-137 <sup>a</sup>	Golfinopoulos <i>et al.</i> (2001)

Quadro 2 – Estudos validados para a determinação de BTEX por diferentes técnicas de extração e detecção.

(conclusão)

Composto	Técnica/Deteção	Linearidade ( $\mu\text{g/L}$ )	LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Repetibilidade* (%)	Exatidão (%)	Referência
o-Xileno	P & T/CG-MS	6,5-650	0,003	-	4,4	-	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
	ID/CG-FID	5-5000	1,1	3,6	-	-	Kubinec <i>et al.</i> (2005)
	ID/CG-MS	3-520	2,1	-	15	139 <sup>c</sup>	Aeppli <i>et al.</i> (2008)
	SPME/CG-FID	2-200	0,05	0,15	1,69	-	Gaujac <i>et al.</i> (2008)
	HS/CG-PID	0,5-250	0,47	-	7,95	-	Cavalcanti <i>et al.</i> (2010)
	HS/CG-FID	-	0,542	1,807	10,87	85,94 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)
	HS-SPME/CG-MS	-	0,024	0,082	4,33	102,6 <sup>d</sup>	Heleno <i>et al.</i> (2010)

Fonte: a autora.

Notas: HS (headspace), SPME (microextração em fase sólida), ID (injeção direta), CG (cromatografia gasosa), MS (massa), FID (Detector por ionização de chama), PID (detector de fotoionização), P & T (*purge and trap*).

\* Os dados de repetibilidade foram obtidos a partir do desvio padrão relativo (DPR) das áreas das replicatas de BTEX injetadas.

\*\* Análise realizada para os dois compostos (m-Xileno e p-Xileno), separadamente.

<sup>a</sup> Os intervalos dos dados de recuperação foram obtidos a partir de testes com as seguintes concentrações: 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0  $\mu\text{g/L}$  de BTEX.<sup>b</sup> Foram utilizadas 5 concentrações diferentes de BTEX, variando de 0,01-5  $\mu\text{g/L}$ , porém a recuperação do tolueno foi obtida a partir da análise de uma concentração apenas, 0,5  $\mu\text{g/L}$ .<sup>c</sup> A recuperação foi obtida a partir da inserção de 3,5  $\mu\text{g/L}$  de BTEX às amostras em estudo.<sup>d</sup> As recuperações foram determinadas através da análise de nove replicatas de amostras fortificadas com BTEX.

### 3.5 Processos de remoção de hidrocarbonetos monoaromáticos

Devido à grande mobilidade dos BTEX em água, esses compostos podem alcançar os lençóis freáticos, vindo a contaminar grande quantidade de água potável em um curto intervalo de tempo, o que representa um grande risco ambiental e de saúde pública (COATES, ANDERSON, 2000; DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2009).

Atualmente, existe uma grande procura por tecnologias de tratamento que sejam capazes de remover esses compostos de águas e que atendam a uma série de fatores, dentre os quais se podem apontar: a busca por processos mais eficientes, atendimento às exigências ambientais, processos menos onerosos, unidades mais compactas que operem com maior flexibilidade e com boa eficiência, menor custo de instalação e manutenção, dentre outros aspectos (MELLO, 2007).

Existem métodos não biológicos (físicos e químicos) e biológicos aplicados na remoção de BTEX presentes em águas contaminadas, os quais serão descritos adiante:

#### 3.5.1 Processos não biológicos

Os processos não biológicos utilizados na remoção de hidrocarbonetos incluem a adsorção em carvão ativado ou zeólita, *air stripping*, oxidação fotocatalítica, filtração por membranas, clarificação química, dentre outros (AYOTAMUNO *et al.*, 2006; VIDAL, 2011; FARHADIAN *et al.*, 2008; SHAH, NOBLE, CLOUGH, 2004).

Shah, Noble e Clough. (2004) estudaram a eficiência da técnica de *air stripping* na remoção de compostos orgânicos voláteis (COV), incluindo os BTEX. Os autores concluíram que apesar do sistema ser bastante utilizado em indústrias petroquímicas e demonstrar boa eficiência de remoção, tal técnica não era muito indicada sob o ponto de vista ambiental, haja vista que havia apenas uma transferência dos poluentes da fase líquida para a gasosa, e não a sua remoção (TIBURTIUS, PÉRALTA-ZAMORA, LEAL, 2004).

Da mesma forma, a adsorção por carvão ativado granular é uma técnica viável para purificação de águas contaminadas por BTEX, mas os elevados custos com a recuperação do adsorvente tornam esse processo bastante oneroso (DAIFULLAH, GIRGIS, 2003).

Atualmente, os processos oxidativos avançados (POAs) têm aparecido como uma boa alternativa de tratamento de esgotos e águas contaminadas, principalmente em razão da sua elevada eficiência de remoção, mesmo para compostos mais resistentes à degradação como os BTEX (TIBURTIUS *et al.*, 2005).

Tiburtius *et al.* (2005) avaliaram a remoção dos BTEX por meio de POA (TiO<sub>2</sub>/UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton e foto-Fenton) e obtiveram remoções acima de 90% para todos os compostos em aproximadamente 5 minutos de contato. Entretanto, os aspectos econômicos ainda são a maior desvantagem de tais processos (FARHADIAN *et al.*, 2008).

### 3.5.2 Processos biológicos

Entre as várias tecnologias disponíveis para o tratamento de efluentes contendo hidrocarbonetos monoaromáticos, os métodos biológicos vêm recebendo grande destaque, pois, além de apresentar menor consumo de energia, esses processos podem ser potencialmente eficientes, haja vista que a mineralização promove a destruição permanente dos resíduos e elimina os riscos de futuras contaminações, aumentando o nível de aceitação por parte da opinião pública (SHIM, SHIN, YANG, 2002; MUZAINI, 1998 *apud* NETO *et al.*, 2006; VIDALI, 2001). Ademais, os processos biológicos podem ser combinados a outros processos para o aumento da eficiência global do tratamento (MELLO, 2007; NETO *et al.*, 2006).

Os processos biológicos de degradação (biodegradação) dos compostos orgânicos são realizados por meio da quebra desses compostos por microrganismos vivos capazes de transformar compostos complexos em produtos menos tóxicos, tais como CO<sub>2</sub>, água, metano e sais inorgânicos (BITTKAU *et al.*, 2004; FARHADIAN *et al.*, 2009; MARTÍNEZ, CUERVO-LÓPEZ, GOMEZ., 2007; MELLO, 2007).

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, em que os compostos químicos orgânicos são transformados em compostos inorgânicos, tais como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação, em que os compostos químicos orgânicos são transformados em estruturas menores e (c) co-metabolismo, em que outro composto é metabolizado inicialmente ou simultaneamente a um composto específico (DALTON *et al.*, 1982 *apud* MELLO, 2007).

Essas tecnologias podem ser realizadas *in-situ*, no próprio ambiente contaminado, ou *ex-situ*, ou seja, com a remoção do material contaminado para o tratamento em local externo ao de sua origem (FARHADIAN *et al.*, 2008; PEDROZO *et al.*, 2002). As



tecnologias *in-situ* apresentam baixos custos e facilidade operacional, boa eficiência e a redução da formação de subprodutos tóxicos, porém são técnicas que não estão sob condições controladas, logo as variáveis presentes no meio podem interferir negativamente no processo de tratamento e também requerem um longo tempo para obter bons resultados de eficiência de remoção (DOTT *et al.*, 1995).

O processo *ex-situ*, que pode ser conduzida por meio de reatores biológicos sob condições controladas como pH, temperatura, aeração (quando presente) e agitação (quando presente), tem se mostrado bastante eficiente na remoção dos principais poluentes orgânicos presentes na gasolina (GUIEYSSE *et al.* 2000; KRYST e KARAMANEV, 2001; OHLEN *et al.*, 2005; ZILOUEI, GUIEYSSE, MATTIASSON, 2006), inclusive os monoaromáticos (BTEX) (CATTONY *et al.*, 2005; DE NARDI *et al.*, 2005; DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2007; JO *et al.*, 2008; MARTÌNEZ, CUERVO-LÓPEZ, GOMEZ, 2007). Pode ser considerada a melhor tecnologia utilizada nessa área, mesmo apresentando alguns inconvenientes como produção de lodo e consumo de energia (LU, LIN, CHU, 2002).

Os processos de biorremediação de águas contaminadas por hidrocarbonetos dependem de uma série de fatores, a citar (ANDREONI, GIANFREDAN, 2007):

- a) fonte e concentração de poluentes;
- b) propriedades físicas e químicas dos compostos;
- c) biodegradabilidade dos contaminantes;
- d) método de detecção e determinação de poluentes;
- e) normas ambientais relativas às concentrações permitidas para aquele poluente.

Os processos biológicos de tratamento podem ainda ser divididos em: aeróbios e anaeróbios. Estes processos são sucintamente descritos a seguir.

### 3.5.2.1 Tratamentos Aeróbios

O tratamento aeróbio de efluentes é realizado por comunidades microbianas heterogêneas, incluindo predominantemente bactérias, fungos e protozoários como fonte de carbono e/ou energia (doador de elétrons), utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons. A remoção aeróbia de compostos gera como produtos metabólitos CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (MELLO, 2007; PEDROZO *et al.*, 2002).

Os principais biorreatores aeróbios utilizados na remoção de hidrocarbonetos monoaromáticos em matrizes aquosas empregam os sistemas que envolvem o crescimento microbiano aderido em diferentes meios suportes (poliuretano, lascas de madeira, conduites, areias etc.), pois estes apresentam uma elevada área superficial para o crescimento microbiano, são compactos, possuem maior capacidade de retenção de biomassa metabolicamente ativa, quando comparado aos sistemas de crescimento suspenso, e podem operar com baixos TDH (KERMANS SHAH, KARAMANEV, MARGARITISL, 2005; LANGWALDT E PUHAKKA, 2000).

Dentre os vários reatores podem ser destacados os sistemas de lodos ativados, reator de leito fluidizado (FBR), reator de leito fixo submerso (SFFR) e reator com concentração de biomassa (BCR) (GUERIN, 2002; LODAYA *et al*, 1991 *apud* FARHADIAN *et al.*, 2008; PRUDEN *et al.*, 2003; OHLEN *et al*, 2005;. ZEIN *et al*, 2006).

Os processos aeróbios de tratamento têm desempenhado um importante papel na remediação de águas contaminadas por derivados do petróleo (SANTAELLA *et al.*, 2009), incluindo os BTEX, apresentando eficiências de até 99% de remoção (GUERIN, 2002; OHLEN *et al*, 2005;. ZEIN *et al*, 2006). Entretanto, esses processos podem apresentar perdas significativas dos compostos por volatilização durante a aeração e apresentam elevada produção de lodo quando comparado aos processos anaeróbios (FARHADIAN *et al.*, 2008).

### 3.5.2.2 Tratamentos Anaeróbios

O processo anaeróbio, ou digestão anaeróbia é um processo natural e complexo que ocorre na ausência de oxigênio molecular, envolvendo um consórcio de microrganismos que atuam de maneira simbiótica na conversão da matéria orgânica complexa (carboidratos, proteínas, lipídios) em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico, amônia e nitrogênio gasoso, além de novas células bacterianas (CHERNICHARO, 2007; MELLO, 2007).

Segundo McCarty e Smith (1986), as principais reações bioquímicas envolvidas nesse processo caracterizam os grupos de microrganismos que predominam no sistema, podendo o mesmo ser dividido em três etapas: hidrólise e acidogênese (microrganismos fermentativos), acetogênese (microrganismos acetogênicos), e metanogênese (microrganismos metanogênicos).

É comum a presença de sulfato em diversos tipos de efluentes. Estes compostos em meio anaeróbio podem inibir a metanogênese devido à competição por substrato entre os microrganismos produtores de metano (metanogênicos) e as bactérias redutoras de sulfato

(BRS), as quais utilizam o sulfato como acceptor de elétrons (COSTA, 2010; SAKAMOTO, 1996). Estas podem oxidar seus substratos de forma incompleta tendo como produto final o acetato e/ou oxidar completamente seu substrato tendo como produtos finais gás carbônico e gás sulfídrico, processo denominado sulfetogênese (CHERNICHARO, 2007).

Na presença de nitrato, em meio anaeróbio, as bactérias capazes de utilizar esse composto para obtenção de energia iniciam o processo de desnitrificação (e.g. *Pseudomonas*), o qual consiste na redução de nitrato a nitrogênio molecular, seguindo as seguintes etapas: (a) redução de nitrato a nitrito; (b) posteriormente, nitrito é reduzido a óxido nítrico; (c) uma vez produzido este óxido de nitrogênio gasoso, o mesmo será convertido a óxido nitroso; (d) por fim, será reduzido a nitrogênio gasoso (GUSMÃO, 2005).

De acordo com Farhadian *et al.* (2007), dentre os benefícios apresentados pelo processo de tratamento anaeróbio podem-se citar a ausência de equipamentos sofisticados; produção de metano, um gás combustível de elevado teor calorífico, sendo utilizável energeticamente; baixa produção de lodo, cerca de 5 a 10 vezes inferior a que ocorre nos processos aeróbios; baixa demanda de área, reduzindo os custos de implantação e menor consumo de energia, gerando custos operacionais menores; dentre outras.

Avanços significativos foram realizados nos últimos anos no que diz respeito à biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos monoaromáticos (DOU *et al.*, 2010; COATES, ANDERSON, 2004). Sabe-se, hoje, que, contaminantes antes considerados recalcitrantes, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno, podem ser biodegradados na ausência de oxigênio por uma diversidade de microrganismos (DOU *et al.*, 2008; FARHADIAN *et al.*, 2010; MAZZEO *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

A literatura reporta que o uso de aceptores finais de elétrons na remediação anaeróbia de águas subterrâneas e efluentes contendo BTEX tem melhorado bastante a eficiência de diversos sistemas de tratamento (DOU *et al.*, 2008). Vários compostos têm sido utilizados como acceptor de elétrons em processos envolvendo a biodegradação de BTEX, dentre eles o  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e o manganês (ANDERSON, LOVLEY, 2000; COATES; ANDERSON, 2000; DA SILVA, RUIZ-AGUILAR, ALVAREZ, 2005; DOU *et al.*, 2008 e 2010; FARHADIAN *et al.*, 2010). Adicionalmente foi demonstrado que a degradação anaeróbia de benzeno e tolueno também pode ser associada à redução de substâncias húmicas (CERVANTES *et al.*, 2001; CERVANTES *et al.*, 2011).

### 3.6 Remoção de BTEX em sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo

A literatura ainda reporta poucos estudos no que diz respeito à utilização de sistemas contínuos de tratamento na remoção de BTEX.

Diversas configurações de reatores anaeróbios, como biorreatores anaeróbios horizontais de biomassa imobilizada (HAIB) (DE NARDI *et al.*, 2002, 2005, 2006; CATTONY *et al.*, 2005, 2007; GUSMÃO *et al.*, 2006, 2007) e reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), têm sido usados para biorremediação de águas contaminadas com hidrocarbonetos monoaromáticos (MARTÍNEZ *et al.*, 2007).

O Quadro 3 compila alguns dos trabalhos sobre a remoção de BTEX em sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo. Pode-se observar que as eficiências variaram de 60 a aproximadamente 100%, sendo os melhores resultados obtidos em reatores com crescimento aderido. No entanto, esses estudos não apresentam discussões sobre a possível adsorção dos compostos no meio suporte ou sobre a possível volatilização desses compostos e a sua composição no biogás.

De um modo geral, a eficiência dos biorreatores pode variar com a sua configuração, concentração afluente dos compostos, tipo de lodo de inóculo utilizado, tempo de detenção hidráulica (TDH) empregado e tipo de acceptor de elétrons utilizado. Alguns estudos reportam redução da eficiência de remoção de BTEX com o aumento da concentração afluente desses poluentes (DE NARDI *et al.*, 2002, 2005; DE NARDI; ZAIAT; FORESTI, 2007; ENRIGHT; COLLINS; O'FLAHERTY, 2007; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Entretanto, há estudos que mostram o contrário (GUSMÃO *et al.*, 2006) ou, até mesmo, nenhuma relação direta entre eficiência de remoção e concentração afluente dos BTEX (CATTONY *et al.*, 2007, 2005; MARTÍNEZ; CUERVO-LÓPEZ; GOMEZ, 2007; QUAN *et al.*, 2007). Normalmente, reatores suplementados com nitrato ou sulfato apresentam melhores eficiências de remoção e estabilidade operacional do que aqueles operados em condições metanogênicas (CATTONY *et al.*, 2005, 2007; GUSMÃO *et al.*, 2006, 2007). Por fim, embora a literatura não reporte muitos estudos acerca da influência do TDH, a sua redução parece influenciar de forma negativa na eficiência de remoção de BTEX (DE NARDI *et al.*, 2002).

Quadro 3 – Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX.

(continua)

Reator <sup>a</sup>	TDH (h)	T (°C)	Tipo de BTEX <sup>b</sup>	Conc. BTEX (mg/L)	Tipo de Co-substrato	Aceptor de elétrons	Conc. aceptor (mg/L)	Remoção(%)	Referência	
HAIB	13,5	27-33	B	9,7	Etanol	-	-	~99	de Nardi <i>et al.</i> (2002)	
			T	7,1				~99		
			E	5,3				~98		
			o-X	5,6				~98		
			(m+p)-X	9,9				~99		
	5,3-13,5	27-33	B	11,8	Alquilbenzeno sulfonato linear	-	-	~97		
			T	8,7				~96		
			E	7,0				~96		
			o-X	8,0				~96		
			(m+p)-X	14,3				~98		
HAIB	11,4	29-31	B	3,3-14,3	Etanol	-	-	80-90	de Nardi <i>et al.</i> (2005)	
			T					80-93		
			E					86-97		
			o-X					84-96		
			(m+p)-X					85-98		
HAIB	12	28-32	T	2-9	Etanol	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	500	~100	Cattony <i>et al.</i> (2005)	
HAIB	12	28-32	B	13-27	Etanol	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	345-555	93-99	Gusmão <i>et al.</i> (2006)	
			T					31		99
			E					33		99
			m-X					32		99
			B					2-10		Etanol
HAIB	12	28-32	B	41	Etanol	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	520	89	Gusmão <i>et al.</i> (2007)	
			T					28		99
			E					31		99
			o-X					29		94
			m-X					28		99
			p-X					32		99

Quadro 3 – Sistemas anaeróbios operados em fluxo contínuo na remoção de BTEX.

(conclusão)

Reator <sup>a</sup>	TDH (h)	T (°C)	Tipo de BTEX <sup>b</sup>	Conc. BTEX (mg/L)	Tipo de Co-substrato	Aceptor de elétrons	Conc. aceptor (mg/L)	Remoção(%)	Referência
HAIB	11,4	29-31	B T E o-X	5,5-15 5-13 4,9-12 4,9-12	Etanol	-	-	60-67 65-70 68-73 64-69	de Nardi, Zaiat e Foresti (2007)
EGSB	24-48	15	T	6-85	Etanol, butirato, propionato e acetato	-	-	82-100	Enright, Collins e O'Flaherty (2007)
UASB	48	30	T	55-275	Acetato	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1575	95-99	Martínes, Cuervo-López e Gomez (2007)
FA	24	30	B	6,5-33,5	Glicose, naftaleno e bifenil	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	88-975	~90	Quan <i>et al.</i> (2007)
EGSB	24	9-15	T	4,5-155	Etanol, butirato, propionato e Acetato	-	-	72-96	McKeon <i>et al.</i> (2008)
UASB	48	30	T	55-219	Acetato	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	315	51-91	Martínez-Hernández <i>et al.</i> (2009)

Fonte: a autora.

<sup>a</sup>Tipo de reator: HAIB, *horizontal-flow anaerobic immobilized biomass* (reator anaeróbio de fluxo horizontal e biomassa imobilizada); EGSB, *expanded granular sludge bed* (reator de leito granular expandido); UASB, *upflow anaerobic sludge blanket* (reator de manta de lodo e fluxo ascendente); FA, filtro anaeróbio.

<sup>b</sup>B, benzeno; T, tolueno; E, etilbenzeno; o-X, orto-xileno; m-X, meta-xileno; p-X, para-xileno; (m+p)-X, mistura de meta- e para-xilenos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação dos BTEX

#### 4.1.1 Reagentes e soluções

Todos os BTEX utilizados, isto é, o benzeno (BZ), o tolueno (TO), e os isômeros aromáticos de xileno (etilbenzeno, EB; m-xileno, MX; p-xileno, PX; o-xileno, OX) foram adquiridos com grau analítico e sem purificação adicional. O benzeno, da marca Dinâmica Química Contemporânea, tinha pureza de 99,5%; o EB, o MX e o PX, todos da marca *Sigma-Aldrich*, tinham pureza de 99,0%; o tolueno, marca Vetec Química Fina, e o orto-xileno, marca *Fluka*, tinham pureza de 99,5% e 98,0%, respectivamente; o composto clorobenzeno, utilizado como padrão interno nas análises cromatográficas, e o etanol, utilizado como co-substrato nos reatores biológicos, ambos da marca Vetec Química Fina, tinham purezas de 99,0%. O metanol, marca *Sigma-Aldrich*, usado como solvente de soluções padrão de BTEX para as análises cromatográficas tinha pureza de 99,9%.

As soluções padrão de BTEX (0,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 e 1000 µg/L) eram sempre preparadas imediatamente antes do uso, em água ultrapura (sistema - *Milli-Q, Millipore*), a partir da diluição de uma solução metanólica estoque de 1000 mg/L de BTEX, a qual era armazenada a 4°C por um período inferior a 30 dias. A solução metanólica de clorobenzeno (padrão interno), na concentração de 100 mg/L, era preparada a partir da diluição do reagente analítico, sendo posteriormente adicionada a cada amostra para se obter uma concentração final de 100 µg/L.

Em todas as determinações de BTEX, os padrões eram preparados diretamente em *vials* para *headspace* (20 mL) de vidro borossilicato (*Supelco*), previamente lavados em banho ultrassônico, com capacidade útil de 2,1 L, marca Cristofoli Biossegurança, e lacrados imediatamente, após a adição dos padrões, com septos de PTFE/silicone (*Supelco*) e lacres de alumínio, evitando a volatilização dos compostos em estudo. Todos os padrões eram preparados em duplicata.

#### 4.1.2 Métodos de extração e determinação dos BTEX

A determinação dos BTEX em matrizes aquosas foi realizada por extração utilizando *headspace* estático seguido de cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás *Trace GC Ultra* (Thermo Scientific, USA) equipado com dois detectores em série - detector por fotoionização (PID) e por ionização em chama (FID) – e um amostrador automático para *headspace* *Triplus Autosampler HS* (Thermo Scientific, USA), o qual dispõe de 54 espaços para *vials*, um braço robótico, uma unidade de extração por *headspace* estático, equipada com forno para aquecer e agitar as amostras, e uma seringa com capacidade de 3 mL para transferir a amostra para o cromatógrafo (Figura 3).

Figura 3 - Cromatógrafo HS-GC-PID-FID utilizado na determinação dos BTEX estudados.



Fonte: a autora.



Após extração, cujas condições otimizadas estão dispostas na Tabela 1, 0,3 mL do *headspace* da amostra eram injetados no modo *splitless* por 1 min, e a separação cromatográfica era realizada em uma coluna capilar OV-5 (5% fenil, 95% dimetilpolissiloxano), marca *Ohio Valley*, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e com espessura do filme da fase estacionária de 0,25  $\mu\text{m}$ , utilizando hidrogênio (4.5 FID, pureza 99,995%) como gás de arraste na vazão de 3,0 mL/min e nitrogênio (4.6 FID, pureza 99,996%) como gás *makeup*. Todos os gases utilizados eram da marca White Martins.

As temperaturas do injetor, do forno (programação de temperatura) e dos detectores, bem como as vazões dos gases utilizados nos ensaios estão descritas na Tabela 1 e na Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1 – Condições cromatográficas do GC-HS-PID-FID.

Parâmetros	HS	PID	FID
Temperatura de incubação ( $^{\circ}\text{C}$ )	70	-	-
Tempo de incubação (min) <sup>a</sup>	15	-	-
Temperatura da seringa ( $^{\circ}\text{C}$ )	110	-	-
Temperatura do injetor	-	250	
Temperatura do detector ( $^{\circ}\text{C}$ )	-	240 <sup>b</sup>	250
<i>Sheath gas</i> ( $\text{N}_2$ ) (mL/min)	-	40	-
<i>Make-up gas</i> ( $\text{N}_2$ ) (mL/min)	-	7	30
Ar sintético (chama) (mL/min)	-	-	350
Hidrogênio (chama) (mL/min)	-	-	35

Fonte: a autora.

Nota: HS, *headspace*; PID, detector por fotoionização; FID, detector por ionização em chama.

<sup>a</sup> Em ciclos alternados com 10 s de agitação e 20 s de repouso.

<sup>b</sup> Detector equipado com lâmpada de 10,6 eV.

Tabela 2 – Programação de temperatura usado na análise cromatográfica.

Razão ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	Temperatura final ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (min)
-	35	7
35	120	2,14

Fonte: a autora.

Nota: tempo total da corrida: 11 min.

#### 4.1.3 Otimização da extração dos BTEX

Para otimizar as condições analíticas de extração dos BTEX por *headspace* e, logo, aumentar a sua sensibilidade da análise cromatográfica, utilizou-se o planejamento composto central rotacional, em que foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^4$  (i.e., quatro fatores com dois níveis), incluindo oito pontos axiais e três repetições no ponto central para avaliação do erro puro, totalizando vinte e sete ensaios, os quais foram realizados de forma aleatória. As variáveis (fatores) otimizadas foram: salinidade para avaliar o efeito da força iônica (efeito *salting out*), volume de amostra líquida dentro do *vial* para *headspace*, tempo de incubação da amostra e temperatura de extração, cujos valores utilizados no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 3. As variáveis de resposta eram as áreas dos picos cromatográficos de cada analito.

Tabela 3 – Valores utilizados no planejamento composto central rotacional para otimização da extração por *headspace* dos BTEX.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
Salinidade (g/L de NaCl)	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Volume de amostra (mL)	5	7,5	10	12,5	15
Tempo de incubação (min)	5	10	15	20	25
Temperatura de extração (°C)	50	60	70	80	90

Fonte: a autora.

#### 4.1.4 Calibração e validação do método cromatográfico para determinação dos BTEX

Após a otimização da extração, realizou-se a calibração do método cromatográfico, utilizando-se o método do padrão interno, ou seja, introdução de quantidades iguais do clorobenzeno (padrão interno) em amostras contendo concentrações conhecidas de BTEX (0,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 e 1000  $\mu\text{g/L}$ ), a partir das quais foi elaborada a curva de calibração de cada analito.

A validação da metodologia analítica foi realizada através dos testes de seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. A seletividade foi determinada por meio da análise de uma amostra aquosa da torre de destilação da Lubrificantes e Derivados de Petróleo do Nordeste (LUBNOR), onde a presença dos analitos foi verificada por HS-CG-PID-FID. A LUBNOR é uma das refinarias de petróleo da Petrobrás, localizada na cidade de Fortaleza, no estado do Ceará, cujos principais produtos

são: o Cimento Asfáltico Processado - CAP, usado na pavimentação de rodovias, e os lubrificantes naftênicos, usados na formulação de diversos óleos lubrificantes comerciais.

A linearidade foi avaliada pelos valores dos coeficientes de correlação das curvas analíticas construídas com nove concentrações diferentes de BTEX. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados segundo a Resolução ANVISA nº 889/2003 (BRASIL, 2003), por meio da Equação 4 e da Equação 5, descritas na subseção 3.4.2.

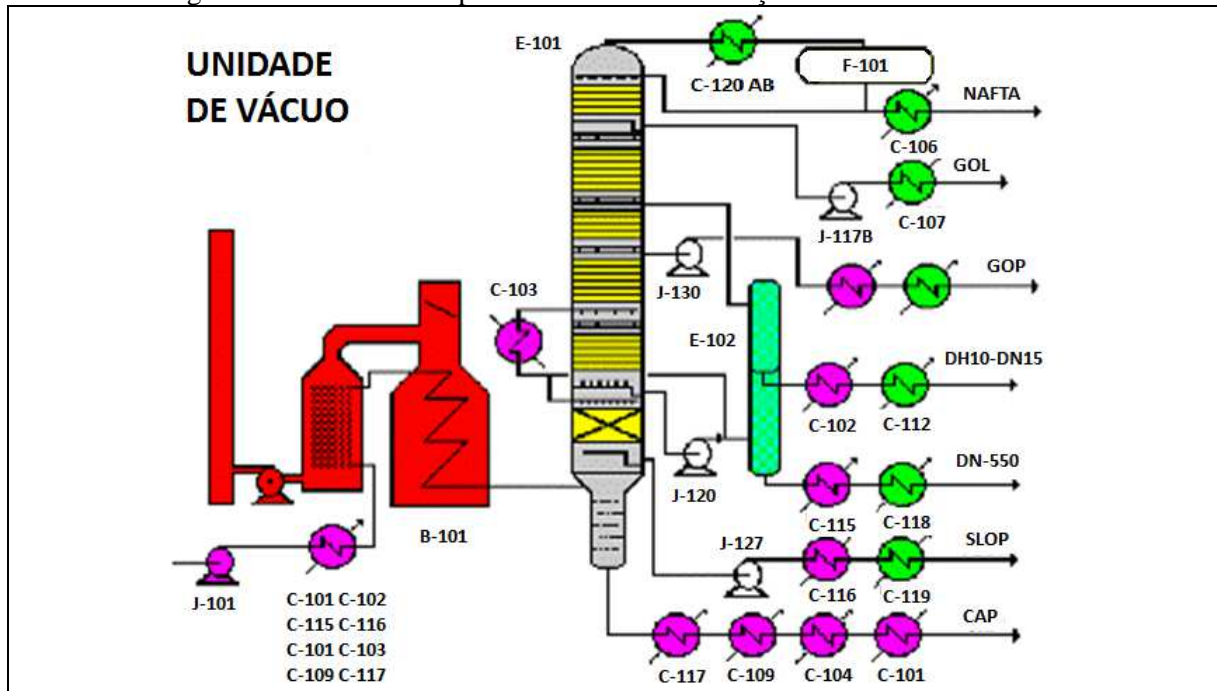
A precisão foi obtida a partir da repetibilidade do método por meio do desvio padrão relativo das áreas e do tempo de retenção obtidos na análise de dez replicatas de uma solução padrão de BTEX com concentração de 100 µg/L. A exatidão foi determinada pela recuperação das concentrações de BTEX dopadas nas amostras coletadas na LUBNOR.

#### 4.1.5 Detecção de BTEX em uma amostra real

A amostra utilizada para validar a metodologia analítica desenvolvida para a determinação dos BTEX foi coletada da torre de destilação a vácuo de petróleo da LUBNOR.

A Figura 4 ilustra o processo de destilação a vácuo utilizado pela LUBNOR, no qual o petróleo cru é bombeado (J-101) dos tanques de estocagem, aquecido no forno de carga (B-101) e injetado no fundo da torre de destilação a vácuo (E-101). Nesta torre, o petróleo é fracionado com ao auxílio do vapor de retificação, que também é injetado no fundo da torre, de onde é retirado o asfalto (CAP). As frações intermediárias do petróleo (destilados do tipo pesado, médio e leve) são retiradas nas bandejas coletoras de acordo com suas viscosidades (DNL, DNM e DNP) e enviadas para a torre retificadora (E-102) lateral. Os produtos mais leves (nafta + GLP), juntamente com o vapor d'água e os gases incondensáveis (especialmente o CH<sub>4</sub>), são removidos pelo topo da torre. Ao sair da torre, os gases passam pelos condensadores de topo (C-120 A/B) e são enviados para o vaso separador (F-101). No vaso F-101, a nafta é separada da água (condensado do vapor) por diferença de densidade. A nafta sobrenadante é coletada e bombeada para estocagem, e o condensado (emulsão) do vaso F-101 é enviado para os tanques drenários, os quais têm como objetivo de separar e recuperar o óleo arrastado nas dessalgadoras e nas drenagens dos tanques de petróleo. O óleo recuperado neste tem teor de água adequado para reprocessamento. A água residual é encaminhada para a unidade de tratamento de esgotos.

Figura 4 – Sistema de Topo da Unidade de Destilação à Vácuo da LUBNOR



Fonte: LUBNOR-Petrobrás.

A amostra utilizada no experimento foi retirada do condensado do vaso separador F-101, sendo formado basicamente por água (condensado do vapor de retificação injetado na torre) e alguma nafta emulsionada. Os principais compostos presentes são normalmente: fenol, sulfeto, amônia e BTEX.

A coleta foi realizada em frasco de vidro, o qual foi preenchido de líquido até a borda para que não houvesse *headspace*, mantido a 4°C, e transportado ao Laboratório de Saneamento (LABOSAN) localizado no Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As análises cromatográficas com a amostra real foram realizadas imediatamente após a coleta.

#### 4.2 Teste de Atividade Metanogênica Específica (AME)

Atualmente vários tipos de protocolo em relação ao teste de atividade metanogênica específica (AME) têm sido propostos. A AME consiste na avaliação da capacidade de um dado inóculo em produzir metano a partir da degradação de um substrato. Entretanto, é difícil a comparação dos dados presentes na literatura, não somente devido à variedade de equipamentos utilizados, mas também devido aos diferentes protocolos e condições ambientais que são utilizadas, tais como relação inóculo/nutriente, volume de *headspace*, pH, tipo de substrato e o sistema de detecção (POERSCH, KOETZ, 1998; ANGELIDAKI *et al.*, 2009).

Portanto, a metodologia utilizada para avaliar a AME do inóculo estudado nos experimentos contínuos dessa pesquisa foi realizada de acordo com as condições ambientais sugeridas por Nieto (2006) e Angelidaki *et al.* (2009), conforme se segue:

- 1) inicialmente caracterizou-se o lodo (inóculo) em relação aos sólidos suspensão (SS) e sólidos suspensos voláteis (SSV), o qual foi coletado de um reator anaeróbio de circulação interna (IC) da estação de tratamento de efluentes de uma indústria de cerveja localizada no município de Horizonte, Ceará;
- 2) o lodo foi diluído para uma concentração em torno de 5g SSV/L (1:10) e separados em 4 partes iguais em béquer de 250 mL;
- 3) foram adicionados os três substratos avaliados, glicose, AGV's e acetato, em quantidade necessária para obter uma concentração final de 2,5 g DQO/L (relação alimento/microrganismo (A/M) em torno de 0,5). Uma amostra sem fonte de carbono foi também adicionada ao teste como controle endógeno;
- 4) acrescentou-se macro e micronutrientes em quantidades suficientes para que não houvesse limitação do crescimento microbiano, conforme as especificações de concentrações mostradas na Tabela 4 e na Tabela 5;
- 5) o pH das quatro soluções foi ajustado para 6,8 a 7,2 com soluções de HCl e NaOH, ambas com concentração de 1 mol/L;
- 6) adicionou-se o tampão de bicarbonato numa concentração de 1 g de NaHCO<sub>3</sub> para cada litro de meio basal e, em seguida, verificou-se novamente o pH;
- 7) uma alíquota de 50 mL das amostras foram transferidas para frascos de vidro de 110 mL, previamente calibrados, sendo em seguida lacrados com septos de borracha e prendedores em alumínio;
- 8) embora Estrada-Vázquez, Macarie e Takayuki Kato (2001) tenham concluído que a biomassa anaeróbia é resistente à presença de oxigênio quando não há ausência de substrato, optou-se pela manutenção do ambiente anaeróbio dentro dos frascos. Por isso, foi realizada a purga do gás dentro dos frascos com N<sub>2</sub> grau FID por 1 minuto;
- 9) todos os testes foram realizados em triplicata, sendo os frascos incubados em um *shaker* orbital, MA-420 Marconi, mostrado na Figura 5, por um período de cerca de 30 dias, sob condições controladas de temperatura (35°C) e agitação (150rpm);
- 10) após os testes foram determinadas as concentrações de SSV e o pH das garrafas.

Tabela 4 – Concentrações da solução de macronutrientes

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	280
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10

Fonte: Dos Santos (2005).

Tabela 5 – Concentrações da solução de micronutrientes

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2000
ZnCl	50
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	500
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	38
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	50
AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	90
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2000
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	92
NaSeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	162
EDTA	1000
HCl 36%	1

Fonte: Dos Santos (2005).

Nota: adicionava-se 1 mL de solução de micronutrientes para cada litro de meio basal.

A determinação da quantidade de biogás produzida foi realizada por método manométrico, em que, mantendo-se constantes a temperatura e o volume da fase gasosa (*headspace*) do frasco de reação, o volume de biogás produzido corresponde ao acréscimo da pressão dentro do frasco, sendo medido com o auxílio de leitores de pressão (manômetros).

O biogás foi caracterizado e quantificado por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo GC 17A, marca Shimadzu, ilustrado na Figura 6, acoplado a um detector de condutividade térmica (TCD), cujas condições de análise estão especificadas na Tabela 6.

A curva de calibração para a quantificação do biogás foi realizada fazendo-se diluições sucessivas de uma mistura gasosa de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (60:40 em massa, White Martins) com o ar. As diluições eram realizadas em bulbo de vidro para amostragem de gás, marca Supelco, com capacidade de 125 mL (ver subseção 4.3.2) e os analitos foram separados em uma coluna Rt-QPLOT (PEG Modificado com Ácido Nitrotereftálico) da Restek, com 30 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno.

Figura 5 – Equipamento utilizado na realização do teste de Atividade Metanogênica Específica (AME).



Fonte: a autora.

Nota: (a) leitor de pressão, em mbar; (b) incubadora do tipo shaker orbital.

Tabela 6 – Condições cromatográficas do GC/TCD utilizadas na análise do biogás no teste de AME

<b>Parâmetros GC-TCD</b>	
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Volume de injeção (mL)	1
Temperatura do injetor (°C)	40
Gás de arraste	He
Fluxo na coluna (mL/min)	0,7
Temperatura do forno (°C) <sup>a</sup>	50
Temperatura do detector (°C)	200
Tempo de corrida (min)	5

Fonte: a autora.

Nota: <sup>a</sup> Programação de temperatura isotérmica.

Figura 6 – Cromatógrafo GC-TCD utilizado para a determinação e quantificação do metano e gás carbônico no biogás



Fonte: a autora.

O valor da AME foi dado em função da DQO convertida em metano (g DQO/g SSV·d), conforme a Equação 6.

$$AME = \frac{\frac{V_{CH_4}}{t}}{FC \cdot SSV \cdot \frac{V_{líq}}{1000}} \quad (6)$$

Onde:  $V_{CH_4}$  é o volume de metano produzido durante o tempo do experimento, em mL;  $t$  é o tempo de duração do teste, em dias;  $FC$  é o fator de conversão estequiométrico (390 mL de  $CH_4$ /g  $DQO_{rem}$ );  $SSV$  é massa estimada de microrganismos presentes na amostra analisada, em g SSV/L; e  $V_{líq}$  é o volume de amostra (lodo + meio basal) utilizado no teste de AME, em mL.



### 4.3 Ensaio em fluxo contínuo

#### 4.3.1 Confeção e operação dos reatores anaeróbios

Os reatores UASB utilizados neste estudo foram inicialmente confeccionados, pela equipe atuando neste projeto, na forma de um reator tipo “Y” de cinco litros, com um separador trifásico na base da bifurcação (CAVALCANTI, 2003). Os detalhes construtivos e algumas vantagens deste tipo de reator são descritos em Da Silva (2011) e em Firmino (2009). Mencione-se que se utilizou uma mangueira de silicone na coleta de biogás, enquanto que o transporte do afluente e efluente dos reatores se dava em mangueiras plásticas transparentes comuns. Uma fotografia deste sistema de reatores, juntamente com o refrigerador usado no acondicionamento do reservatório do afluente, é mostrada na Figura 7.

Figura 7 – Conjunto de reatores UASB usados na inoculação e na avaliação inicial do lodo anaeróbio utilizado neste estudo



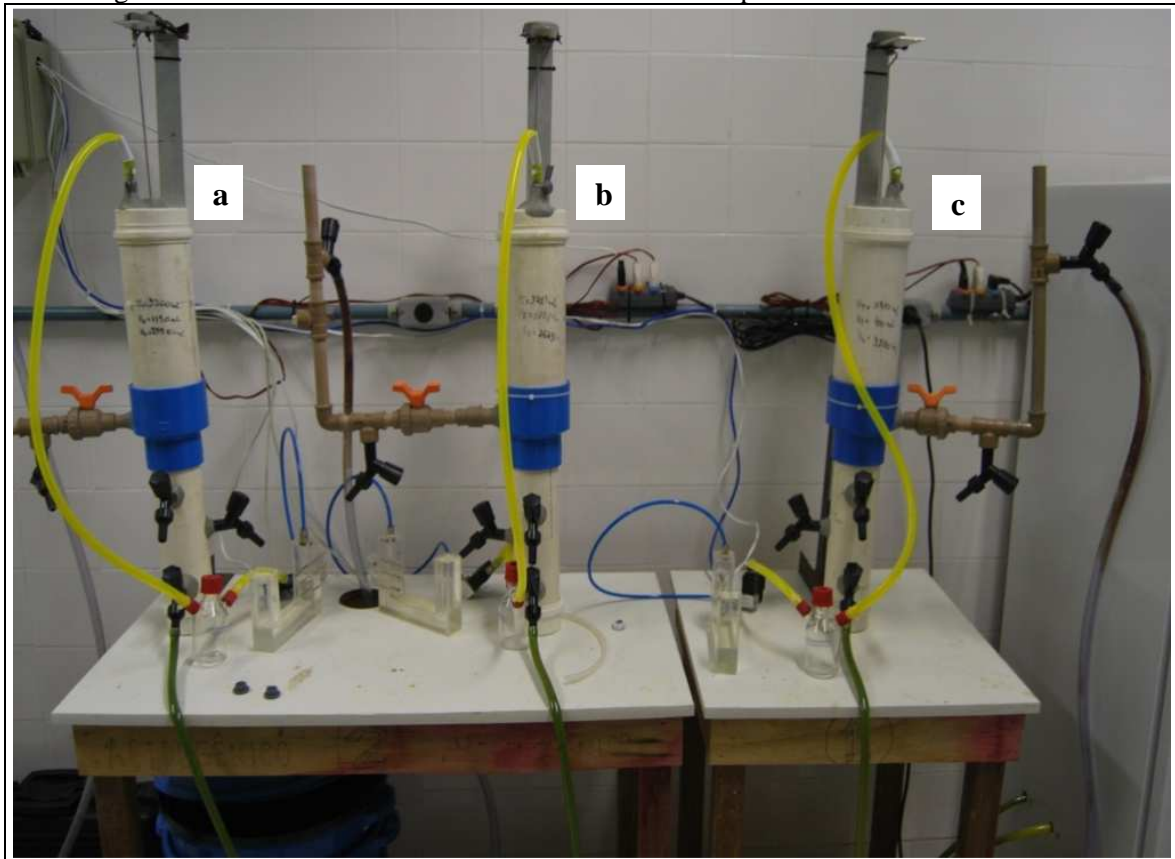
Fonte: a autora.

No entanto, estes sistemas não estavam pressurizando, comprometendo, assim, a mensuração dos volumes de biogás produzidos nos reatores. Tal fato motivou a reformulação da geometria dos reatores, de modo a aumentar a pressurização promovida pelo biogás. Assim, novos reatores com geometria modificada, para uma forma cilíndrica, perdendo o

separador trifásico em “Y”, e com a inserção de um tubo em “L” (semelhante a um piezômetro) para a saída do efluente do sistema foram confeccionados. Os sistemas reacionais modificados são ilustrados na fotografia da Figura 8.

Assim, a avaliação da biodegradação de BTEX sob condições metanogênicas, desnitrificantes e sulfetogênica foi realizada em fluxo contínuo em três biorreatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente: reator metanogênico (RM), reator desnitrificante (RN) e reator sulfetogênico (RS). Os reatores foram confeccionados a partir de tubos e conexões de PVC para esgoto, os quais apresentavam as mesmas dimensões: diâmetro interno de 75 mm no compartimento de digestão e 100 mm no compartimento de decantação, altura total 64 cm (32 cm em cada compartimento) e volume útil de 3,7 litros. Adicionalmente, os reatores foram dotados de um sistema de homogeneização, uma haste de aço inox acoplada a um motor de microondas, buscando evitar a formação de caminhos preferenciais através da manta de lodo e facilitar o desprendimento do biogás, evitando que houvesse a perda de biomassa através do efluente devido ao efeito pistão (LEITÃO, 2004; FREITAS, NETO, 2007).

Figura 8 – Reatores anaeróbios utilizados durante os experimentos em fluxo contínuo



Fonte: a autora.

Nota: (a) Reator RM; (b) reator RN; (c) reator RS.

Os afluentes eram armazenados em frascos de PVC, com volume total de aproximadamente 7 litros, pressurizados com bolsas para amostragem de gás (*Supelco*) com capacidade de 4 L, contendo nitrogênio (4.6 FID, pureza 99,996%, marca White Martins), a fim de evitar a volatilização dos BTEX dentro dos frascos de alimentação e minimizar o contato do afluente com o oxigênio do ar. Os frascos de armazenamento e as bolsas de pressurização são apresentados na Figura 9. O afluente foi mantido sob refrigeração, durante todo o experimento, a uma temperatura de aproximadamente 5°C, a fim de evitar a proliferação de microrganismos e, portanto, sua degradação prematura.

Os reatores foram alimentados por meio de bombas peristálticas (modelo Minipuls 3, marca Gilson) com vazão média de aproximadamente 1,5 L/d (TDH = 48 h) e mantidos em temperatura ambiente de 28°C ± 2°C. Todas as mangueiras utilizadas nos ensaios de remoção de BTEX eram de *Tygon* (marca *Cole-Parmer*), material inerte aos compostos orgânicos em estudo.

Figura 9 – Frascos de armazenamento de afluente e bolsas de pressurização.



Fonte: a autora.

Nota: (a) Frascos de PVC para o armazenamento de afluente;  
(b) bolsas de pressurização contendo nitrogênio.

O biogás foi monitorado por meio da avaliação diária da sua vazão, que era realizada a partir da leitura da quantidade de pulsos gerados em um quadro elétrico, apresentado na Figura 10. O volume diário de biogás era determinado pela variação do deslocamento do líquido contido num recipiente, previamente calibrado, contendo água. O recipiente de medição do deslocamento de líquido é mostrado na Figura 11.

O pulso (sinal) no quadro elétrico era gerado quando havia a produção de biogás suficiente para deslocar o líquido até o sensor de nível contido no recipiente, onde a eletroválvula de três vias que fazia a conexão entre o quadro e o recipiente se abria e gerava o sinal elétrico relativo ao volume do líquido correspondente ao volume de biogás que estava sendo gerado.

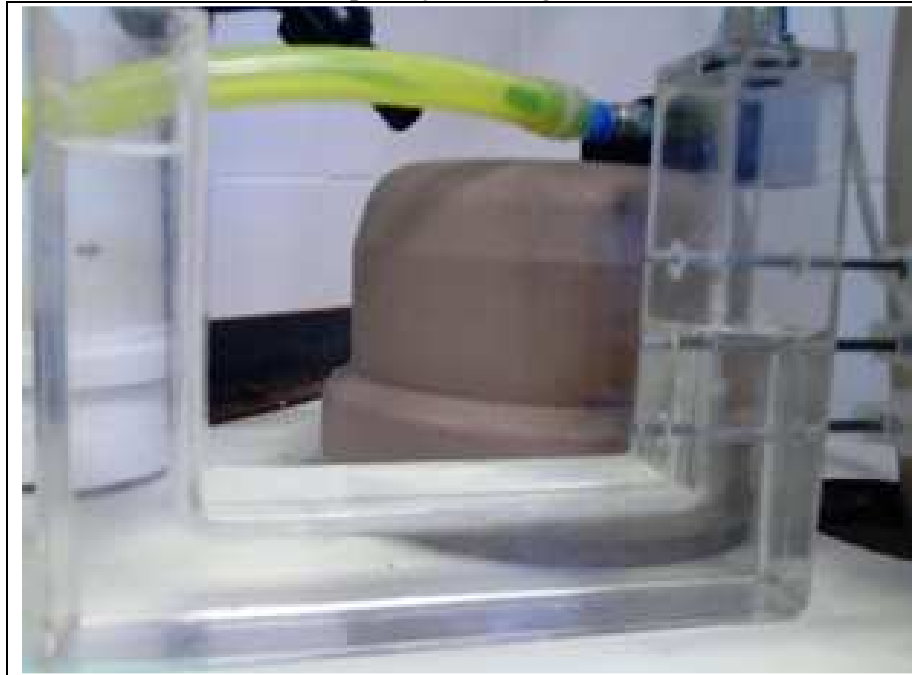
A caracterização do biogás em termos de  $N_2$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$  foi realizada por cromatografia gasosa, conforme descrito na seção 4.2. A mesma era complementada pela detecção de amônia e gás sulfídrico por meio de um medidor individual de gases (Dräger X-am 5600), com capacidade para detectar três gases diferentes simultaneamente. Coletava-se 5 mL do biogás produzido por cada reator, e utilizando o bulbo de vidro de 125 mL, mostrado na Figura 12, fazia-se a diluição daquele produto com ar. O medidor individual de gases vinha acompanhado de um suporte que o conectava ao bulbo de vidro, onde havia uma bomba que succionava o gás aprisionado no bulbo até o detector, onde era feita a leitura das concentrações dos gases monitorados.

Figura 10 – Quadro elétrico onde eram mensurados os pulsos gerados pelo deslocamento do líquido gerado pela produção de biogás



Fonte: a autora.

Figura 11 – Recipiente usado no deslocamento de líquido gerado pela produção de biogás



Fonte: a autora.

Figura 12 – Procedimento de diluição do biogás em bulbo de vidro para quantificação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{S}$



Fonte: a autora.

#### 4.3.2 Inóculo

A biomassa utilizada foi a mesma descrita na seção 4.2. O lodo de inóculo, parcialmente granular, foi caracterizado por meio da análise de sólidos suspensos voláteis (SSV), de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), e inoculados nos reatores a uma concentração de 50 g SSV/L.

#### 4.3.3 Efluente sintético

O efluente sintético era composto por água, BTEX, meio basal, fonte de carbono e tampão. Especificamente para os reatores RN e RS eram adicionados os compostos nitrato de sódio e sulfato de sódio anidro (99%, Vetec, Brasil), respectivamente.

Os BTEX eram adicionados no afluente a partir de diluições de uma solução estoque de 2,5g/L de BTEX, diluída em etanol e água milli-Q, preparada à partir da diluição dos seus padrões analíticos, já descritos na seção 4.1.

O meio basal era composto por macro e micro nutrientes nas mesmas concentrações descritas na seção 4.2. Procurando manter o pH próximo à neutralidade, pH 7, adicionou-se bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) ao afluente na proporção de 1 g de  $\text{NaHCO}_3$  para cada 1 g de DQO aplicada (DOS SANTOS, 2005).

#### 4.3.4 Corridas experimentais nos reatores anaeróbios

Os experimentos foram executados em três fases. Os principais parâmetros operacionais monitorados nestas fases são relacionados na Tabela 7. Ressalte-se que testes iniciais já haviam sido realizados no período de 01/06/2011 à 28/06/2011, a fim de otimizar tais parâmetros operacionais e verificar a possibilidade de monitoramento de biogás.

A primeira fase (Fase I), correspondente ao período de aclimação do lodo foi executada no período de 07/07/2011 a 15/08/2011. Nesta etapa, não foram adicionados os BTEX, ou seja, a única fonte de carbono e energia era o etanol, o qual apresentava uma DQO equivalente a 2.000 mg  $\text{O}_2$ /L.

Após a estabilização do reator, ou seja, quando o reator entrou na fase estacionária finalizando o período de aclimação, o efluente sintético contendo os BTEX, com concentração total de aproximadamente 30 mg/L (cada composto com teor de 5 mg/L), foram adicionados, iniciando a Fase II, que se desenvolveu no período de 16/08/2011 a 28/09/2011.

Adicionalmente, etanol era introduzido em concentração suficiente para manter a mesma DQO afluyente da fase I. Optou-se por utilizar essa concentração de BTEX devido os compostos se apresentarem tipicamente nessa faixa em efluentes industriais reais.

Tabela 7 – Duração das fases e parâmetros operacionais dos reatores metanogênico, desnitrificante e sulfetogênico

<b>Reator</b>	<b>Parâmetros operacionais</b>			
	<b>Fase</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
<b>Metanogênico (RM)</b>	Duração da fase (dias)	40	44	35
	Substrato (g DQO/L)	1,8	1,3	1,7
	Benzeno (mg/L)	-	3,7	3,7
	Tolueno (mg/L)	-	2,2	3,5
	Etilbenzeno (mg/L)	-	2,2	3,5
	m-, p-Xileno (mg/L)	-	4,5	7,0
	o-Xileno (mg/L)	-	2,3	3,7
<b>Desnitrificante (RN)</b>	<b>Fase</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
	Duração da fase (dias)	40	44	35
	Substrato (g DQO/L)	1,8	1,4	1,8
	Benzeno (mg/L)	-	2,0	3,8
	Tolueno (mg/L)	-	2,2	3,6
	Etilbenzeno (mg/L)	-	2,1	3,6
	m-, p-Xileno (mg/L)	-	4,4	7,2
	o-Xileno (mg/L)	-	2,2	3,8
Razão (DQO/Aceptor)	-	-	11	
<b>Sulfetogênico (RS)</b>	<b>Fase</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
	Duração da fase (dias)	40	44	35
	Substrato (g DQO/L)	1,3	1,5	1,9
	Benzeno (mg/L)	-	3,3	3,7
	Tolueno (mg/L)	-	2,1	3,6
	Etilbenzeno (mg/L)	-	2,1	3,7
	m-, p-Xileno (mg/L)	-	3,6	7,4
	o-Xileno (mg/L)	-	2,1	3,9
Razão (DQO/Aceptor)	-	-	11	

Fonte: a autora.

Nesta etapa de operação dos três reatores, ocorrendo sob condições metanogênicas, verificava-se a estabilidade do reator por meio da avaliação dos coeficientes de variação dos percentuais de remoção, principalmente de BTEX e de DQO, analisando-se os cinco últimos dados amostrados.

Após esta fase metanogênica, em que foi avaliada a capacidade de degradação dos BTEX nos reatores anaeróbios, iniciou-se a Fase III de estudo, que ocorreu entre os dias 29/09/2011 e 02/11/2011. Nesta fase, buscou-se investigar o efeito de dois aceptores de



elétrons,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , numa razão DQO/acceptor relativamente alta (aproximadamente 11), na eficiência de remoção daqueles compostos monoaromáticos, haja vista que a suplementação dos reatores com estes aceptores representa um custo adicional às unidades de tratamento. Para tanto, adicionaram-se aproximadamente 130 mg/L de íon nitrato e de íon sulfato aos afluentes dos reatores RN e RS, respectivamente.

Ressalte-se que, em virtude da elevada volatilidade dos BTEX, a concentração final verificada no afluente do reator permaneceu sempre abaixo do valor esperado de 30 mg/L, requerendo o monitoramento periódico das concentrações destes compostos nesta corrente dos reatores. Por conseguinte, durante todo o período considerado, todas as análises previstas para o acompanhamento da eficiência da remoção dos poluentes avaliados eram realizadas pelo menos 2 vezes (em geral, 3 vezes) por semana.

#### 4.4 Métodos analíticos

Os parâmetros avaliados nas amostras afluentes e efluentes dos reatores, durante o período de operação, bem como os métodos utilizados para avaliação desses parâmetros são apresentados de forma sintetizada no Quadro 4.

Os BTEX eram analisados nas mesmas condições cromatográficas descritas no teste de validação, seção 4.1.4, porém apenas os resultados detectados pelo PID foram utilizados para a determinação das concentrações dos hidrocarbonetos nos reatores, haja vista que foi comprovada a maior sensibilidade desse detector para os compostos em estudo. As amostras eram diluídas em água milli-Q numa razão de 1:10 e analisadas numa frequência de três vezes por semana.

As frações de nitrogênio, DQO e sulfato foram determinadas por espectrofotometria em espectrofotômetro *Thermo – Nicolet Evolution 100*. O pH foi medido em um phmetro da marca Digimed modelo DM 20. A determinação dos AGV's se deu de duas formas, de acordo com o método titulométrico de Kapp (RIBAS, MORAES, FORESTI, 2007) e por cromatografia gasosa (*GC 17 A Shimadzu*), equipado com detector de ionização de chama (FID), disponibilizado pelo Laboratório de Análises Traços da UFC, e separados em uma coluna Rtx-wax (Polietileno Glicol – PEG) com 30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme. Os ácidos graxos voláteis eram determinados e quantificados a partir de uma curva de calibração previamente realizada por diluições de um padrão de mistura de AGV (*Volatile Acid Standard Mix- Supelco*) contendo os ácidos: acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, capróico,

isocapróico e heptanóico. As condições cromatográficas utilizadas nas determinações dos AGV estão expostas na Tabela 8.

Quadro 4 – Parâmetros avaliados durante a operação dos reatores e os métodos analíticos usados

Parâmetro	Unidade	Método	Referência
Temperatura*	°C	2550 B	APHA (2005)
pH*	-	4500-H-B	APHA (2005)
BTEX	µg/L	GC-PID	Subseção 4.1.2
AGV – Fase I	mg/L	Kapp	Ribas, Moraes, Foresti (2007)
AGV – Fase II e III	mg <sub>HAc</sub> /L	Kapp / GC-FID	Ribas, Moraes, Foresti (2007) / Subseção 4.2
Alcalinidade (AT/AB)	mg <sub>CaCO<sub>3</sub></sub> /L	2320 B	APHA (2005)
DQO filtrada	mg <sub>O<sub>2</sub></sub> /L	5220 C	APHA (2005)
SST	mg/L	2540 D	APHA (2005)
SSV	mg/L	2540 E	APHA (2005)
SSF	mg/L	2540 E	APHA (2005)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg N/L	Salicilato / 8171	Rodier (1975) / HACH <sup>**</sup>
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg N/L	4500-N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> B	APHA (2005)
N-NH <sub>3</sub>	mg N/L	4500-N <sub>org</sub> C	APHA (2005)
NTK	mg/L	4500-N <sub>org</sub> C	APHA (2005)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	4500- SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> E	APHA (2005)
S <sup>2-</sup>	mg/L	4500- S <sup>2-</sup> F	APHA (2005)

Fonte: a autora.

Nota: \* os parâmetros temperatura e pH foram determinados pelo uso de uma sonda multiparamétrica.

\*\* No final da Fase III foi utilizado o método 8171 da HACH<sup>®</sup> utilizando o kit NITRAVER<sup>®</sup>.

Tabela 8 – Condições cromatográficas para a determinação de AGV por GC-FID

Parâmetros GC-FID	
Modo de injeção	<i>Split</i>
Razão split (mL)	10
Temperatura do injetor (°C)	200
Temperatura do detector (°C)	230
Gás de arraste	H <sub>2</sub>
Vazão de hidrogênio (mL/min.)	30
Vazão de ar sintético (mL/min.)	300
Fluxo na coluna (mL/min.)	0,7
Rampa de temperatura	t <sub>0</sub> : 100°C/ t <sub>x</sub> : 8°C/min/ t <sub>f</sub> :180°C.
Temperatura do detector (°C)	200
Tempo de corrida (min.)	10

Fonte: a autora.

t<sub>0</sub>: temperatura inicial; t<sub>x</sub>: taxa de aquecimento; t<sub>f</sub>: temperatura final.

#### 4.5 Tratamento estatístico dos dados de DQO e BTEX

Na avaliação da biodegradação anaeróbia da carga orgânica, por meio da DQO e dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX), em todas as fases do experimento, foram aplicados testes estatísticos para análise exploratória dos dados (avaliação de valores discrepantes<sup>1</sup>, testes de aderência à distribuição normal e teste de homogeneidade de variância), para comparação de médias e para análise de tendência de ordenação. Esses testes foram realizados se utilizando das rotinas estatísticas do programa computacional *SPSS 13.0 for Windows* (IBM, 2004).

A avaliação de dados discrepantes é fundamental em qualquer análise exploratória de dados, pois tais valores podem fornecer informações importantes ou afetar fortemente algumas estatísticas, como a média e o desvio padrão, como também podem distorcer a distribuição dos dados amostrais, comprometendo, assim, testes estatísticos que dependam destas características (TRIOLA, 2008). Neste contexto, a avaliação dos valores atípicos se baseou na diferença dos valores em relação ao intervalo interquartilico para cada conjunto de dados.

Assim, valores que superam o terceiro quartil em 150% do valor do intervalo interquartilico<sup>2</sup> (IIQ) do conjunto de dados ou que são inferiores ao primeiro quartil em 150% do IIQ foram considerados valores discrepantes extremos, enquanto que aqueles valores que superavam ou ficavam aquém do IIQ em 50%, a partir do terceiro ou primeiro quartil, respectivamente, também foram considerados dados discrepantes atípicos. Nos diagramas de caixa e bigodes aqui apresentados, os dados extremos são representados por asteriscos, conquanto que os dados atípicos são representados por círculos preenchidos.

Os testes de aderência usados para testar se a distribuição dos dados podia ser assumida igual à distribuição normal foram: o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e o teste de Shapiro-Wilk (S-W). Estes testes comparam os valores dos escores (variável) de uma amostra a uma distribuição normal de mesma média e variância dos valores amostrais. Assim, se o teste é não significativo ( $p \geq 0,05$ ) ele informa que os dados da amostra não diferem significativamente de uma distribuição normal, isto é, eles provavelmente se apresentam a forma desta distribuição. Caso contrário, a distribuição é significativamente distinta da distribuição normal (FIELD, 2009; REIMANN *et al.*, 2008; TRIOLA, 2008).

---

<sup>1</sup> Valores discrepantes ou *outliers* são valores considerados incomuns por estarem relativamente afastados da maioria dos demais dados.

<sup>2</sup> Intervalo interquartilico é a diferença entre o terceiro e o primeiro quartil do rol de dados, representado assim a amplitude dos 50% de valores centrais do conjunto de dados considerado.

O teste de Levene foi utilizado na análise da homogeneidade da variância de grupos de dados. Ele avalia a hipótese de que a diferença entre as variâncias dos grupos considerados é nula, ou seja, as variâncias são iguais. Dessa forma, se o teste de Levene é significativo, quando  $p \leq 0,05$ , pode-se concluir que as variâncias são significativamente diferentes, violando, assim, a suposição de variâncias homogêneas entre os grupos (FIELD, 2009; REIMANN *et al.*, 2008). Alguns testes estatísticos exigem que os dados sejam homogêneos em relação à variância dos fatores considerados (e.g., análise de variância).

Na avaliação da influência das características dos três reatores usados nos ensaios experimentais na remoção dos parâmetros monitorados, DQO e BTEX, nas diferentes fases do estudo, testes de comparação de médias foram aplicados aos grupos de dados. Neste contexto, foram utilizados dois testes de comparação de médias: a análise de variância (ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis (K-W).

O teste de análise de variância (ANOVA) é um teste paramétrico<sup>3</sup> utilizado para comparar médias de três ou mais conjuntos de dados amostrais. No seu desenvolvimento, a hipótese de que as médias de tais conjuntos não apresentam uma diferença significativa é avaliada. Consequentemente, caso a probabilidade (significância) de haver diferenças casuais nas médias seja relativamente pequena, diz-se que o teste é significativo, ou seja, há diferenças significativas nas médias comparadas (ROSS, 2004; FIELD, 2009; HELSEL, HIRSCH, 2002).

O teste de Kruskal-Wallis (K-W) também é um teste utilizado na comparação de médias de três ou mais conjuntos de dados amostrais, com a vantagem de ser menos restritivo ao tipo de distribuição e homogeneidade dos dados, por ser um teste não paramétrico<sup>4</sup>, (FIELD, 2009; HELSEL, HIRSCH, 2002; REIMANN *et al.*, 2008; TRIOLA, 2008). Ele se baseia na atribuição e ordenação de postos aos valores amostrais, os quais são operados por uma função característica que é comparada à distribuição qui-quadrado<sup>5</sup> (TRIOLA, 2008).

O teste de Jonckheere-Terpstra (J-T), que testa um padrão ordenado de medianas entre grupos independentes, foi utilizado na análise de tendência de ordenação. Essencialmente, ele testa a diferença entre a mediana dos grupos, similarmente ao teste de

---

<sup>3</sup> Teste paramétrico é um teste estatístico que considera uma distribuição característica, em geral a curva normal, e outras suposições sobre o conjunto de dados na determinação ou estimativa de uma estatística desejada. Em geral, são mais restritivos já que necessitam de um maior número de suposições atendidas.

<sup>4</sup> Teste não paramétrico é um procedimento estatístico que independe das hipóteses restritivas dos testes paramétricos. Especificamente, eles não presumem que os dados tenham distribuição normal.

<sup>5</sup> Distribuição qui-quadrado é uma distribuição de probabilidades contínua da soma dos quadrados de diversas variáveis normalmente distribuídas, usualmente selecionada para testar hipóteses sobre dados categóricos.

Kruskal-Wallis, incorporando, contudo, informações sobre a significância da ordem do grupo sobre tais diferenças (FIELD, 2009).

Complementarmente, o tamanho do efeito dos grupos ou fatores, uma medida objetiva e padronizada da magnitude de um efeito observado, foi determinado para a mais apurada interpretação dos resultados dos testes de comparação de médias e de ordenação das medianas. Destaque-se que esta estatística mensura a correlação dos fatores sobre os resultados dos testes supramencionados.

O tamanho do efeito para o teste ANOVA ( $\omega$ ) é determinado pela estatística expressa na Equação 7:

$$\omega = \sqrt{\frac{\sum n_k (\bar{x}_k - \bar{x}_{\text{geral}})^2 - (g_M/g_R) \cdot \sum s_k^2 (n_k - 1)}{\sum (x_i - \bar{x}_{\text{geral}})^2 + \sum s_k^2 (n_k - 1)/g_R}}, \quad (7)$$

Onde:  $n_k$  é o número de dados do grupo  $k$ ,  $\bar{x}_k$  é a média dos dados do grupo  $k$ ,  $s_k$  é o desvio padrão do grupo  $k$ ,  $x_i$  é o valor do  $i$ -ésimo valor observado no conjunto total (todos os grupos) de dados,  $\bar{x}_{\text{geral}}$  é a média de todos os valores no conjunto total de dados,  $g_M$  é o número de grupo subtraído da unidade, e  $g_R$  é o número de dados totais na amostra subtraído do número de grupos.

O tamanho do efeito para os resultados do teste K-W, dada a dificuldade em se converter uma estatística qui-quadrado em um tamanho de efeito, foi estimado para comparações específicas (comparação de pares de grupos) a partir do tamanho do efeito do teste de Mann-Whitney (FIELD, 2009).

Para o teste J-T, o tamanho do efeito  $r_o$  é determinado pela estatística expressa na Equação 8:

$$r_o = \frac{J_o}{\sqrt{N}}, \quad (8)$$

em que  $J_o$  é a estatística de J-T padronizada, fornecida por (IBM, 2004), e  $N$  é o número de valores no conjunto total de dados (todos os grupos).

Cohen (1988, 1992) *apud* Field (2009) sugere que tamanhos de efeito são: pequenos, quando a estatística correspondente é da ordem de 0,10; médio, quando é da ordem de 0,30; e grande, quando é superior a 0,50.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização e validação de metodologia analítica de determinação de BTEX

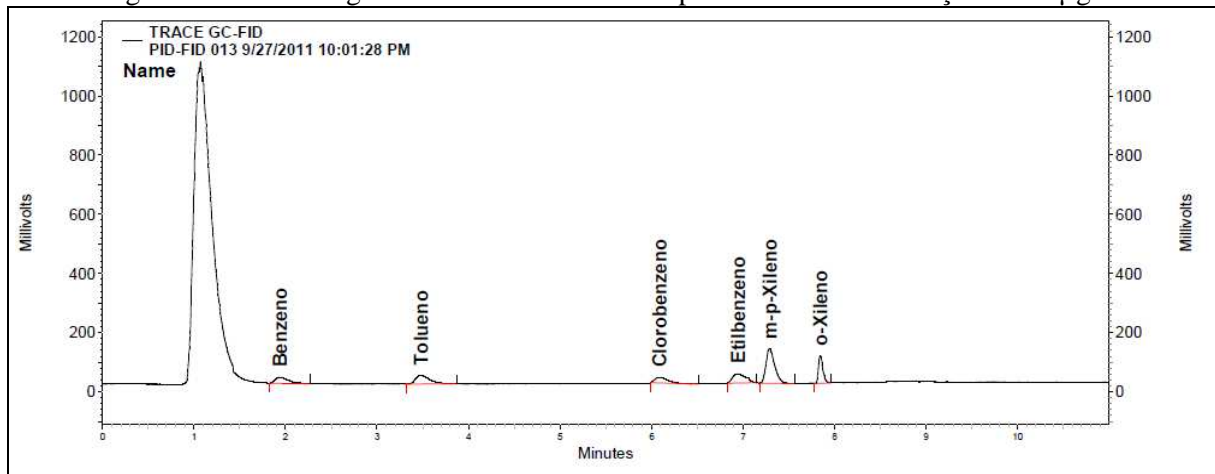
Vários parâmetros foram examinados, a fim de validar o método para a determinação simultânea dos BTEX e otimizar as condições de extração, fornecendo maior sensibilidade a determinação e quantificação desses compostos em matrizes aquosas.

Antes da realização dos experimentos com planejamento fatorial para definir as condições ótimas de extração, foram otimizadas as condições cromatográficas, tais como rampa de aquecimento, temperatura dos detectores e fluxo na coluna, visando à melhor resolução dos analitos no menor tempo, sem interferências de outros compostos presentes na matriz avaliada. Todavia, em nenhuma condição foi possível obter os isômeros m-p-xilenos separados no cromatograma. Logo, os mesmos foram identificados e quantificados de maneira conjunta.

Tanto a otimização, quanto a validação da metodologia analítica serão testadas apenas para o detector PID, pois este mostrou maior sensibilidade para determinação dos compostos em estudo, bem como maior resolução dos picos para a faixa de concentração estudada, corroborando com os resultados de Gobato e Lanças (2001).

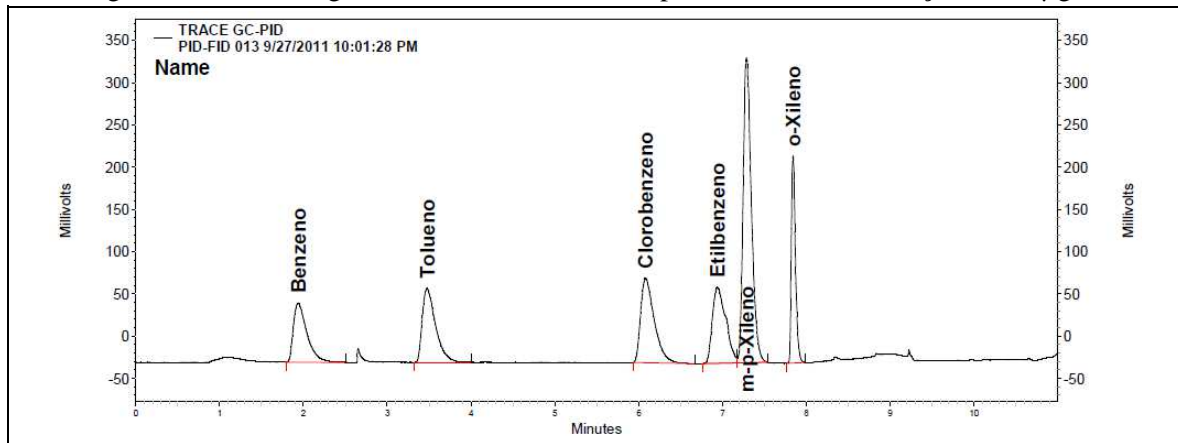
A Figura 13 e a Figura 14 apresentam os cromatogramas obtidos pelo detector FID e pelo PID, respectivamente, na concentração de 50 µg/L.

Figura 13 – Cromatograma dos BTEX detectado pelo FID na concentração de 50 µg/L.



Fonte: a autora.

Figura 14 – Cromatograma dos BTEX detectado pelo PID na concentração de 50 µg/L.



Fonte: a autora.

### 5.1.1 Otimização multivariada dos parâmetros de extração

A matriz dos experimentos e os vetores de resposta (áreas dos picos cromatográficos) obtidos pelo planejamento fatorial com 27 ensaios (quatro fatores em dois níveis) são apresentados na Tabela 9.

Com os resultados obtidos pelo *Statgraphic Centurion XV* foram gerados os diagramas de pareto para cada composto, com intervalo de confiança de 95%, os quais são mostrados nas figuras 15 a 19. De acordo com os resultados obtidos o efeito da salinidade não foi significativo para nenhum dos compostos avaliados, viabilizando o método de extração estudado para a análise desses compostos em diferentes matrizes aquosas. Adicionalmente esses gráficos revelaram que na extração por HS utilizando GC-PID, a influência do volume de amostra é bem superior aos demais fatores para todos os compostos analisados, apresentando um valor ótimo de 15 mL, para todos os compostos. Este foi o único fator que teve significância para a maioria dos compostos avaliados, com exceção do etilbenzeno e do o-Xileno, onde o tempo de incubação foi também bastante significativo, provavelmente devido ao maior ponto de ebulição desses compostos, necessitando, assim, de maior tempo para que as fases pudessem entrar em equilíbrio nas temperaturas avaliadas.

Para quase todos os compostos avaliados, com exceção dos mais voláteis, temperaturas mais elevadas favoreciam a extração, apresentando maiores repostas, confirmando os estudos realizados por Heleno *et al.* (2010), em que é apresentada a viabilidade de extração de BTEX em matrizes aquosas por HS analisando por GC-FID e foi observado que a temperatura ótima foi de 80°C.

Tabela 9 – Matriz para o planejamento fatorial ( $2^4$ ), com três pontos centrais e oito axiais, e as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para o método de extração dos BTEX por HS e análise por GC-PID

(continua)

Ensaio	Fatores				Áreas dos picos				
	Volume de amostra (mL)	Tempo de incubação (min)	Temperatura de incubação (°C)	Conc. de NaCl (g/L)	BZ	TO	EB	PX/MX	OX
1	7,5	20	80	0,5	9560940	14917514	9584482	24918756	10196045
2	10,0	15	70	0,0	11368465	18099434	13686869	34770090	13598735
3	12,5	10	80	0,5	11813550	28611168	17272850	43527560	16541806
4	10,0,	15	90	1,0	12752567	19955961	13911620	35302471	13884772
5	12,5	10	80	1,5	13750952	28845909	21802902	52614136	20148812
6	7,5	10	60	0,5	9515902	14202290	9756298	25090193	10053138
7	7,5	20	80	1,5	10679049	21577776	15072704	37364138	15210288
8	7,5	10	80	0,5	9156350	16225500	11949560	30270456	12368320
9	7,5	10	80	1,5	7351950	17813451	11609665	28864358	12065740
10	12,5	10	60	1,5	14730709	23548825	16768214	42783687	15548118
11	10,0	15	50	1,0	13910659	21461582	15567366	38910840	14508484
12	10,0	15	70	1,0	7984232	15149427	13200840	41212615	15665473
13	12,5	20	80	1,5	15273197	31453476	23266873	58534880	22675860
14	12,5	20	60	0,5	14525401	22673374	16502936	41904575	15232675
15	12,5	20	80	0,5	15162855	27973203	23667155	63819514	24532814
16	5,0	15	70	1,0	11978666	17159333	12347403	33126660	14112739
17	7,5	20	60	1,5	9761118	15891515	10686119	27736986	11091348
18	10,0	15	70	2,0	6691469	11255341	7962950	20925457	8215908
19	12,5	10	60	0,5	15035569	23169488	17973797	44944768	16427843
20	10,0	25	70	1,0	17295426	26964950	19357876	48954646	19251227



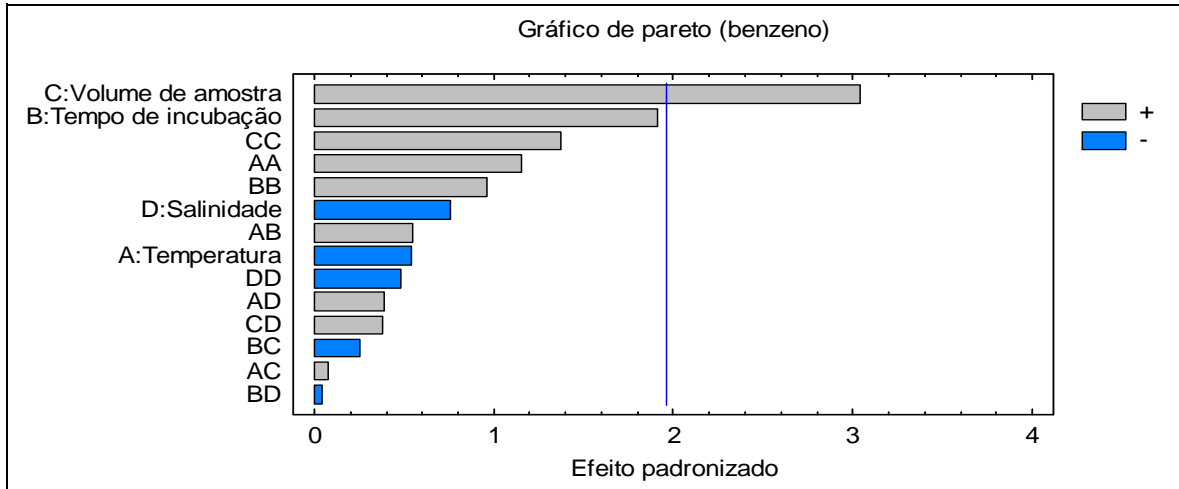
Tabela 9 – Matriz para o planejamento fatorial ( $2^4$ ), com três pontos centrais e oito axiais, e as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos para o método de extração dos BTEX por HS e análise por GC-PID

(conclusão)

Ensaio	Fatores				Áreas dos picos				
	Volume de amostra (mL)	Tempo de incubação (min)	Temperatura de incubação (°C)	Conc. de NaCl (g/L)	BZ	TO	EB	PX/MX	OX
21	12,5	20	60	1,5	14101799	24066233	18655348	45165624	16202746
22	7,5	10	60	1,5	8951828	14995032	10437969	26290066	10545432
23	7,5	20	60	0,5	11815267	16736634	12479467	30642178	11791549
24	10	15	70	1,0	8683243	15214875	9715544	25810478	10581895
25	10	5	70	1,0	8358908	14230846	9679289	24432899	9769967
26	10	15	70	1,0	13566878	21547160	15678986	41166885	16198341
27	15	15	70	1,0	15847059	27164946	18874354	47802491	18664279

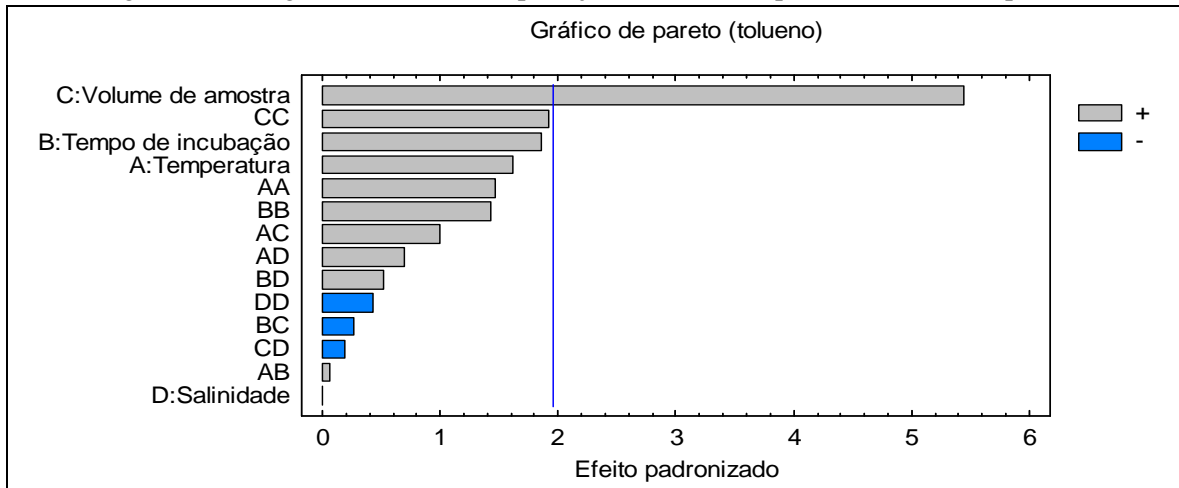
Fonte: a autora.

Figura 15 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o BZ extraído por HS



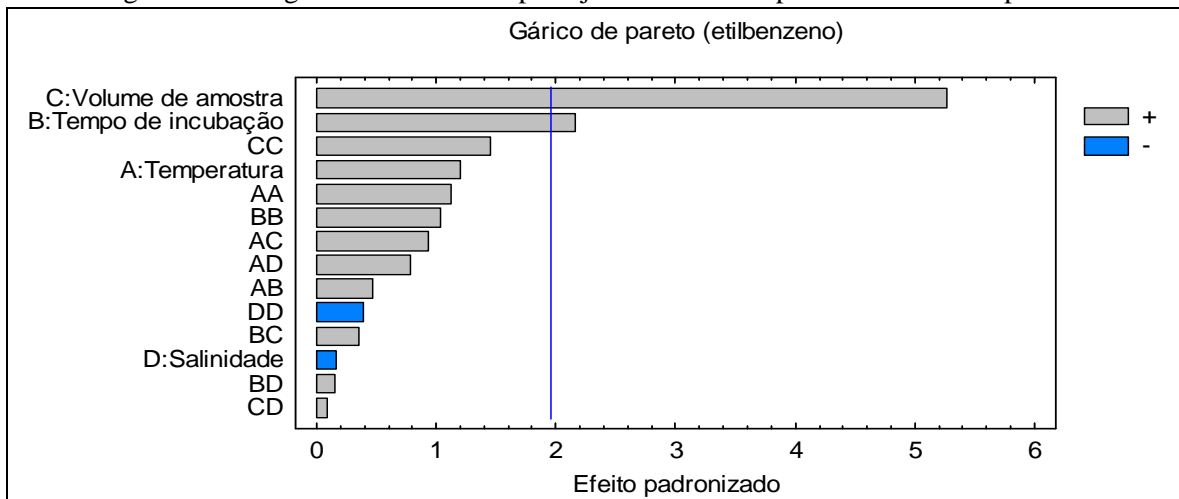
Fonte: a autora.

Figura 16 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o TO extraído por HS



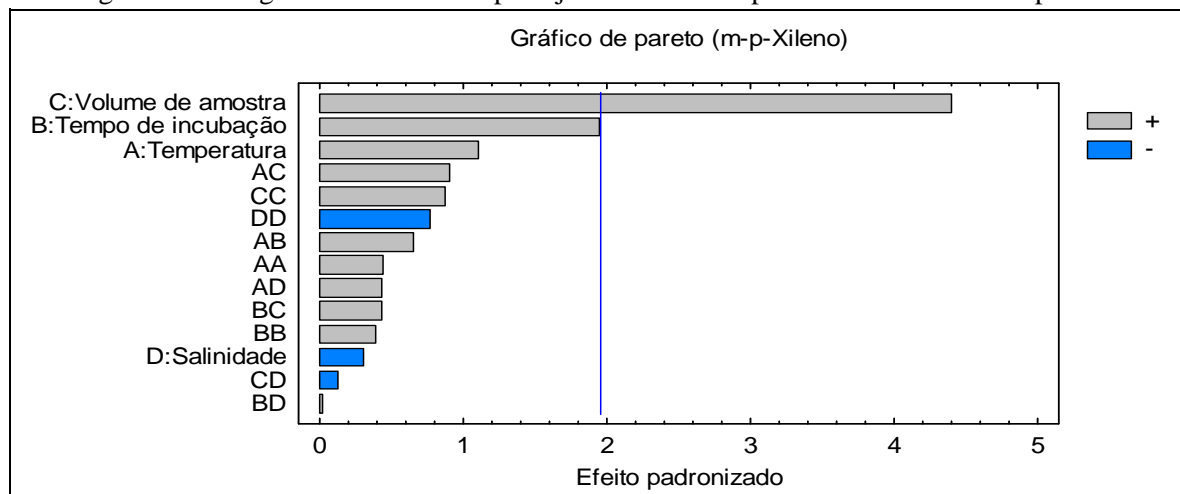
Fonte: a autora.

Figura 17 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o EB extraído por HS



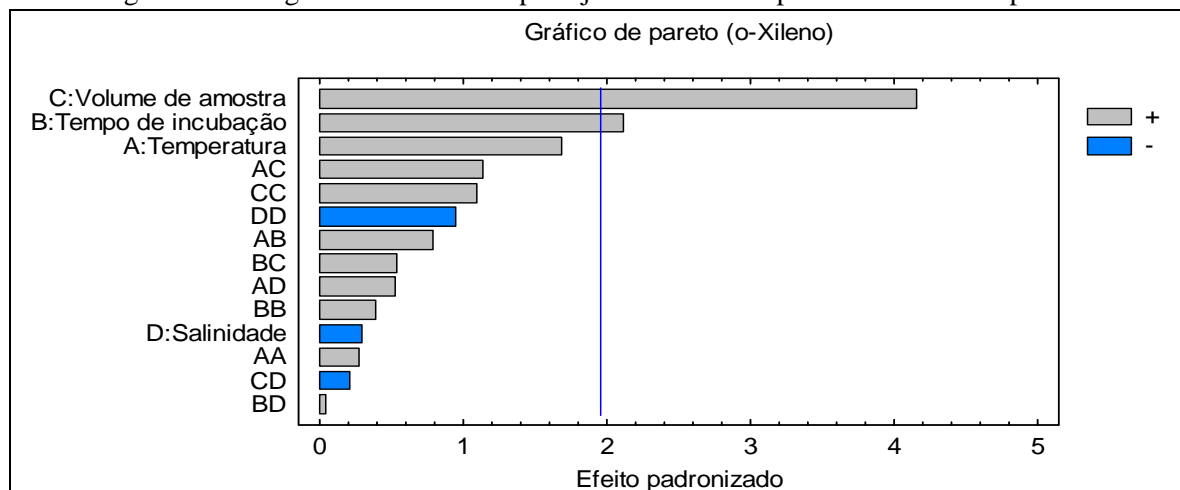
Fonte: a autora.

Figura 18 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o PX/MX extraído por HS



Fonte: a autora.

Figura 19 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial para o OX extraído por HS



Fonte: a autora.

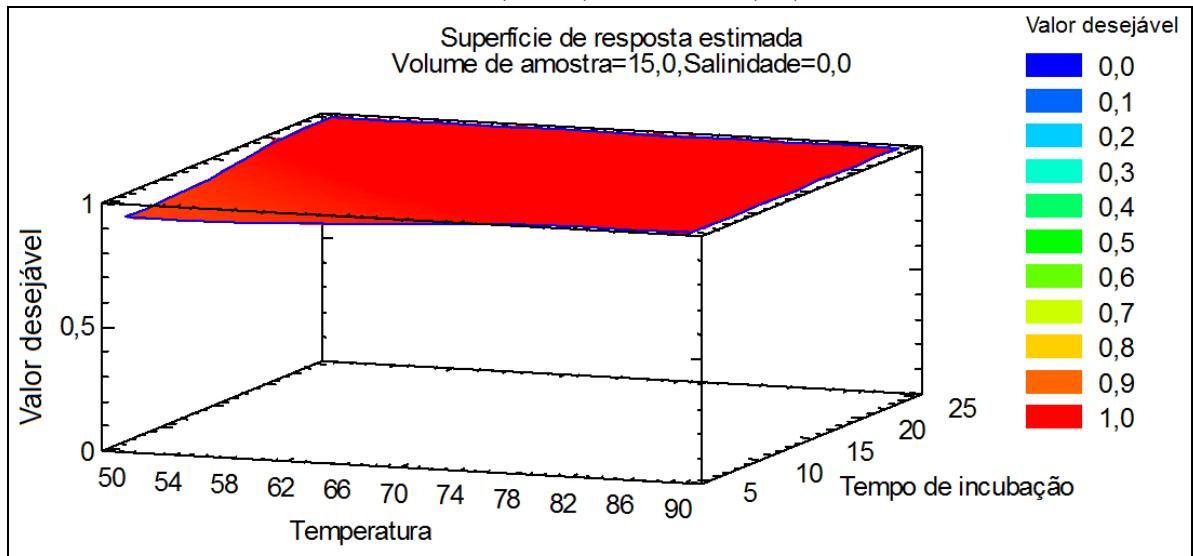
Segundo Slater *et al.* (1999) a temperatura do forno é um parâmetro importante à sensibilidade dos compostos voláteis, pois seu aumento reduz a solubilidade desses compostos, favorecendo a passagem do analito para a fase gasosa. No entanto, temperaturas mais elevadas favorecem a formação de vapores de água no *headspace* da amostra, podendo haver uma significativa redução dos analitos de interesse. Além disso, existe a possibilidade de quebra da seringa no momento de amostragem, devido ao aumento da pressão dentro do frasco (*vial*) por consequência da alta pressão (MENÉNDEZ *et al.*, 2000; SERRANO, GALEGO, 2004). Por isso, optou-se por manter a temperatura do forno a 70°C.

Fazendo a otimização multivariada dos dados, ou seja, a otimização dos dados visando encontrar os fatores ótimos para o grupo de compostos estudados, observou-se que, novamente, o volume de amostra apresentou maior influência sobre a resposta. Como a salinidade não teve influência significativa para obtenção dos gráficos de superfície de

resposta, optou-se por manter constante o volume de amostra (15 mL), mais significativo e salinidade (0,0), menos significativo.

Os resultados apresentados na Figura 20 revelam que para qualquer que sejam as condições testadas de temperatura e tempo de incubação, a resposta será sempre a mesma. Por isso, optou-se por utilizar um tempo médio de extração de 15 min., haja vista que para a otimização individual esse foi o tempo ótimo para a maioria dos compostos. Além de também minimizar o tempo de análise e utilizar temperaturas mais baixas, 70°C, pelos motivos já expostos anteriormente.

Figura 20 – Superfície de resposta para a mistura de BTEX com valores fixados de volume de amostra (15 mL) e salinidade (0,0)



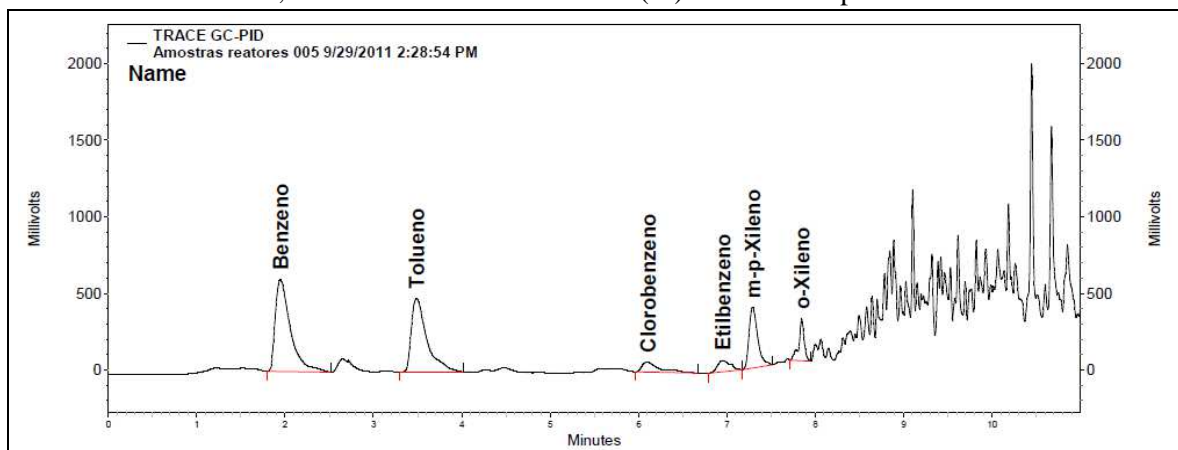
Fonte: a autora.

### 5.1.2 Validação do método analítico

A fim de garantir que o método analítico utilizado forneça informações confiáveis sobre as amostras em estudo, este foi submetido à validação, onde foram determinados seus limites de detecção e quantificação, a linearidade, a seletividade, a precisão e a exatidão.

O método desenvolvido foi bastante seletivo, haja vista que os cromatogramas obtidos a partir da análise da amostra da LUBNOR apresentaram somente os analitos eluídos nos seus tempos de retenção, conforme ilustrado pelo cromatograma da Figura 21.

Figura 21 – Cromatograma dos BTEX presentes na amostra coletada da torre de resfriamento da LUBNOR, adicionadas de clorobenzeno (PI) e analisadas por HS-CG-PID



Fonte: a autora.

As curvas analíticas contendo os BTEX foram obtidas por meio da relação entre faixa de concentração estudada, 0,5 a 1.000  $\mu\text{g/L}$ , e as áreas dos picos obtidas para cada um dos dez pontos presentes na curva de calibração. Para todos os compostos o coeficiente de correlação ( $r$ ) se manteve acima de 0,999, mostrando que o método apresenta boa linearidade. Os dados obtidos para a validação do método estão descritos na Tabela 10.

A partir da Tabela 10 também pode ser verificado que a repetibilidade do método variou entre 0,05% e 0,26% para o tempo de retenção (análise qualitativa) e 1,46% a 3,76% para a área do pico (análise quantitativa), demonstrando uma precisão satisfatória, haja vista que nenhum dos analitos apresentou DPR acima de 5%, valor que não deve ser ultrapassado para este teste, de acordo com BRASIL (2003). Os dados de repetibilidade obtidos neste estudo superam àqueles obtidos por Cavalcanti *et al.* (2010), utilizando o mesmo equipamento e a mesma tecnologia de extração.

Tabela 10 – Parâmetros analíticos avaliados para a validação do método analítico (HS-GC-PID) de determinação de BTEX

Analitos	Linearidade			LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Repetibilidade <sup>a</sup>		Exatidão
	Eq. da reta	Faixa da curva (µg/L)	Coefficiente de correlação (r)			t <sub>r</sub>	Área do pico	Recuperação (%) <sup>b</sup>
BZ	y= 0,0061x + 0,0301	0,5-1000	0,9997	0,43	1,44	0,26	3,76	69
TO	y= 0,0114x + 0,0136	0,5-1000	0,9999	0,48	1,61	0,20	3,17	44
EB	y= 0,0113x + 0,0214	0,5-1000	0,9999	0,13	0,43	0,19	1,69	45
PX/MX	y= 0,013x + 0,0567	0,5-1000	0,9999	0,41	1,37	0,09	1,46	87
OX	y= 0,0098 + 0,0268	0,5-1000	0,9999	0,20	0,66	0,05	1,46	68

Fonte: a autora.

Nota: <sup>a</sup> Desvio padrão relativo (DPR) dos tempos de retenção e as áreas dos picos dos analitos obtidos a partir da análise de 10 replicatas de 100 µg/L de BTEX;

<sup>b</sup> Os testes de recuperação foram realizados com a de 33 µg/L de BTEX.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para todos os compostos determinados por essa metodologia foram inferiores aos encontrados por outros autores (AEPPLI *et al.*, 2008; ES'HAGHI, EBRAHIMI, HOSSEINI, 2011; KUBINEC *et al.*, 2005; PÉREZ-PAVÓN *et al.*, 2007), mesmo utilizando a mesma técnica de extração avaliada nesse trabalho (CAVALCANTI *et al.*, 2010; HELENO *et al.* 2010; MENÉNDEZ *et al.*, 2000). Este fato, em alguns casos, pode ser atribuído à maior sensibilidade do detector PID, utilizado nessa pesquisa, comparado aos demais detectores utilizados para determinação dos BTEX.

Os valores de LD e LQ, que foram alcançados a partir da análise de dez replicatas da menor concentração de BTEX da curva de calibração, variaram entre 0,13 µg/L e 0,43 µg/L e entre 0,43 µg/L e 1,61 µg/L, respectivamente, apresentando valores mais baixos que as concentrações máximas estabelecidas na Portaria MS nº 518/2004 (BRASIL, 2004) e na Resolução CONAMA nº 430/2011 (BRASIL, 2011) para esses poluentes em águas destinadas ao abastecimento público e ao lançamento de efluentes, respectivamente. Portanto, demonstra-se a viabilidade da extração por *headspace* e a determinação por cromatografia gasosa com detector por fotoionização (HS-GC-PID) para a determinação e monitoramento dos BTEX em matrizes aquosas.

A amostra real utilizada na determinação da exatidão do método apresentou as seguintes concentrações de BTEX: 4,07 mg/L (BZ), 2,8 mg/L (TO), 0,5 mg/L (EB), 1,4 mg/L (PX/MX) e 0,9 mg/L (OX).

As recuperações conseguidas com o método de extração por HS e detecção por GC-PID através da análise de três replicatas dessa amostra, diluídas de 1:10 e fortificadas com 33 µg/L de BTEX, mostraram resultados satisfatórios para o benzeno e xilenos. Assim, foram confirmados os resultados de exatidão apontados na literatura para tais compostos (AEPPLI *et al.*, 2008; ES'HAGHI, EBRAHIMI, HOSSEINI, 2011; GOLFINOPOULOS *et al.*, 2001; HELENO *et al.*, 2010; RIDGWAY, LALLJIE, SMITH, 2007), portanto se configurando como uma técnica exata para a maioria dos compostos avaliados.

Segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1998), o valor aceitável de recuperação vai depender do percentual de analito que foi adicionado em relação à amostra como um todo, relação m/v de analito, que para a faixa de concentração adicionada à amostra em estudo, 33 µg/L, o percentual massa por volume será de  $3,3 \times 10^{-6}$ , o que resulta numa faixa de recuperação aceitável de 60 a 115%, conforme exposto no Quadro 5.

Já para o tolueno e o etilbenzeno, os valores de recuperação permaneceram bem abaixo dos valores estabelecidos pela AOAC, recomendando que sejam realizadas mais

ensaios com diferentes concentrações, a fim de observar se o resultado se mantém constante. Segundo BRASIL (2003), se o método obtiver boa precisão, pode ser aceitável baixas recuperações.

Quadro 5 – Recuperação do analito em diferentes concentrações.

<b>Percentual de analito (m/v)</b>	<b>Razão de analito</b>	<b>Unidade</b>	<b>Faixa de recuperação (%)</b>
100	1	100%	98-102
≥ 10	10 <sup>-1</sup>	10%	98-102
≥ 1	10 <sup>-2</sup>	1%	97-103
≥ 0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	95-105
≥ 0,01	10 <sup>-4</sup>	100 mg/L	90-107
≥ 0,001	10 <sup>-5</sup>	10 mg/L	80-110
≥ 0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 mg/L	80-110
≥ 0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 µg/L	80-110
≥ 0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 µg/L	60-115
≥ 0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 µg/L	40-120

Fonte: adaptado de AOAC (1998) e Huber (2007).

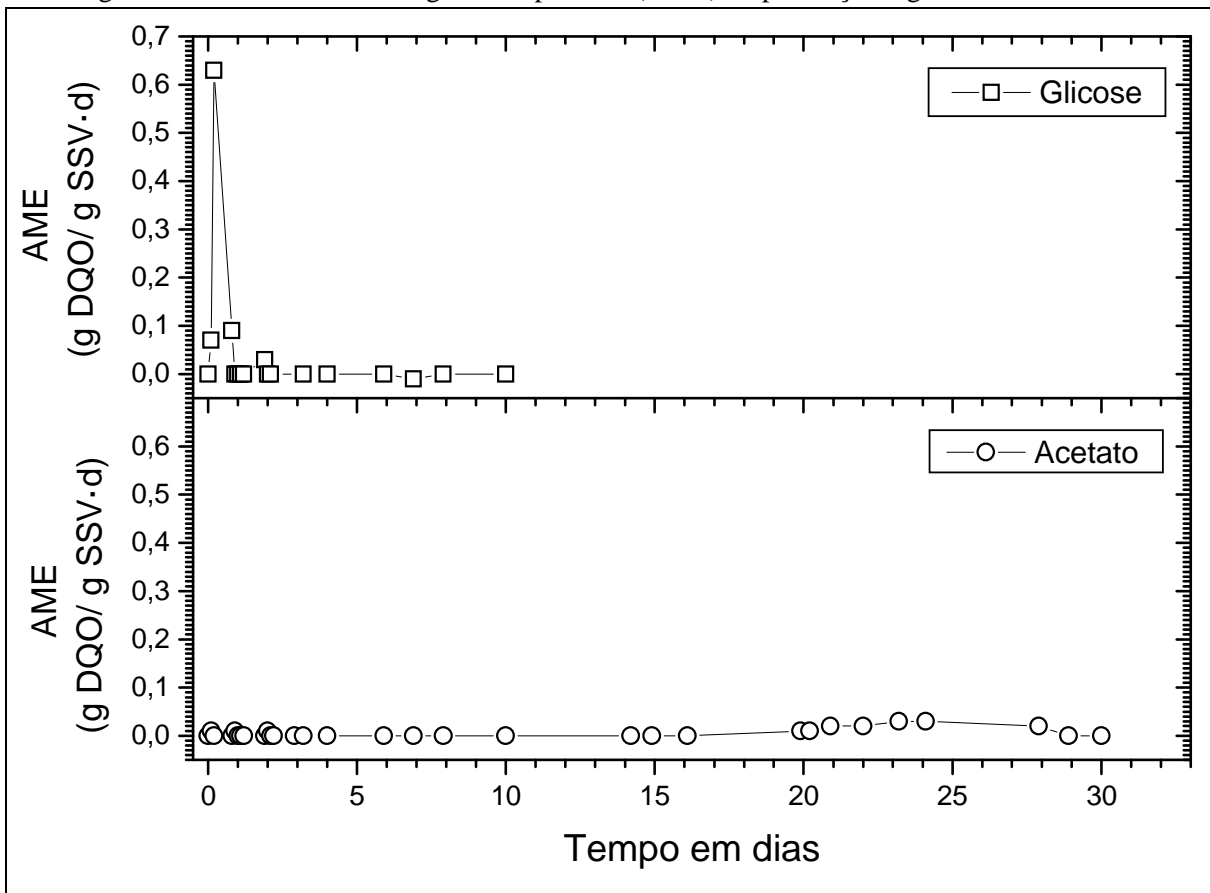


## 5.2 Avaliação do teste de AME do lodo utilizado nos experimentos contínuos

O principal objetivo deste teste foi obter uma estimativa da carga máxima que poderá ser aplicada ao lodo em estudo, a fim de facilitar a partida dos reatores contínuos e evitar sua sobrecarga.

Os valores de AME obtidos a partir dos ensaios em batelada podem ser visualizados na Figura 22, onde todos os valores apresentados são relativos apenas à conversão dos substratos avaliados a  $\text{CH}_4$ , pois já foram descontados os valores referentes à atividade endógena do lodo, avaliada a partir do ensaio controle. Na Figura 22 são apresentados apenas os valores de AME correspondentes à glicose e ao acetato, haja vista que utilizando a mistura de AGV's o lodo não apresentou nenhuma atividade durante todo o ensaio.

Figura 22 – Atividade metanogênica específica (AME) na presença de glicose e de acetato.



Fonte: a autora.

Os resultados de AME obtidos demonstraram que o lodo oriundo de um sistema de tratamento de esgotos de uma cervejaria, objeto deste estudo, apresenta altos valores de atividade metabólica, sendo necessárias apenas algumas horas para alcançar sua atividade metanogênica máxima, utilizando a glicose como substrato, com valor médio de AME de 0,63 g DQO/g SSV.d em apenas quatro horas de incubação. Os valores de AME encontrados nesta pesquisa foram superiores aos encontrados por Souto *et al.* (2010), que, ao realizar um teste de AME utilizando a glicose como substrato, com uma relação A/M de 0,2, obteve uma AME de aproximadamente 0,11 g DQO/g SSV. d.

Este elevado potencial do lodo para converter a glicose em CH<sub>4</sub> pode ser atribuído à adaptação do mesmo a sacarídeos, haja vista que estes compostos são abundantes em efluentes oriundos de indústrias cervejeiras.

Para os demais substratos, acetato e mistura de AGV, os resultados de AME não foram satisfatórios. Quando se utilizou a mistura de AGV, durante o período de 30 dias, não se observou nenhuma atividade no lodo, o que, de acordo com Gorris *et al.* (1989) *apud* Monteggia *et al.* (1999), pode ser atribuído à inibição da biomassa pela mistura de ácidos, pois dependendo de suas concentrações no meio, o acetato pode retardar a degradação do propionato e este pode se tornar grande inibidor das arqueas metanogênicas.

A atividade metanogênica utilizando acetato foi inibida durante os primeiros 20 dias de incubação, o que pode ser confirmado pelo percentual de metano observado nos frascos nesse período, apenas 32,1% e pelo baixo valor de AME (0,05 g DQO-CH<sub>4</sub>/ g SSV. d) durante o experimento.

Quando se conhecem os valores da atividade do lodo e se sabe a concentração de biomassa no experimento, pode-se ter uma estimativa da quantidade máxima de DQO por unidade de tempo que um lodo anaeróbico é capaz de degradar (NIETO, 2006). Portanto, a carga máxima que pode ser aplicada ao lodo em estudo foi determinada utilizando o valor de AME obtido com a glicose, o qual apresentou uma carga de aproximadamente 3 g DQO/L.d, dado importante para a partida (*start-up*) dos reatores anaeróbios utilizados neste estudo.

### 5.3 Ensaaios de remoção dos BTEX em reatores anaeróbios

#### 5.3.1 Testes iniciais

O lodo anaeróbio utilizado foi inoculado nestes reatores, no qual não foi observada uma fase longa de adaptação, mostrando-se bastante ativo e adaptado, além de eficiente na remoção de matéria orgânica, com eficiência de remoção de DQO de 83% a 97% nos sistemas reacionais.

Apesar de os resultados preliminares indicarem que o reator, nesta configuração geométrica, estava operando com elevadas remoções de matéria orgânica e com as condições operacionais bastante estáveis (i.e. pH, alcalinidade e sólidos), a pressurização observada nos sistemas de medição do biogás gerado não estava satisfatória, comprometendo a mensuração dos volumes gasosos produzido nos reatores.

Ainda, foi também observado que os percentuais de metano e de CO<sub>2</sub> determinados para o biogás produzido estavam abaixo dos valores esperados. Para tanto, considerando que a mangueira usada na coleta do biogás era permeável, e um possível ponto de perda de gás, como também que os BTEX utilizados poderiam interagir com as demais mangueiras, todas estas foram trocadas por mangueiras de *Tygon*, as quais são não permeáveis e inertes àqueles compostos monoaromáticos. Após a troca das mangueiras, os valores dos gases mencionados estabilizaram e mantiveram-se na faixa de esperada da composição do biogás.

Todos estes ajustes e testes iniciais foram realizados num período de 37 dias (01/06/2011 a 07/07/2011).

Os lodos anaeróbios foram transferidos para os novos reatores, primeiramente para o reator metanogênico, e, posteriormente, para os reatores desnitrificante e sulfetogênico, num intervalo de alguns dias, dando início a fase de aclimação do lodo. Verificou-se que esta modificação corrigiu o problema da pressurização, mantendo ainda elevada a remoção de DQO do sistema.

#### 5.3.2 Desempenho dos sistemas na fase de aclimação

Após a transposição dos lodos, os parâmetros descritos na seção 4.4 foram periodicamente monitorados nesta nova e definitiva fase de aclimação. Os valores médios e os desvios padrão para as variáveis que caracterizam o desempenho dos reatores anaeróbios avaliados durante esta fase de aclimação (Fase I) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros operacionais dos reatores durante a etapa de aclimação

Reator	DQO <sub>a</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	Remoção de DQO (%)	pH <sub>e</sub>	AB <sub>e</sub> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	AGV <sub>e</sub> (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	AGV <sub>e</sub> /AT <sub>e</sub>
RM	1833 ± 103	96,1 ± 1,4	6,9 – 7,1	1478 ± 108	147,1 ± 53	0,10 ± 0,04
RN	1833 ± 103	94,4 ± 1,9	6,9 – 7,1	1439 ± 91	143,4 ± 50	0,08 ± 0,03
RS	1833 ± 103	95,8 ± 1,7	6,9 – 7,2	1554 ± 121	135,3 ± 52	0,09 ± 0,02

Fonte: a autora

Notas: DQO, demanda química de oxigênio; AB, alcalinidade a bicarbonato; AT, alcalinidade total; AGV, ácidos graxos voláteis;

os subscritos *a* e *e* significam, respectivamente, afluente e efluente.

Os reatores apresentaram boa estabilidade praticamente durante todo esse período, com remoções médias de DQO variando de 94% a 96% que, nessa fase, operavam sob condições metanogênicas, utilizando apenas o etanol como fonte de carbono e energia.

De acordo com Behling *et al.* (1997), um bom indicador da estabilidade operacional em reatores anaeróbios é a relação AGV/AT, cujo valor ideal deve ser inferior a 0,4. Todos os reatores apresentaram valores para tal razão abaixo de 0,4, o que indica que havia alcalinidade suficiente nos sistemas para neutralizar os ácidos formados, inclusive os AGV não consumidos pelas arqueas metanogênicas, tamponando o meio, e evitando, assim, a acidificação (azedamento) do reator, o que comprometeria seu desempenho.

O pH do efluente aos reatores corroboram tal observação, haja vista que se mantiveram praticamente constantes e próximos do valor neutro, dentro da faixa de 6,7 a 7,4, recomendada para sistemas anaeróbios (CHERNICHARO, 2007), indicando, assim, um metabolismo ativo dos microrganismos metanogênicos (SOMASIRI *et al.*, 2008).

O bom funcionamento dos reatores também pode ser observado pela alta concentração de metano no meio, observado na caracterização do biogás, com valores superiores a 70% para os três reatores, indicando também o satisfatório metabolismo da comunidade microbiana no processo.

### 5.3.3 Avaliação da produção e características do biogás produzido

As vazões molares de metano (CH<sub>4</sub>) na fase de aclimação dos reatores variaram entre 38,5 ± 17 mmol/d, 29,6 ± 9,1 mmol/d e 25,1 ± 4,8 mmol/d, para os reatores RM, RN e RS, respectivamente, com percentual de metano nos sistemas de aproximadamente 70%, como pode ser observado na Tabela 12. A partir da Figura 23 pode se observar que não houve muita variação com relação à quantidade de metano produzido, demonstrando que os sistemas mantinham consórcios metanogênicos com boa atividade metabólica. Na medida em que iam

sendo otimizadas as condições para a identificação e quantificação do biogás, conforme já mencionado na seção 5.3.1, os percentuais de metano bem como sua vazão molar também aumentavam gradativamente (Figura 23), chegando a manter o percentual de metano numa média de 83% nos três reatores, nas fases em que houve o incremento das concentrações de BTEX, ou seja, Fases II e III.

Tabela 12 – Percentual de metano, gás carbônico, gás sulfídrico e amônia presentes no biogás.

Variáveis	Fase I			Fase II			Fase III		
	RM	RN	RS	RM	RN	RS	RM	RN	RS
%Ar	7 ± 5	19 ± 8	24 ± 8	4 ± 0	6 ± 0	4 ± 0	4 ± 1	6 ± 2	5 ± 2
%CH <sub>4</sub>	77 ± 7	73 ± 5	69 ± 8	83 ± 2	82 ± 3	83 ± 2	83 ± 1	84 ± 4	82 ± 4
% CO <sub>2</sub>	10 ± 4	7 ± 4	6 ± 2	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 0	11 ± 2	11 ± 2
% H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,6
% NH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1

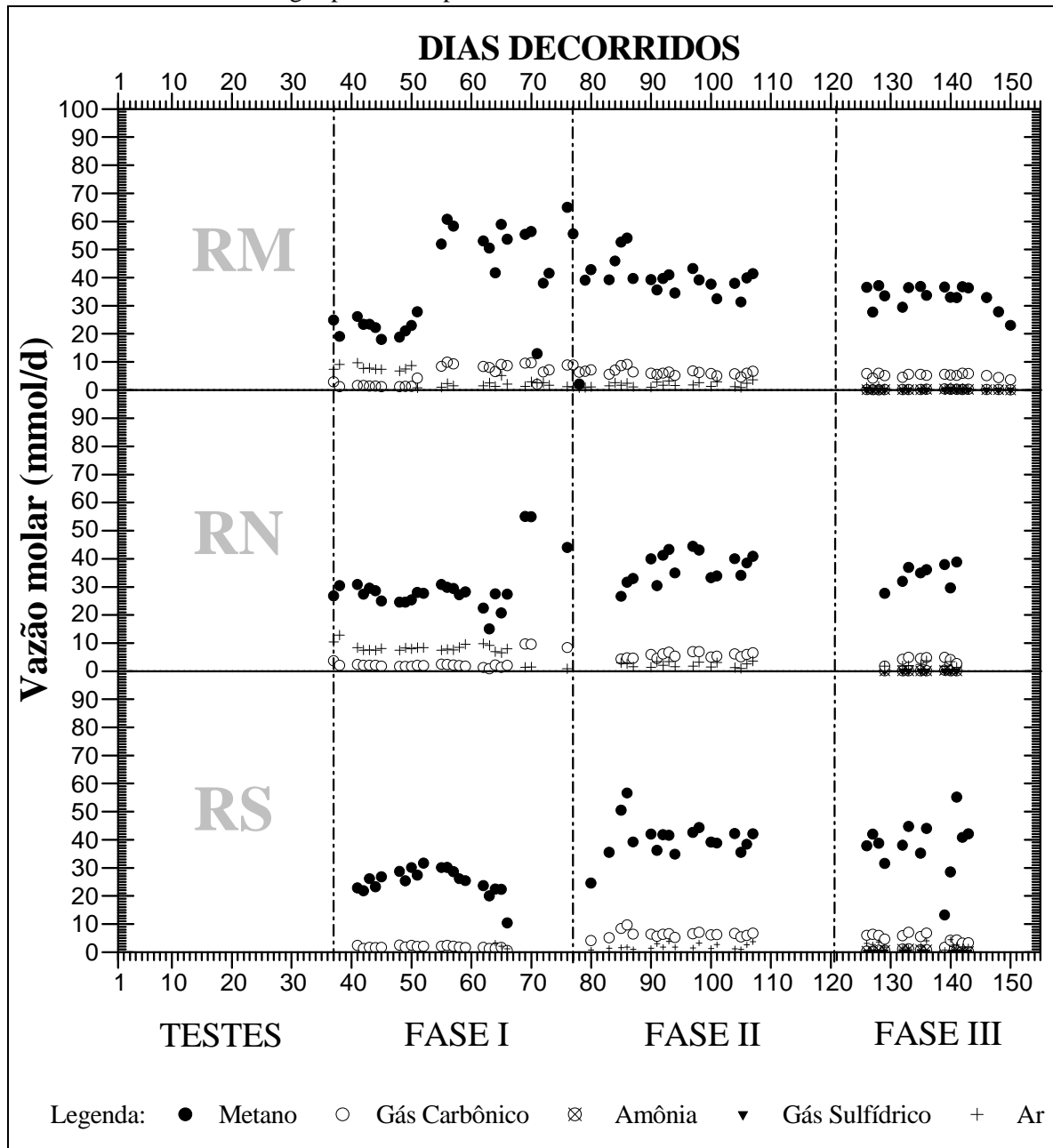
Fonte: a autora.

Nota: % - média percentual v/v dos compostos listados presentes no biogás; os valores de desvio padrão, que se encontram ao lado de cada média, foram arredondados para 0 quando este era abaixo de 0,05.

Com relação ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), foram obtidas baixas vazões molares (Figura 23) principalmente na primeira fase dos experimentos, com valores de 5,4 ± 3,0 mmol/d, 2,8 ± 2,0 mmol/d, 1,8 ± 0,4 mmol/d, para os reatores RM, RN e RS, respectivamente. Tais valores poderiam estar sendo subestimados devido aos problemas de medição do biogás e também pelo menor período de operação dos reatores no qual o consórcio ainda estava em fase de adaptação. Nas fases seguintes, tanto as vazões, como os percentuais de dióxido de carbono aumentaram gradativamente, apresentando um percentual médio de 13% de CO<sub>2</sub> em todos os sistemas avaliados para essa fase (Tabela 12). No entanto, o percentual deste gás manteve-se baixo, como esperado para os tipos de sistemas avaliados, em que a degradação da matéria orgânica tende a gerar como metabólitos um percentual maior de metano.

Já com relação à quantidade de ar presente no meio (Tabela 12), observa-se que na medida em que foram otimizadas as condições de análise do biogás, conforme já mencionado na seção 5.3.1, os percentuais de ar foram reduzidos, variando entre 2% a 32% na Fase I e para as demais fases entre 3% e 8%, se apresentado bastante estável. Tal fato contribui para a manutenção anaeróbia do meio e reduzindo também o desprendimento de lodo e posterior aumento dos sólidos no efluente.

Figura 23 – Variação das vazões molares de metano, dióxido de carbono, amônia e gás sulfídrico no biogás produzido pelos reatores desde o início da Fase I



Fonte: a autora.

A amônia presente no biogás (Tabela 12) foi monitorada nos três sistemas anaeróbios apenas na fase III, como ilustra a Figura 23, se mantendo em vazões próximas a zero, entre 0,15 mmol/d e 0,58 mmol/d, e percentuais muito pequenos, entre 0,1% e 0,3%, mesmo naquele reator onde estava havendo a redução do  $\text{NO}_3^-$ . Tal fato pode ser explicado pelos valores de pH sempre próximos à neutralidade durante todo o período experimental, o que desfavorece a formação de amônia na forma gasosa, bem como porque o nitrato presente no meio estava sendo convertido em nitrito ou nitrogênio gasoso, não ocorrendo, assim, a sua

redução dissimilativa (nitrato  $\rightarrow$  amônia). Tal observação pode ser corroborada também pelo não incremento das concentrações de amônia no efluente, onde quase toda a amônia afluente (em média 111 mg/L) saía do sistema junto ao efluente (em média 109 mg/L).

Comportamento semelhante foi observado para o sulfeto de hidrogênio, também relativo à fase III, o qual apresentou também baixo percentual na composição do biogás dos três sistemas em estudo, variando entre 0,2% e 1,6% (Tabela 12). Mesmo o biorreator operado com uma relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>=</sup> de 11, onde estava havendo a redução do SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, a vazão de sulfeto era, em média, 0,03  $\pm$  0,02 mmol/d (Figura 23). Uma possível explicação para os baixos valores de sulfeto no biogás é o valor de pH próximo à neutralidade, que não favorece a presença de sulfeto na forma de H<sub>2</sub>S, a qual se dá em baixos valores de pH.

Portanto, por meio dos resultados observados na composição do biogás dos três biorreatores avaliados, pode-se concluir que os sistemas apresentaram predominância das comunidades metanogênicas, mesmo àqueles biorreatores em que foram adicionados os aceptores, indicando que a quantidade destes constituintes no tempo de operação dos reatores não foi suficiente para promover de maneira significativa o desenvolvimento de microrganismos desnitrificantes e sulfatorredutores. No entanto, deve ser realizada uma caracterização da comunidade microbiana presente nos sistemas, a fim de justificar melhor tais dados observados.

#### 5.3.4 Remoção de DQO nos reatores anaeróbios

Desde os testes preliminares até a fase de remoção dos BTEX na presença de aceptores de elétrons, monitorou-se a DQO afluente e efluente dos reatores, bem como a eficiência de sua remoção do sistema. Na Tabela 13 são apresentados os valores médios e na Figura 24 pode-se observar a variação das componentes ao longo do tempo.

Tabela 13 – Concentrações afluentes e efluentes médias e eficiências de remoção de DQO nos três reatores anaeróbios durante as três fases de operação.

Fases de operação		Concentração média DQO (mg O <sub>2</sub> /L)		Eficiência de remoção (%)
		Afluente	Efluente	
RM	I	1817 ± 190	72 ± 24	96 ± 1,3
	II	1307 ± 75	115 ± 87	91 ± 6,0
	III	1747 ± 109	109 ± 35	94 ± 2,0
RN	I	1817 ± 190	98 ± 53	94 ± 3,1
	II	1392 ± 165	94 ± 52	93 ± 5,0
	III	1820 ± 123	143 ± 35	92 ± 2,0
RS	I	1817 ± 190	79 ± 29	96 ± 1,5
	II	1509 ± 168	106 ± 78	93 ± 3,0
	III	1896 ± 159	194 ± 52	90 ± 3,0

Fonte: a autora.

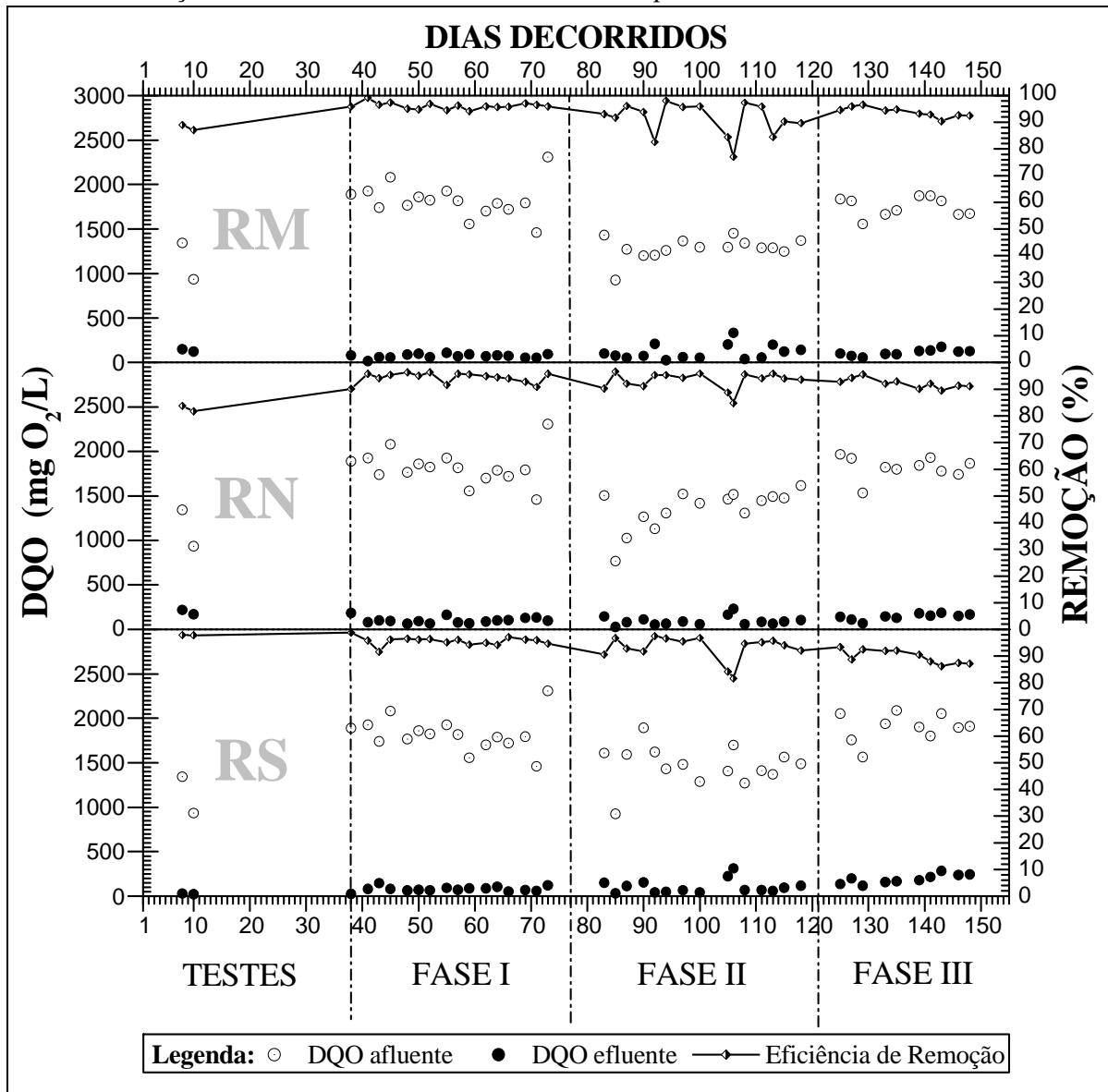
Notas: o desvio padrão encontra-se indicado à direita das médias correspondentes. As médias utilizadas foram obtidas a partir da análise de 17, 15 e 10 amostras, respectivamente, para as fases I, II e III.

Observa-se na Tabela 13 eficiências de remoção superiores a 90% para os três reatores anaeróbios, nas diferentes fases da investigação, concordando com vários estudos citados na literatura, na presença ou não de aceptores externos de elétrons (CATTONY *et al.*, 2005; DE NARDI *et al.*, 2005; GUSMÃO *et al.*, 2006, 2007; MARTÍNEZ, CUERVO-LÓPEZ, GOMES, 2007).

É importante observar que os valores médios de DQO afluente obtidos mantiveram-se inferiores ao valor teórico de 2.000 mg O<sub>2</sub>/L, esperado para as soluções preparadas (Tabela 13). Nota-se também um valor de DQO bem abaixo da DQO teórica na Fase II, o que provavelmente foi resultado de uma preparação incorreta da solução-estoque no período, o que foi gradualmente remediado nas alimentações seguintes. Contudo, os percentuais de remoção de DQO obtidos ao longo do tempo apresentaram pouca variação, mostrando que os reatores anaeróbios não sofreram influência perceptível de tal problema (Figura 24).



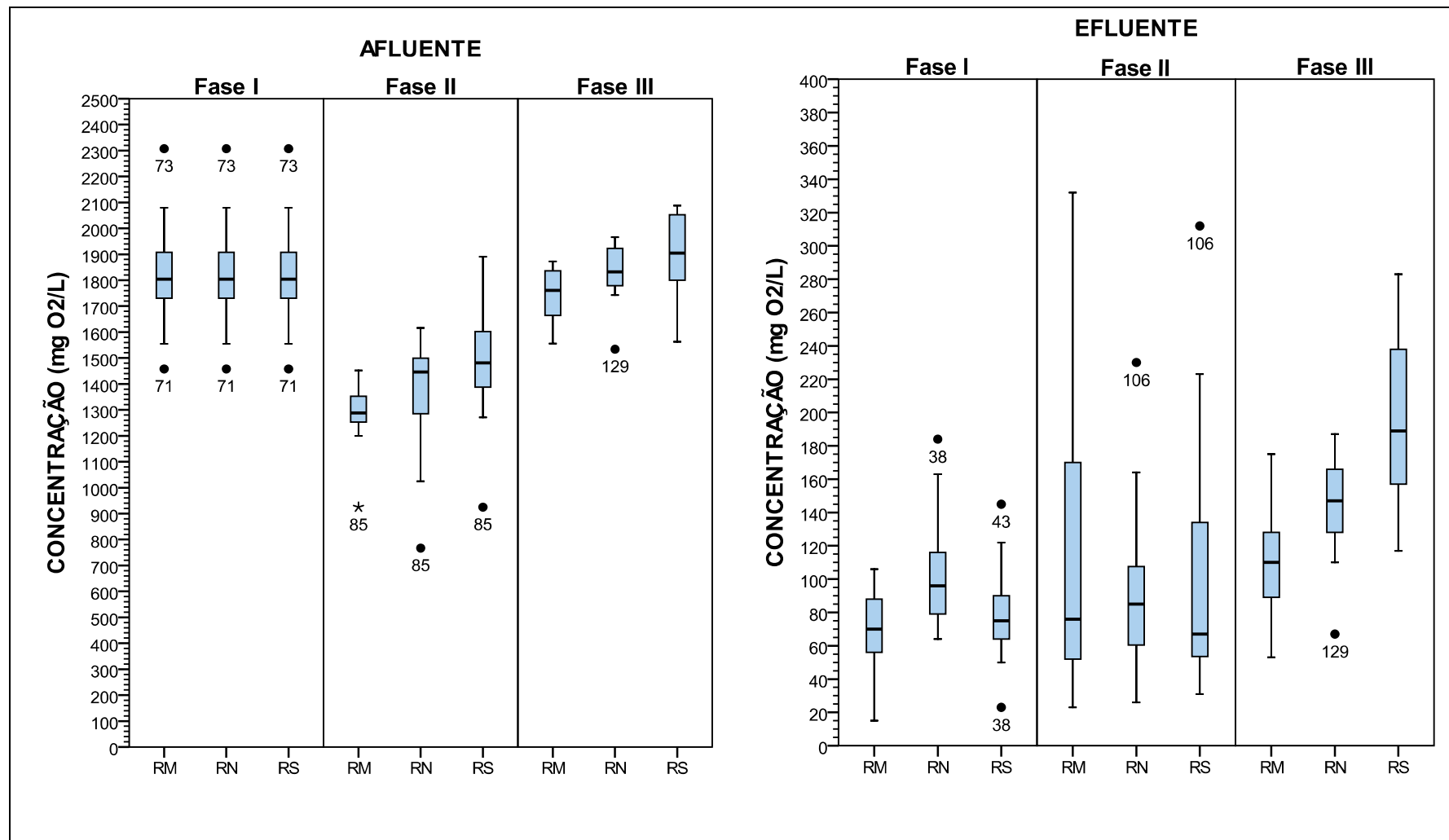
Figura 24 – Valores de DQO monitorados no afluente e no efluente e as correspondentes eficiências de remoção durante as diferentes fases da corrida experimental nos reatores anaeróbios



Fonte: a autora.

Por meio da Figura 25, na qual os dados de DQO estão dispostos na forma de um diagrama de caixa e bigodes, pode-se inferir mais facilmente que na Fase I são encontrados os menores valores de DQO efluente, em geral, inferiores a 100 mg O<sub>2</sub>/L (41 de 51 amostras). Para as demais fases da pesquisa, os níveis de DQO, embora na maioria das vezes acima daquele valor, são normalmente, inferiores a 200 mg O<sub>2</sub>/L (65 de 75 amostras), limite máximo permitido pela Resolução n° 430 do CONAMA (BRASIL, 2011) para lançamento de efluentes.

Figura 25 – Diagrama de caixa e bigodes para os valores de DQO monitorados no afluente e no efluente durante as diferentes fases experimentais nos reatores anaeróbios.



Fonte: a autora.

A despeito disso, percebe-se na Figura 25 que os resultados obtidos para as fases II e III, apresentam uma tendência de elevação da mediana dos valores de DQO afluente para os reatores RM, RN e RS, respectivamente; motivo pelo qual foram realizados testes estatísticos paramétricos e não paramétricos de comparação de médias (teste ANOVA e teste de Kruskal-Wallis, respectivamente) e de tendência de ordenação (teste de Jonckheere-Terpstra) para todos os dados de DQO das três etapas experimentais. Ressalte-se, preliminarmente, que testes de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade da variância (teste de Levene) foram igualmente aplicados aos dados de modo a avaliar qual tipo de teste (paramétrico ou não paramétrico) forneceria resultados mais adequados.

As estatísticas e ou as significâncias auferidas nos testes de comparação de médias e de Jonckheere para os valores de DQO são apresentados na Tabela 14 e na Tabela 15. As significâncias para os testes de normalidade e teste de Levene aplicados a tais valores são mostradas na Tabela 25 e na Tabela 26 do Apêndice A.

Tabela 14 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais.

Fase	Significância (p)			
	Afluente		Efluente	
	ANOVA	K-W	ANOVA	K-W
Fase I	1,000	1,000	<u>0,008</u>	<u>0,014</u>
Fase II	<u>0,039</u>	<u>0,008</u>	0,743	0,993
Fase III	0,059	<u>0,049</u>	<0,001	<u>0,002</u>

Fonte: a autora.

Nota: as significâncias inferiores a 0,05 estão sublinhadas para melhor visualização.

Tabela 15 – Testes Jonckheere-Terpstra para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais.

Fase	Estatística J-T e Significância**			
	Afluente		Efluente	
	$J_0^*$	P	$J_0^*$	P
Fase I	<0,001	1,000	0,767	0,443
Fase II	3,073	<u>0,002</u>	-0,052	0,958
Fase III	2,492	<u>0,013</u>	3,747	<0,001

Fonte: a autora.

Nota: \*  $J_0$  é a estatística Jonckheere padronizada para os reatores na sequência M, N, S;

\*\* as significâncias inferiores a 0,05 estão sublinhadas para melhor visualização.

Os testes estatísticos mostrados nas tabelas 25 e 26 revelam que todos os conjuntos de dados de DQO apresentam uma muito provável homogeneidade da variância, embora alguns destes conjuntos difiram significativamente da distribuição normal. Analogamente, os testes de comparação de médias, apresentados na Tabela 14,

particularmente o teste de K-W, que independe de uma distribuição normal, indicam que a DQO afluyente de pelo menos um dos reatores, nas Fases II e III, possuem uma média populacional diferindo significativamente das demais, conquanto que, em relação aos dados do efluente, existe alguma diferença significativa tanto na Fase I como na Fase III (Tabela 14). Mencione-se, entretanto, que para as diferenças observadas entre as DQO médias na Fase I, o tamanho do efeito ( $\omega = 0,39$ ) do tipo reator nestas variações, calculado por meio da Equação 7, é pequeno, isto é, embora existam as diferenças, é pouco provável que estas estejam correlacionadas com o tipo de reator nessa fase.

Adicionalmente, os resultados do teste de tendência de J-T (Tabela 15) evidenciam o aumento do valor da mediana dos dados de DQO afluyente nos reatores, durante as Fases II e III, na seguinte ordem:  $RM < RN < RS$ .

Esta mesma tendência é igualmente observada para os dados efluente na Fase III (Tabela 15), com um grande tamanho do efeito, calculados a partir das equações 7 e 8, ( $r_o = 0,69$ ,  $\omega = 0,62$ ), isto é, o reator RM está produzindo um efluente com valores de DQO menores que aqueles reatores com aceptores. Este fato pode ser um indicativo de que as concentrações dos aceptores usadas neste estudo influenciam muito pouco ou, mesmo, não favorecem a degradação do material oxidável, a ponto de aumentar a eficiência da remoção de DQO nos reatores que continham nitrato ou sulfato.

Ruiz *et al.* (2006 *apud* Quan *et al.* 2007), estudando o efeito da razão DQO/aceptor nas atividades metanogênicas e desnitrificantes em um reator UASB, verificaram que uma elevada razão favorece as atividades metabólicas das arqueas metanogênicas em detrimento da atividade dos microrganismos desnitrificantes, podendo, desta forma, ocorrer metanização e desnitrificação simultâneas nos reatores que continham nitrato. Tal observação está de acordo com os resultados da Fase III da presente investigação, na medida em que foi encontrada uma elevada produção de metano, inclusive nos reatores RN e RS, eficiências similares de remoção de DQO nos três sistemas, e a reprodução da mesma tendência de valores da DQO afluyente e efluente aos reatores.

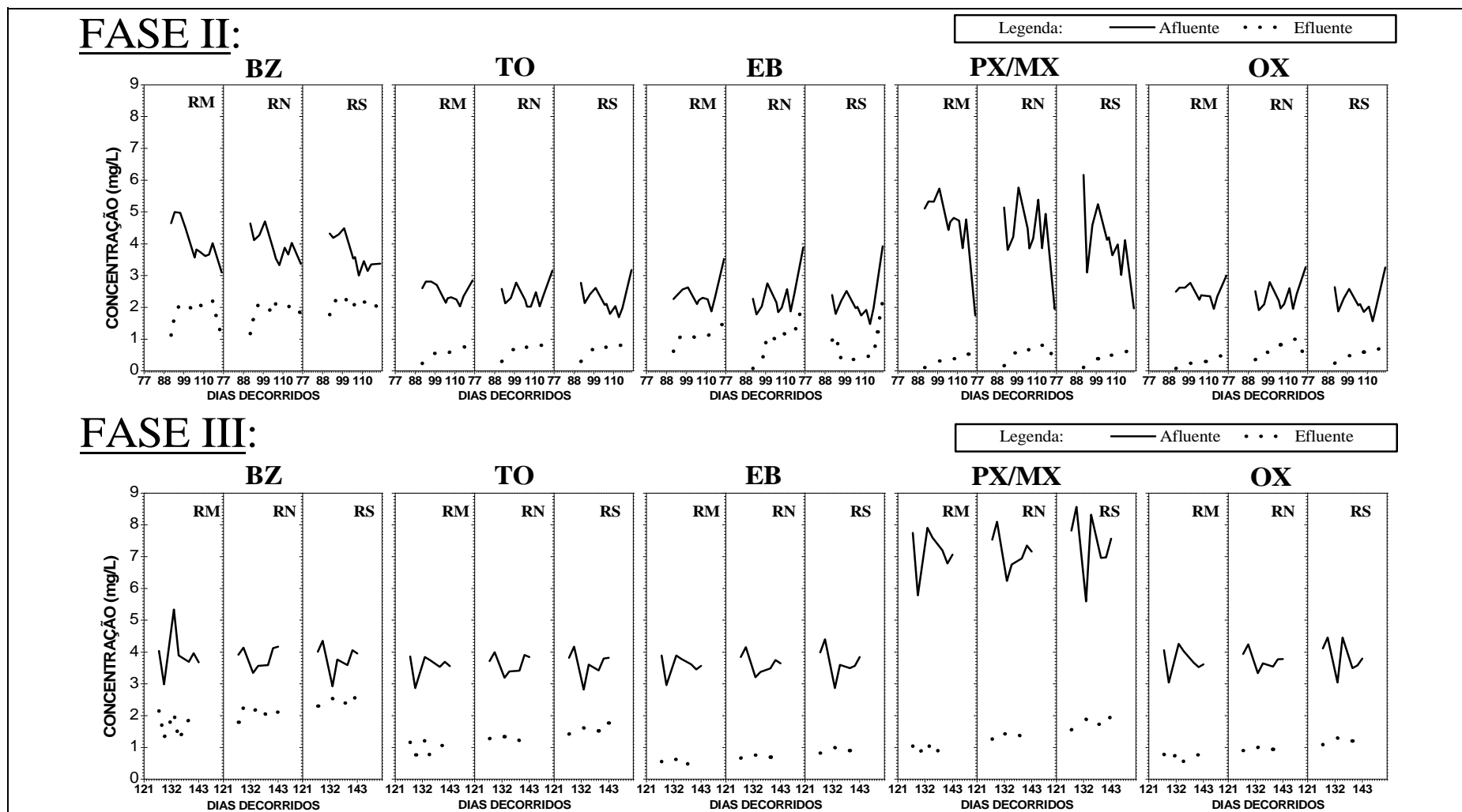
### 5.3.5 Remoção dos BTEX

Os BTEX foram avaliados durante as fases II e III de operação dos biorreatores. Esses sistemas apresentaram rápida adaptação aos poluentes, inclusive para a possível saturação do processo de adsorção dos poluentes no lodo, período de aproximadamente 10 dias. É importante mencionar que Cattony *et al.* (2007) e De Nardi *et al.* (2005), avaliando a

remoção de BTEX em RAHLF, respectivamente com e sem acceptor de elétrons, constataram que foi necessário um período igual ou superior a 10 dias para que houvesse a estabilização do sistema reacional, ou seja, que este apresentasse valores estáveis para a DQO e para as concentrações de BTEX, como também para os demais parâmetros analisados.

Portanto, visto a estabilidade do sistema é que os dados analíticos foram estatisticamente tratados e utilizados na avaliação da eficiência de remoção dos poluentes e no controle dos demais parâmetros operacionais monitorados. Assim, as concentrações afluentes, como também a concentração efluente de cada composto BTEX nos reatores, determinadas naquele monitoramento periódico, podem ser vistas no gráfico da Figura 26.

Figura 26 – Concentrações afluente e efluente dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-/m-xileno, e o-xileno) nos reatores RM, RN e RS nas Fases II e III.



Fonte: a autora.

Na análise dos dados dispostos na Figura 26, deve-se reiterar inicialmente que as concentrações de p-xileno e de m-xileno não puderam ser determinadas isoladamente pelo método cromatográfico desenvolvido. Assim, para efeito de comparação das concentrações individuais de BTEX observadas, a concentração de m-xileno e p-xileno será a metade da concentração total obtida.

Desta feita, nota-se que no afluente, durante a fase metanogênica (Fase II), as concentrações de benzeno variaram de 3,0 mg/L a 5,0 mg/L, enquanto que para os demais BTEX, variaram predominantemente de 1,5 mg/L a 3,0 mg/L (Figura 26). Já para o efluente, como pode ser observado na Figura 26, as concentrações de benzeno mantiveram-se na faixa de 1,0 mg/L a 2,5 mg/L, enquanto que as concentrações dos demais BTEX estudados foram inferiores a 1,0 mg/L.

Na Fase III, diferentemente da Fase II, as concentrações afluentes de todos os BTEX variaram predominantemente de 3,0 mg/L a 4,5 mg/L (Figura 26). Entretanto, o comportamento observado na Fase II para o efluente foi igualmente verificado no efluente da Fase III, isto é, as concentrações de benzeno variando de 1,0 mg/L a 3,0 mg/L e, acima daquelas observadas para os demais BTEX estudados, os quais permaneceram inferiores a 1,0 mg/L no reator metanogênico, e inferiores a 2,0 mg/L nos outros dois reatores (Figura 26).

Os valores médios dos BTEX no afluente e efluente, assim como as eficiências de remoção obtidas nas Fases II e III, são apresentadas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. Observa-se que o benzeno foi o constituinte que apresentou, em geral, as menores eficiências de remoção, comparativamente aos demais BTEX, variando entre 40 e 62%, seguido do etilbenzeno. Este último teve muita variação durante a Fase II, porém na Fase III, a remoção desse composto aumenta para os três biorreatores, apresentando uma média de remoção de aproximadamente 80%. O tolueno, que é bastante estudado em sistemas contínuos, apresentou boas eficiências de remoção ao longo de todo o período avaliado (Tabelas 16 e 17). Os isômeros do xileno foram os compostos que apresentaram as maiores eficiências de remoção, chegando, algumas vezes, a valores superiores a 90%.

Tabela 16 – Concentrações médias afluentes e efluentes e eficiências de remoção dos BTEX nos três reatores anaeróbios durante a Fase II

	BTEX	Concentração média (mg/L)		Eficiência de remoção (%)
		Afluente	Efluente	
RM	BZ	3,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	56,1 ± 8,0
	TO	2,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	76,1 ± 5,4
	EB	2,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	52,4 ± 2,7
	PX/MX	5,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1	92,6 ± 3,0
	OX	2,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	89,2 ± 2,4
RN	BZ	4,1 ± 0,4	1,9 ± 0,3	53,4 ± 9,0
	TO	2,2 ± 0,2	0,7 ± 0,1	65,1 ± 4,0
	EB	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	44,7 ± 7,5
	PX/MX	4,9 ± 0,6	0,7 ± 0,1	85,5 ± 3,1
	OX	2,2 ± 0,2	0,5 ± 0,05	77,9 ± 3,7
RS	BZ	4,0 ± 0,4	2,1 ± 0,2	46,0 ± 7,6
	TO	2,1 ± 0,3	0,8 ± 0,01	62,1 ± 6,7
	EB	1,8 ± 0,5	0,4 ± 0,05	76,0 ± 5,3
	PX/MX	3,9 ± 0,05	0,9 ± 0,1	77,7 ± 5,8
	OX	2,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	74,4 ± 7,7

Fonte: a autora.

Notas: o desvio padrão encontra-se indicado à direita das correspondentes médias.

Tabela 17 – Concentrações afluentes e efluentes médias e eficiências de remoção dos BTEX nos três reatores anaeróbios durante a Fase III.

Reator	BTEX	Concentração média (mg/L)		Eficiência de remoção (%)
		Afluente	Efluente	
RM	BZ	3,9 ± 0,7	1,7 ± 0,4	54,3 ± 8,3
	TO	3,6 ± 0,3	1,0 ± 0,2	71,6 ± 4,5
	EB	3,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	85,4 ± 2,2
	PX/MX	7,2 ± 0,7	1,0 ± 0,2	86,2 ± 2,1
	OX	3,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1	80,1 ± 3,1
RN	BZ	3,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	45,2 ± 6,8
	TO	3,6 ± 0,3	1,3 ± 0,1	63,2 ± 4,0
	EB	3,6 ± 0,3	0,7 ± 0,1	79,6 ± 2,7
	PX/MX	7,2 ± 0,6	1,4 ± 0,1	80,3 ± 2,4
	OX	3,7 ± 0,3	1,0 ± 0,1	73,4 ± 2,9
RS	BZ	3,8 ± 0,4	2,4 ± 0,2	40,0 ± 5,1
	TO	3,6 ± 0,4	1,5 ± 0,1	57,0 ± 7,4
	EB	3,7 ± 0,5	0,9 ± 0,1	74,6 ± 4,2
	PX/MX	7,4 ± 0,7	1,7 ± 0,1	75,8 ± 5,0
	OX	3,8 ± 0,5	1,2 ± 0,1	67,8 ± 6,4

Fonte: a autora.

Notas: o desvio padrão encontra-se indicado à direita das correspondentes médias.



Os baixos percentuais de remoção de benzeno sugerem que este composto deve ser de mais difícil degradação em condições anaeróbias, principalmente devido à estabilidade do anel benzênico, bem como o pouco conhecimento do mecanismo de ativação usado na biodegradação desse composto (WEELINK, VAN EEKERT, STAMS, 2010), quando comparado aos outros compostos monoaromáticos estudados, os quais apresentaram médias de remoções mais elevadas. É importante salientar que também pode estar havendo a perda do composto no biogás, visto que este é o mais volátil dentre todos aqueles estudados. No entanto, estudos mais detalhados da presença de BTEX no biogás devem ser realizados.

Este comportamento foi similarmente observado por De Nardi, Zaiat e Foresti (2007), operando um RAHLF, em concentrações próximas àsquelas avaliadas neste estudo, mas com um TDH de aproximadamente 11h. Coates *et al.* (2001) também verificaram a maior dificuldade de biodegradação de benzeno sob condições anaeróbias desnitrificantes, em relação aos alquilbenzenos.

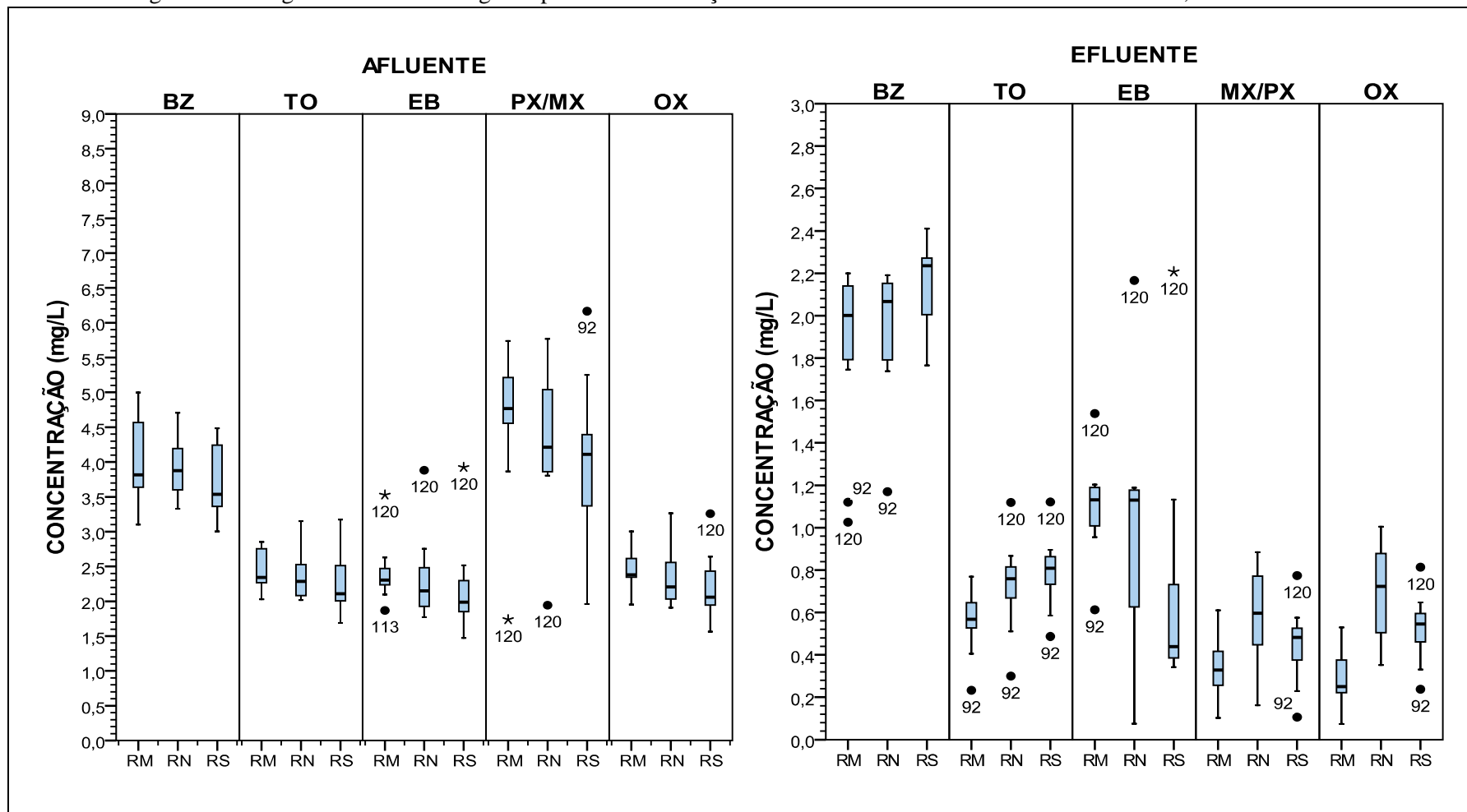
Especificamente quando se comparam os percentuais de remoção de benzeno e de tolueno, alguns estudos (MARTÍNES, CUERVO-LÓPEZ, GOMEZ, 2007; MCKEON *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009) explicam que a remoção de tolueno é mais fácil e eficiente que a do benzeno, pois esse composto é menos tóxico aos microrganismos, entre outros fatores. Jo *et al.* (2008) comentam ainda que os isômeros aromáticos de xilenos podem apresentar eficiências de remoção mais altas quando metabolizados juntamente com os outros monoaromáticos, fato confirmado nas maiores eficiências de remoção para tais isômeros comumente observadas aqui neste estudo.

Ademais, particularmente na Fase III, pode-se notar uma possível tendência de diminuição das eficiências de remoção na presença da elevada razão DQO/aceptor utilizada neste trabalho, inclusive, com o reator sulfetogênico menos eficiente que o desnitrificante. Tal desempenho pode ser atribuído ao fato de os microrganismos sulfetogênicos e desnitrificantes terem preferido oxidar o etanol e não os BTEX para a redução dos aceptores, diminuindo assim as eficiências de remoção de BTEX nessas condições (MARTÍNEZ, CUERVO-LÓPEZ, GOMEZ, 2007).

Assim, testes estatísticos de comparação de médias e de tendência de ordenação foram aplicados aos dados de concentração dos BTEX nas duas últimas etapas desta investigação para avaliar se essa tendência é casual e se ela está relacionada com a presença dos aceptores.

Preliminarmente, com o objetivo de avaliar a existência de valores atípicos e o atendimento ou não aos requisitos de adequação dos testes paramétricos usados, outros procedimentos e testes estatísticos (normalidade e homogeneidade da variância) foram também utilizados. A avaliação dos valores atípicos se baseou na diferença dos valores em relação ao intervalo interquartil, como descrito na metodologia. As Figuras 27 e 28 trazem os diagramas de caixa e bigodes dos dados correspondentes às Fases II e III, respectivamente, as quais permitem uma visualização mais objetiva, embora menos detalhada, das variações já discutidas nas concentrações dos BTEX.

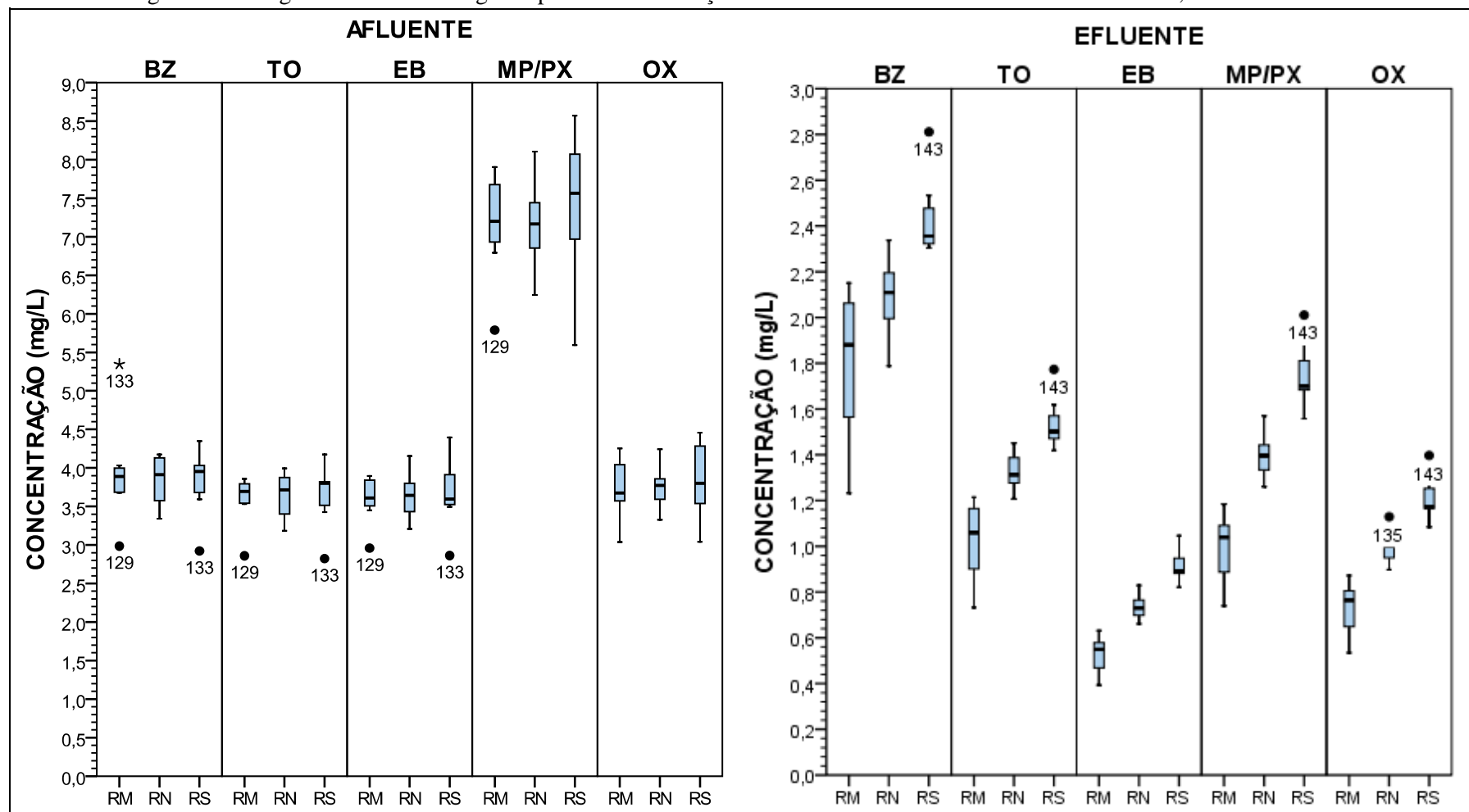
Figura 27 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações dos BTEX afluentes e efluentes aos reatores, durante a Fase II.



Fonte: a autora

Nota: os círculos preenchidos e asteriscos são valores incoerentes (atípicos e extremos, respectivamente) nos dados representados.

Figura 28 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações dos BTEX afluentes e efluentes aos reatores, durante a Fase III.



Fonte: a autora.

Nota: os círculos preenchidos e asteriscos são valores incoerentes (atípicos e extremos, respectivamente) nos dados representados.

Diversos valores discrepantes (extremos e atípicos) são estatisticamente indicados nos diagramas das Figuras 27 e 28. Os rótulos apresentados (um número) indicam o número de dias decorridos, a partir do início dos testes (01/06/2011), até o dia da coleta do dado.

A partir de um levantamento das possíveis ocorrências analíticas e operacionais nos dias em que ocorreram os valores inconsistentes, somente os dados determinados nas coletas do dia 29/09/2011 (número 120), na Fase II, foram excluídos das análises estatísticas apresentadas. Isto porque, foi observada uma pressão muito reduzida no gás de arraste do cromatógrafo gasoso, neste dia, o que pode ter comprometido a determinação das concentrações dos constituintes BTEX nos afluentes e efluentes dos reatores; fato corroborado pela identificação deste dia como atípico para a maioria dos compostos no afluente e efluente dos três reatores UASB, conforme visto na Figura 27.

As estatísticas e ou as significâncias auferidas nos testes de comparação de médias e de tendência são apresentadas na Tabela 18 e na Tabela 19. As significâncias para os testes de normalidade e para os testes de Levene aplicados são mostrados, respectivamente, na Tabela 25 e na Tabela 26 do Apêndice A. É ainda importante mencionar que, mesmo considerando o dado inconsistente anteriormente destacado nas análises estatísticas apresentadas para os BTEX, todas as interpretações relevantes foram igualmente obtidas, na maioria dos casos, àquelas em que se desconsidera aquele *outlier* nos testes estatísticos.

Tabela 18 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para os constituintes BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores (fator), na Fase II e na Fase III.

Fase	BTEX	Significância (p)			
		Afluente		Efluente	
		ANOVA	K-W	ANOVA	K-W
II	BZ	0,217	0,196	0,140	<u>0,048</u>
	TO	0,149	0,134	<u>0,032</u>	<u>0,018</u>
	EB	0,099	0,100	<u>0,006</u>	<u>0,019</u>
	PX/MX	0,160	0,124	<u>0,007</u>	<u>0,013</u>
	OX	0,073	0,099	< <u>0,001</u>	< <u>0,001</u>
III	BZ	0,882	0,996	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
	TO	0,951	0,956	< <u>0,001</u>	< <u>0,001</u>
	EB	0,921	0,953	< <u>0,001</u>	< <u>0,001</u>
	PX/MX	0,805	0,662	< <u>0,001</u>	< <u>0,001</u>
	OX	0,868	0,872	< <u>0,001</u>	< <u>0,001</u>

Fonte: a autora.

Tabela 19 – Testes Jonckheere-Terpstra para os constituintes BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores, na Fase II e na Fase III.

Fase	BTEX	Estatística J-T e Significância			
		Afluente		Efluente	
		$J_o^*$	p	$J_o^*$	p
II	BZ	-1,692	0,091	2,205	<u>0,027</u>
	TO	-2,035	<u>0,042</u>	2,890	<u>0,004</u>
	EB	-2,149	<u>0,032</u>	-2,586	<u>0,010</u>
	PX/MX	-2,035	<u>0,042</u>	0,570	0,568
	OX	-2,149	<u>0,032</u>	2,167	<u>0,030</u>
III	BZ	0,097	0,923	3,769	<0,001
	TO	0,290	0,772	4,542	<0,001
	EB	0,225	0,822	4,671	<0,001
	PX/MX	0,548	0,584	4,671	<0,001
	OX	0,419	0,675	4,671	<0,001

Fonte: a autora.

Nota: \*  $J_o$  é a estatística Jonckheere-Terpstra padronizada para os reatores na ordem RM, RN e RS.

A partir dos resultados dos testes de normalidade e de homogeneidade de variância, Tabelas 27 e 28 do Apêndice A, pode-se dizer que a quase totalidade de todos os conjuntos de dados avaliados se comportaram, aproximadamente, como uma distribuição normal e de forma homogênea em relação às variâncias nos distintos reatores. As principais exceções para a normalidade dos dados dizem respeito ao componente benzeno no efluente durante a Fase II e ao EB no afluente nesta fase, enquanto que para a homogeneidade da variância para a média, os únicos conjuntos não homogêneos são dos dados de EB e de OX no efluente da Fase II.

Assim, para a maioria dos dados, é possível aplicar testes paramétricos com certa segurança. Contudo, considerando que na comparação estatística paramétrica não se deve incluir dados não normais, testes não paramétricos também foram usados na avaliação da biodegradação nos distintos reatores, e devem ser priorizados quando forem discordantes nas interpretações em relação aos testes paramétricos (Tabela 18).

Diante do exposto, por meio dos testes ANOVA e K-W, dispostos na Tabela 18, pode-se afirmar, como bastante provável, que as concentrações afluentes, representadas por suas médias, para cada composto BTEX, nos três biorreatores (RM, RN e RS), eram praticamente iguais, tanto na Fase II como na Fase III do estudo.

Ressalte-se que as significâncias do afluente durante a Fase III são muito elevadas, tanto na comparação das médias (Tabela 18) quanto nos testes de ordenação das

medianas (Tabela 19), dando uma forte evidência da igualdade e da ausência de qualquer tendência de ordenação dos dados.

É importante comentar, ainda, que apesar de haver evidência significativa da igualdade das médias dos BTEX no afluente da Fase II, o teste J-T também evidencia que existe uma leve tendência, a partir do cálculo do seu tamanho de efeito,  $r_o < 0,37$  (Equação 8), de diminuição das concentrações BTEX de alimentação na seguinte ordem: RM, RN e RS, como pode ser melhor visualizado nos dados da Figura 28. Esta ordenação decrescente dos valores é muito intrigante, visto que os reservatórios de afluente foram alimentados e pressurizados seguindo os mesmos procedimentos experimentais, o que certamente justifica e corrobora as igualdades de média verificadas. Contudo, tal fato poderia ser motivado pela existência de erros sistemáticos sutilmente distintos na alimentação dos reatores.

Com relação ao efluente dos reatores, os testes de comparação de médias revelam uma diferença significativa para as concentrações de cada um dos hidrocarbonetos monoaromáticos, nas duas fases específicas de degradação (Tabela 18). Na Fase III, o tamanho do efeito dos fatores (reatores) é muito grande ( $\omega > 0,82$ ), calculado a partir da Equação 7, o que poderia ser explicado com base na presença ou não de distintos aceptores de elétrons nos reatores avaliados. Porém, para a Fase II, na qual os BTEX estão hipoteticamente degradando sob as mesmas condições (metanogênicas), a evidência de diferenças significativas ( $0,50 < \omega < 0,75$ ) nas concentrações médias nos três reatores revela que deva haver um sinergismo entre os distintos compostos, além de outros fatores (e.g., aspectos bioquímicos e hidrodinâmicos), provocando eficiências diferentes de degradação nos reatores supostamente iguais.

Dou, Liu e Hu (2008) e Jo *et al.* (2008) também observaram experimentalmente, e a partir de um amplo levantamento na literatura, a existência de um pronunciado sinergismo entre os hidrocarbonetos monoaromáticos, o que faz com que a presença de certo composto BTEX iniba ou estimule a degradação dos demais, efeito que é fortemente dependente da concentração dos compostos na mistura BTEX.

Assim, considerando que: (a) os reatores são alimentados com uma solução etanólica dos BTEX, na qual não se conseguiu manter uma concentração constante dos constituintes, ao longo do período de estudo; (b) que os sistemas reacionais utilizados são efetivamente não ideais, apresentando condições hidrodinâmicas diferentes entre si, como também possuem uma dinâmica bioquímica muito particular e distinta; pode-se dizer que as diferenças significativas das concentrações médias observadas no efluente, durante a Fase II,

são possivelmente devidas àquele sinergismo entre os compostos individuais BTEX e às distintas condições hidrodinâmicas e bioquímicas em cada um dos reatores.

Neste contexto, é importante avaliar se o sinergismo entre os compostos individuais, ao invés da presença dos aceptores, poderia ser a causa das diferenças observadas nas médias das concentrações dos efluentes dos distintos reatores. Com esse intuito, procurou-se avaliar a remoção total dos BTEX, complementarmente à avaliação, já realizada, da remoção dos constituintes individuais. Ressalte-se que um estudo mais detalhado dos efeitos mútuos que cada composto exerce sobre os demais, bem como da dinâmica populacional dos microrganismos atuando em cada reator poderia esclarecer mais apropriadamente tal comportamento nos reatores.

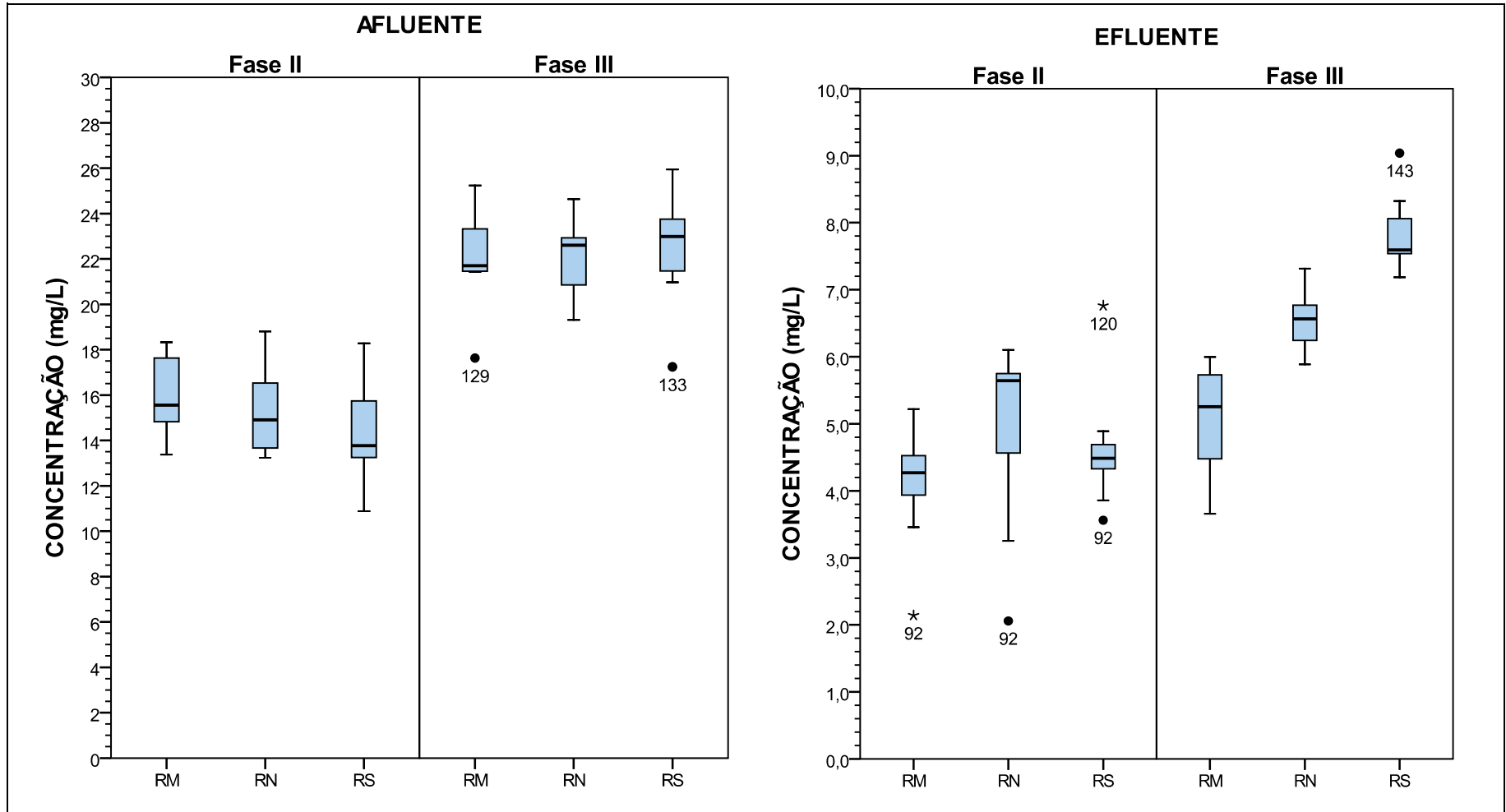
Novamente, fez-se preliminarmente a avaliação dos valores discrepantes nos conjuntos de dados da concentração total de BTEX nos diferentes sistemas e fases. Estes valores estão destacados nos diagramas de caixa e bigodes da Figura 29. Os dados correspondentes ao 120º dia de operação, correspondente a Fase II, foram desprezados nos testes estatísticos aplicados, conforme já justificado anteriormente. Outrossim, os valores discrepantes observados no primeiro dia da Fase II, como também aqueles notados na Fase III, foram mantidos no conjunto de dados, haja vista que sua exclusão não influenciava as interpretações dos testes estatísticos realizados.

Deste modo, as estatísticas e ou as significâncias auferidas nos testes de comparação de médias e de tendência para a concentração total de BTEX são apresentadas na Tabela 20 e na Tabela 21. As significâncias para os testes de normalidade e para os testes de Levene também aplicados são mostrados juntamente com os dados dos constituintes BTEX, respectivamente, na Tabela 27 e na Tabela 28 do Apêndice A.

Assim sendo, também pode ser inferido, a partir das tabelas 27 e 28, que os dados de BTEX se distribuem normalmente e apresentam homogeneidade de variância, exceto para o efluente na Fase II, considerando os três reatores investigados. A não normalidade e não homogeneidade da variância para os dados do efluente na Fase II sugere, mais uma vez, que há algum efeito do tipo do reator na distribuição e dispersão dos dados naquele sistema, confirmando a necessidade de um estudo mais detalhado sobre o sinergismo e a dinâmica das comunidades anaeróbias ali presentes.



Figura 29 – Diagramas de caixa e bigodes para as concentrações afluentes e efluentes dos BTEX, durante a Fase II e a Fase III, nos reatores RM, RN e RS



Fonte: a autora.

Tabela 20 – Testes ANOVA e de Kruskal-Wallis para a concentração total BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores (fator), na Fase II e na Fase III

Fase	Componente	Significância (p)			
		Afluente		Efluente	
		ANOVA	K-W	ANOVA	K-W
<b>II</b>	BTEX	0,111	0,151	0,281	0,137
<b>III</b>	BTEX	0,948	0,740	<0,001	<0,001

Fonte: a autora.

Tabela 21 – Testes Jonckheere-Terpstra para a concentração total BTEX nos afluentes e efluentes, em relação aos reatores, na Fase II e na Fase III

Fase	Componente	Estatística J-T e Significância			
		Afluente		Efluente	
		$J_0^*$	p	$J_0^*$	p
<b>II</b>	BTEX	-1,996	0,046	0,152	0,879
<b>III</b>	BTEX	0,354	0,723	4,607	<0,001

Fonte: a autora.

Nota: \*  $J_0$  é a estatística Jonckheere-Terpstra padronizada para os reatores na ordem RM, RN e RS.

Os testes de comparação de médias (Tabela 20) revelam que, em ambas as fases de degradação dos BTEX, as concentrações na alimentação dos distintos reatores são significativamente as mesmas (mesma média e variância), como esperado, já que os reservatórios de solução afluente eram preparados e condicionados da mesma forma. Entretanto, o teste J-T (Tabela 21) indica novamente uma tendência de ordenação decrescente, com tamanho de efeito médio ( $r_0 = 0,44$ ), nas concentrações BTEX para o afluente na Fase II, corroborando a existência de diferenças (erros sistemáticos) sutis na alimentação dos reatores nesta fase. Esta tendência pode ser melhor observada na Figura 29.

Os testes também evidenciam, de acordo com as expectativas, que não há diferença significativa na degradação global dos BTEX (dados de efluente da Tabela 20), ou seja, embora os efeitos locais e a sinergia entre os constituintes BTEX possam revelar diferenças no perfil de biodegradação individual de cada um, a degradação dos BTEX conjuntamente se mantém aproximadamente a mesma sob condições metanogênicas, sem evidência provável de tendência de ordenação das concentrações efluentes e com remoções globais da ordem de 70%. Mencione-se, ainda, que De Nardi, Zaiat e Foresti (2007), estudando a biodegradação metanogênica dos BTEX, num RAHLF, em concentrações próximas àquelas aqui avaliadas, obtiveram remoções globais de BTEX similares, da ordem de 71%.

Contrariamente, ao observado para a Fase II, a possível presença dos aceptores de elétrons nos reatores (Fase III) resultaram em concentrações totais de BTEX, no efluente,

significativamente diferentes,  $p < 0,001$  (Tabela 20) e  $\omega = 0,84$ , calculado de acordo com equação 7, evidenciando que os distintos reatores biodegradam os BTEX diferentemente após a inserção dos aceptores.

Quan *et al.* (2007) observaram um comportamento análogo ao investigar a remoção de hidrocarbonetos aromáticos em um filtro anaeróbio com TDH de 24h e elevada razão DQO/aceptor, isto é, após a inserção de nitrato, as remoções tanto de DQO quanto dos compostos aromáticos diminuiu razoavelmente (de 80% para 63% e de 80 para 72%, respectivamente) por um período superior a 40 dias de operação do sistema, sugerindo que elevadas razões C/N podem ocasionar perturbações no sistema, com uma queda inicial de suas eficiências até que o sistema retorne ao equilíbrio.

Deste modo, estudos mais detalhados da influência das razões C/N e C/S devem ser conduzidos, de modo à melhor compreender o efeito da presença de aceptores de elétrons no meio reacional, que, em geral, particularmente para baixas razões DQO/aceptor favorecem a remoção dos BTEX (GUSMÃO *et al.*, 2007; CATTONY *et al.*, 2007; DOU *et al.*, 2008).

Adicionalmente, quando se comparam os aceptores nitrato e sulfato, as remoções de BTEX, obtidas individualmente ou de forma agrupada, são melhores no reator desnitrificante (Figura 29), confirmando os resultados de Jo *et al.* (2008) que atribuíram tal desempenho aos efeitos termodinâmicos mais favoráveis para a atividade metabólica dos microrganismos desnitrificantes.

Mencione-se, ainda, que os três sistemas reacionais investigados, nas três fases consideradas, não apresentaram acumulação de ácidos graxos voláteis (fase II: ac. acético 30 mg/L; fase III: heptanóico 75 mg/L), sendo os maiores resultados encontrados no reator RM. Os demais ácidos avaliados apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do método. Tal fato pode ser confirmado pela manutenção do pH efluente em uma faixa neutra,  $7,1 \pm 0,1$ , para todos os reatores.

### 5.3.6 Balanços de massa para os sistemas

#### 5.3.6.1 Balanço de carbono

Para os cálculos de balanço de DQO nos reatores foram considerados os valores médios de dezessete, quinze e onze análises de DQO afluente e efluente, temperatura e percentual de metano (v/v) durante as fases I, II e III, respectivamente. A Tabela 22 apresenta os valores médios de biogás teórico e medido para os três reatores avaliados durante as três fases em estudo.

Tabela 22 – Valores médios e diferenças de biogás teórico e medido nos três reatores estudados

Reator	Fase I			Fase II			Fase III		
	Q <sub>teórica</sub>	Q <sub>medida</sub>	Dif. %	Q <sub>medida</sub>	Q <sub>teórica</sub>	Dif. %	Q <sub>medida</sub>	Q <sub>teórica</sub>	Dif. %
<b>RM</b>	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,1	-15,3	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2	-36,5	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	-12,6
<b>RN</b>	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	17,4	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	-17,7	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,5
<b>RS</b>	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1	14,9	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,2	-24,5	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,2	-8,1

Fonte: a autora.

Nota: Q<sub>teórica</sub>: vazão média teórica de biogás (L/d); Q<sub>medida</sub>: vazão de biogás média medida (L/d); Dif. %: Diferença em percentual entre a vazão de biogás medida e teórica.

É notório para os três reatores em estudo que existe uma diferença entre o biogás teórico e o medido, podendo ser, em sua maioria, por razões operacionais, tais como variação de temperatura e pressão. Na primeira fase dos experimentos, onde a fonte de matéria orgânica e energia era apenas o etanol não se obteve diferenças significativas entre as quantidades de biogás teórico e medido. Por exemplo, o fluxo do carbono aflente (Carga de DQO de  $2,85 \pm 0,46$  g/d) ao reator RM, que apresentou um biogás teórico de  $1,3 \text{ L/d} \pm 0,3$  e medido de  $1,5 \pm 0,1$  L/d, (Tabela 22), era:  $0,11 \pm 0,04$  g/d de DQO eliminada no efluente,  $0,16 \pm 0,04$  g/d de DQO incorporada na biomassa (anabolismo) e  $2,58 \pm 0,46$  g/d de DQO convertida em biogás (metano). Tal conversão demonstra alta estabilidade dos consórcios microbianos.

Na segunda fase, em que foram inseridos os BTEX, essas diferenças foram negativas, ou seja, estima-se que a quantidade de DQO que entrava no sistema era subestimada, apresentando uma quantidade de conversão de matéria orgânica em biogás sempre acima do valor teórico, como mostra a Tabela 22. Tal fato pode ser atribuído, mais uma vez, às condições externas (temperatura e pressão), erro analítico, à maior quantidade de produção de biomassa ou a um possível erro no cálculo teórico, subestimando, assim, a quantidade de biogás produzido.

A Fase III foi a que apresentou valores mais estáveis de balanço de massa nos três biorreatores, apresentando pouca diferença com relação à produção de biogás (Tabela 22). A maior parte da matéria orgânica era efetivamente convertida em biogás, com valores médios de 88%, 87% e 85%, respectivamente, para os reatores RM, RN e RS. Tal fato demonstra mais uma vez o bom funcionamento dos reatores, os quais apresentaram baixa DQO efluente, aproximadamente, 6%, 8% e 9%, para os reatores RM, RN, e RS, respectivamente. Os resultados de balanço de massa revelam a forte predominância das arqueas metanogênicas nos sistemas, mesmo aqueles reatores suplementados com aceptores de elétrons, concluindo que a quantidade incrementada desses compostos, no tempo de operação dos biorreatores, pode não

ter sido suficiente para estimular o crescimento de bactérias sulfatoredutoras e desnitrificantes ou mesmo utilizando os diversos aceptores de elétrons com outras rotas metabólicas.

### 5.3.6.2 Balanço de nitrogênio

O balanço de nitrogênio foi realizado no reator desnitrificante durante a Fase III. Para os cálculos de balanço de nitrogênio, se considerou as médias afluentes e efluentes de onze análises de NTK, nitrato, nitrito e vazão afluente, as quais estão dispostas na Tabela 23.

Tabela 23 – Valores médios das frações nitrogenadas quantificadas para o cálculo do balanço de massa.

Parâmetro	Entrada (mg/d)	Saída (mg/d)	Dif. %
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	111 ± 10,6	109 ± 11,1	
N <sub>orgânico</sub>	-	24 ± 3,0	
N-NTK	111 ± 10,6	133 ± 20,1	
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	19 ± 1,7	0,1 ± 0,03	
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	38 ± 5,1	0,4 ± 0,05	
N-biomassa	0	0,01	
<b>Nitrogênio total</b>	<b>171 ± 11,4</b>	<b>133,5 ± 15,0</b>	<b>21</b>

Fonte: a autora.

Pode ser observado que praticamente toda a fração nitrogenada que entrava no sistema reacional RN estava sendo convertida e saía do sistema (Tabela 23). A diferença existente entre todo o nitrogênio que entrava e saía do sistema era de 21%. Tal diferença pode ser atribuída ao não acompanhamento do percentual de nitrogênio gasoso no biogás, haja vista que a coluna utilizada na caracterização do biogás não o separava do ar, e também outros compostos gasosos de nitrogênio que não puderam ser determinados.

Como citado na seção 5.3.3, o percentual de amônia no biogás era muito baixo, deduzindo que toda a amônia que entrava no sistema estava sendo liberada no efluente (Tabela 23), confirmando mais uma vez a hipótese de não haver redução dissimilativa, haja vista que os dados obtidos revelam que não houve o incremento desse composto no efluente. Praticamente todo o nitrato afluente estava sendo removido no reator desnitrificante, com um percentual de remoção de aproximadamente 98% ± 0,34%. Com relação ao nitrito que entrava no sistema, pode-se atribuir a presença desse composto a uma provável contaminação no reagente utilizado para fazer a solução estoque do aceptor (nitrato). Observa-se a partir da Tabela 23 que esse composto era quase que totalmente convertido dentro do sistema, não apresentando elevadas concentrações de nitrito no efluente (Tabela 23).

### 5.3.6.3 Balanço de enxofre

Para o balanço de enxofre foi considerada a média afluyente e efluente de onze análises de sulfato, sulfeto efluente e percentual de gás sulfídrico no biogás, durante a Fase III no reator RS. Na Tabela 24 estão dispostos os valores médios de entrada e saída de cada fração de enxofre, juntamente com os dados referentes às diferenças observadas entre a carga de enxofre que entrava e que saía do sistema.

Tabela 24 – Valores médios das frações de enxofre quantificadas para o cálculo do balanço de massa.

<b>Parâmetro</b>	<b>Entrada (mg/d)</b>	<b>Saída (mg/d)</b>	<b>Dif. %</b>
<b>S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	66 ± 18,9	14 ± 4,0	-
<b>S-H<sub>2</sub>S</b>	-	0,6 ± 0,01	-
<b>S-S<sup>2-</sup></b>	0	43 ± 10	-
<b>Enxofre total</b>	66 ± 18,9	58 ± 11,5	12

Fonte: a autora.

O sistema apresentou uma pequena diferença entre a quantidade de enxofre que entrou e saiu do sistema, aproximadamente 12% (Tabela 24). Tal diferença pode ser atribuída à presença de precipitados de sulfeto, visto que o sulfeto de hidrogênio formado pode combinar com ferro e outros metais presentes no lodo, gerando, assim, precipitados pouco solúveis. É importante mencionar ainda a possível formação de outros compostos que não foram determinados (e.g. tiosulfato) e uma pequena assimilação de enxofre para o anabolismo celular.

Então, mesmo presente, aparentemente, em pequenas quantidades, devido à baixa concentração de sulfato no meio necessário a estimulação das BSR, estas foram capazes de reduzir este composto a sulfeto, o qual se apresentou, predominantemente na forma solúvel, principalmente devido ao pH do meio ter se mantido sempre próximo a neutralidade, evitando a formação de gás sulfídrico, como abordado na discussão do biogás. Os valores observados indicam que o sistema apresentou bons rendimentos de redução de sulfato, com baixa concentração desse composto no efluente (Tabela 24), apresentando um percentual de remoção de aproximadamente 80%, sendo apenas 20% eliminado junto com o efluente.

## 6 CONCLUSÕES

O emprego de técnicas como planejamento fatorial multivariado possibilitou a satisfatória otimização das condições analíticas de determinação dos BTEX em matrizes aquosas utilizando a extração por *headspace* para posterior análise por cromatografia gasosa com detector PID. Assim, os valores ótimos dos parâmetros de extração foram: volume de amostra de 15 mL, tempo de incubação de 15 minutos e temperatura de 70°C. Ressalte-se que o volume de amostra foi o parâmetro analítico que exerceu o maior efeito sobre extração e consequente resposta cromatográfica dos compostos, enquanto a salinidade não influenciou o processo, indicando que a metodologia analítica proposta pode ser aplicada para matrizes ambientais aquosas de diversas salinidades.

A metodologia cromatográfica desenvolvida e validada apresentou excelente linearidade, seletividade e precisão, e uma razoável exatidão na determinação dos monoaromáticos estudados, inclusive com muito boa sensibilidade para tais compostos, com baixos limites de detecção e quantificação.

O lodo utilizado na remoção dos BTEX nos ensaios de remoção apresentou elevada atividade metanogênica específica (AME) na presença de glicose, com valor de 0,63 g DQO/g·SSV·d.

Os reatores biológicos estudados forneceram elevadas eficiências na remoção de DQO, superiores a 90% em média, inclusive na presença de BTEX, produzindo biogás (predominantemente na forma de gás metano), não acumulando ácidos graxos voláteis, e com alcalinidade suficiente para tamponar o meio em pH neutro. Além disso, foi evidenciada uma discreta influência negativa da presença dos aceptores nitrato e sulfato, sob elevada razão DQO/aceptor, na remoção de DQO do meio reacional.

Com relação aos BTEX, de maneira geral, observaram-se as menores remoções nos reatores, na presença ou não dos aceptores, para o benzeno, enquanto que as maiores eficiências foram observadas para os xilenos. Também foi notado que pode existir um forte efeito sobre as eficiências de remoção dos constituintes da mistura BTEX, devido à um possível sinergismo existente entre os distintos compostos avaliados, além de possíveis influências das condições hidrodinâmicas e bioquímicas localizadas no âmbito do meio reacional.

Mais especificamente, sobre a influência dos aceptores na remoção dos BTEX, determinou-se que a elevada carga orgânica, em relação à concentração dos aceptores, resultou numa diminuição das eficiências de remoção dos BTEX quando comparadas àquelas

obtidas sob condições exclusivamente metanogênicas. Adicionalmente, as remoções dos monoaromáticos nos reatores em condições desnitrificantes foram superiores às aquelas observadas para os reatores em condições sulfetogênicas, confirmando a termodinâmica favorável para os mecanismos desnitrificantes em relação aos sulfetogênicos.



## 7 RECOMENDAÇÕES

A recuperação (exatidão) do método analítico desenvolvido pode ser melhor investigada, utilizando diferentes faixas de concentrações dos analitos monoaromáticos, a partir de amostras reais.

A sinergia existente entre os BTEX e sua influência na remoção biológica em biorreatores anaeróbios deve ser melhor investigada por meio de estudos específicos, iniciando-se os estudos com cada composto individualmente, depois avaliando-se a remoção aos pares, sob diferentes concentrações, até que se avalie num maior tempo de corrida experimental a sinergia conjunta de todos eles, complementando os dados aqui determinados.

A avaliação da influência dos aceptores de elétrons sob outras razões DQO/aceptor deve ser realizada, de modo a verificar as razões mínimas necessárias para a melhoria esperada na remoção dos BTEX nos biorreatores anaeróbios. Adicionalmente a esta avaliação, a influência da presença dos aceptores na dinâmica populacional deve ser investigada, possibilitando a maior compreensão dos efeitos observados nas diferentes fases e em diferentes razões C/N e C/S na biodegradação dos BTEX.

A avaliação das remoções sob distintas condições operacionais (TDH, carga orgânica afluyente, etc.) também contribuirá para o maior entendimento da eficiência de remoção de DQO e de BTEX pelos reatores anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente.

A quantificação das concentrações de BTEX e nitrogênio gasoso no biogás produzido podem complementar as discussões realizadas para os sistemas estudados, permitindo, possivelmente, a diminuição das diferenças verificadas nos balanços de massa apresentados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEPPLI, C. *et al.* Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, p. 116–124, 2008.

AIVALIOTI, M. *et al.* Removal of BTEX, MTBE and TAME from aqueous solutions by adsorption onto raw and thermally treated lignite. **Journal of Hazardous Materials**, article in press, 2011.

ALAJABEG, I. *et al.* Comparison of the composition of some petroleum samples which be applied for the skin and mucous membrane treatment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 75-84, 2000.

ALVA-ARGÁEZ, A.; KOKOSSIS, A.C.; SMITH, R. The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. **Chemical Engineering Journal**, v. 128, n. 1, p. 33-46, 2007.

ANDERSON, R.; LOVLEY, D. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 2261-2266, 2000.

ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, p. 287–308, 2007.

ANGELIDAKI, I. *et al.* Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 53, p. 927-934, 2009.

APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

ARROYO, D.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A. Multiresponse optimization and parallel factor analysis, useful tools in the determination of estrogens by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 358–368, 2007.

AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industrial. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 1-5, 2003.

AYOTAMUNO, M.J. *et al.* Petroleum contaminated ground-water: remediation using activated carbon. **Applied energy**, v. 83, n° 11, p. 1258–1264, 2006.

BACCAN, N. *et al.* **Química analítica quantitativa elementar**. 3 ed., São Paulo – SP: Editora Edgard Blücher, 2001.

BARRON, M. G. *et al.* Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? **Aquatic Toxicology**, v. 46, p. 253-268, 1999.

BERTIN, L. *et al.* Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols in packed-bed biofilm reactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6681–6687, 2007.

BIANCHI, F. *et al.* Use of experimental design for the purge-and-trap-gas chromatography–mass spectrometry determination of methyl tert.-butyl ether, tert.-butyl alcohol and BTEX in groundwater at trace level. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 113–121, 2002.

BITTKAU, A. *et al.* Enhancement of the biodegradability of aromatic groundwater contaminants. **Toxicology**, v. 205, n° 3, p. 201–210, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE n° 899, de 29/05/2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução n° 430/2011**. *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA*. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2011.

BRASIL. Portaria n° 518/2004. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Brasília, 2004.

BRITO, F. V. *et al.* Estudo da contaminação de águas subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil. In: 3° Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás, 2005, Salvador. **[Anais eletrônicos]**...Salvador: Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP,

2005. Disponível em: [http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0563\\_05.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0563_05.pdf). Acesso: 20 de jan. 2011.

CALLADO, N. R.; SILVA, J. B.; LOPES, J. Levantamento das fontes geradoras de resíduos de petróleo no estado de Alagoas. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais...Recife**: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 15-30.

CARO, J.; SERRANO, A.; GALLEGO, M. Direct screening and confirmation of priority volatile organic pollutants in drinking water. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, p. 244–250, 2007.

CATTONY, E. B. *et al.* Ethanol and toluene removal in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor in the presence of sulphate. **Biotechnology Bioengineering.**, v. 91 n°. 2, p. 244–253, 2005.

CATTONY, E. B. *et al.* Remoção de etanol e benzeno em reator anaeróbico horizontal de leito fixo na presença de sulfato. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n°. 2, p. 181-191, 2007.

CAVALCANTI, P. F. F. **Integrated application of the UASB reactor and ponds for domestic sewage treatment in tropical regions**. 2003. 139 f. (PhD Thesis). Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Wageningen, 2003.

CAVALCANTI, R. M. *et al.* Development of a headspace-gas chromatography (HS-GC-PID-FID) method for the determination of VOCs in environmental aqueous matrices: Optimization, verification and elimination of matrix effect and VOC distribution on the Fortaleza Coast, Brazil. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 337–343, 2010.

CERVANTES, F. J. *et al.* Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n°. 10, p. 4471–4478, 2001.

CERVANTES, J. F. *et al.* Anaerobic degradation of benzene by enriched consortia with humic acids as terminal electron acceptors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p 201–207, 2011.

CHAI, X.; FALABELLA, J. B.; TEJA, A. S. A relative headspace method for Henry's constants of volatile organic compounds. **Fluid Phase Equilibria**, v. 231, p. 239–245, 2005.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2007, 380p.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T. Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. **Trends Biotechnology**, v. 18, n°. 10, p. 408-12, 2000.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n°.2, p265-274, 2009.

CUSTÓDIO, R.; ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, v. 20, n° 2, p. 219-225, 1997.

DA SILVA, M. E. R. **Tratamento anaeróbio de efluentes contendo corantes e estudos de pós-tratamento**. 2011. 183 f. Tese de Doutorado (Engenharia Civil). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

DA SILVA, M. L. B.; RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. **Biodegradation**, v. 16, p. 105–114, 2005.

DE NARDI, I. R. *et al.* Anaerobic degradation of BTEX in a packed-bed reactor. **Water Science Technology**, v. 45, n°. 10, p. 175–180, 2002.

DE NARDI, I. R. *et al.* Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. **Process Biochemical**, v. 40, n°. 2, p. 587–592, 2005.

DE NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Kinetics of BTEX degradation in a packed-bed anaerobic reactor. **Biodegradation**, v. 18, p. 83-90, 2007.

DEMEESTERE, K. J. *et al.* Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices, **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 130-137, 2007.

DEWULF, J.; LANGENHOVE, H. V. Anthropogenic volatile organic compounds in ambient air and natural waters: a review on recent developments of analytical methodology, performance and interpretation of field measurements. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 163–177, 1999.

DONGQIANG, H.; WANYUN, M.; DIEYAN, C. Determination of biodegradation products from benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Seawater by purge and trap gas chromatography. **Chin Journal Analytical Chemical**, v. 34, n°. 10, p.1361–1365, 2006.

DOS SANTOS, A. B. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbio termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 253-259, 2005.

DOTT, W. et al. Comparison of ex situ and in situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. **International biodeterioration and biodegradation**, v. 35, p.301–316, 1995.

DOU, J. *et al.* Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n°. 5, p. 709–715, 2010.

DOU, J. et al. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 720–729, 2008.

DOU, J.; LIU, X. HU, Z. Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 158, p. 264-272, 2008.

ENRIGHT, A. M.; COLLINS, G.; O'FLAHERTY, V. O. Low-temperature anaerobic biological treatment of toluene-containing wastewater. **Waters Research**, v. 41, p. 1465 – 1472, 2007.

EPA - Environmental Protection Agency. **Toxicological Review – Phenol integrated risk information system (IRIS)**. Washington. 2000.

ES':HAGHIA, Z.; EBRAHIMI, M.; HOSSENI, M. S. Optimization of a novel method for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in hair and waste water samples

by carbon nanotubes reinforced sol–gel based hollow fiber solid phase microextraction and gas chromatography using factorial experimental design. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3400–3406, 2011.

ESTRADA-VAZQUEZ, C.; MACARIE, H.; TAKAYUKI KATO, M. Resistencia a la exposición al oxígeno de lodos anaerobios suspendidos. **INCI**, v.26, n.11, p.547-553, 2001.

EZQUERRO, O. *et al.* Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, p.17–22, 2004.

FARHADIAN, M. *et al.* Accurate quantitative determination of monoaromatic compounds for the monitoring of bioremediation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 173-178, 2009.

FARHADIAN, M. *et al.* Biodegradation of toluene at high initial concentration in an organic–aqueous phase bioprocess with nitrate respiration. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1758–1762, 2010.

FARHADIAN, M. *et al.* Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors—A review. **Water research**, v. 42, p. 1325 – 1341, 2008.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2–14, 2007.

FERREIRA, S. L. *et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2–14, 2007.

FIELD, A. **Descobrimo a estatística usando SPSS**. 2ª ed. Porto alegre: Artmed, 2009. 688 p.

FIRMINO, P. I. M. **Remoção de cor de efluente sintético e real em sistemas anaeróbios de um e dois estágios suplementados ou não com doador de elétrons e mediador redox**. 2009. 115 f. Dissertação de Mestrado (Engenharia Civil). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.

FORTE, E. J. *et al.* Contaminação de aquíferos por hidrocarboneto: estudo de caso na vila Tubi, Porto Velho-Rondônia. **Química Nova**, v. 30, p. 1539-1544, 2007.

GAUJAC, A. *et al.* Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, p. 99–104, 2008.

GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, F. M. Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, n.º. 2, p. 176-179, 2001.

GOUFINOPOULOS, S. K.; LEKKAS, T. D.; NIKOLAU, A. D. Comparason of methods determination of volatile organic compounds in driking water. **Chemosphere**, v. 49, p. 275-84, 2001.

GUERIN, T. F. A pilot study for the selection of a bioreactor for remediation of groundwater from a coal tar contaminated site. **Journal Hazardous Materials**. v. 89, n.º. 2–3, p. 241–252, 2002.

GUIEYSSE, B. *et al.* Degradation of acenaphthene, phenanthrene and pyrene in a packed-bed biofilm reactor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n.º. 6, p. 826–831, 2000.

GUSMÃO, V. R. *et al.* BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. **Process Biochemical** v. 41, n.º. 6, p. 1391–1400, 2006.

GUSMÃO, V. R. *et al.* Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. **Journal Hazardous Materials**, v. 139 n.º. 2, p. 301–309, 2007.

GUSMÃO, Valquíria de Ribeiro. **Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo na remoção de BTEX. 2005.** 196f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.



HELENO, F. F. *et al.* Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 33, n°. 2, p. 329-336, 2010.

HELSEL, D.R.; HIRSCH, R. M. **Statistical Methods in Water Resources Techniques of Water Resources Investigations**, Book 4, chapter A3. U.S. Geological Survey, 2002. 522 p. Disponível em: < <http://pubs.usgs.gov/twri/twri4a3/#pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2011.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **DQO-CGCRE-0008: Orientação sobre validação de métodos analíticos**, Rio de Janeiro – RJ: Coordenação Geral de Acreditação, 2003.

JO, M. S. *et al.* An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1276-1284, 2008.

JOCHMANN, M. A.; YUAN, X.; SCHMIDT, T. C. Determination of volatile organic hydrocarbons in water samples by solid-phase dynamic extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 2163–2174, 2007.

KAMAL, M. A.; KLEIN, P. Estimation of BTEX in groundwater by using gas chromatography–mass spectrometry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 205–208, 2010.

KATHY RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; Smith, R. M. Use of in-tube sorptive extraction techniques for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, p. 20–26, 2007.

KERMANSHAHI P.; KARAMANEV, A.; MARGARITIS, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor. **Water Research**, v. 39, n°. 15, p. 3704–3714, 2005.

KETOLA, R. A. *et al.* Comparison of different methods for the determination of volatile organic compounds in water samples. **Talanta**, v. 44, p. 373-380, 1997.

KOLB, B. Headspace sampling with capillary columns. **Journal Chromatography A**, v. 842, p. 163-205, 1999.

KRYST, K.; KARAMANEV, D.G. Aerobic phenol biodegradation in an inverse fluidized-bed biofilm reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n°. 23, p. 5436–5439, 2001.

KUBINEC, R. *et al.* Gas chromatographic determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes using flame ionization detector in water samples with direct aqueous injection up to 250 µL. **Journal of Chromatography A**, v. 1084, p 90–94, 2005.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos - SP: Rima, 2004, 62p.

LANGWALDT, J. H.; PUHAKKA, J. A. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. **Environmental Pollution**, v. 107, n°. 2, p. 187–197, 2000.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5 ed., Campinas – SP: Editora Átomo, 2008, 360p.

LU, C.; LIN, M. R.; CHU, C. Effects of pH, moisture, and flow pattern on trickle-bed air biofilter performance for BTEX removal. **Advanced Environmental Research**. v. 6, n°. 2, p. 99–106, 2002.

MANOHAR, S.; KAREGOUDAR, T. B. Degradation of naphtalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polycrylamide. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 49, p. 785-792, 1998.

MARIANO, Jacqueline Barboza. **Impactos Ambientais do refino do petróleo**. 2001. 216f. Dissertação (Mestrado em ciências e planejamento energético) – Coordenação dos Programas de Pós-graduação em Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARTÍNEZ, S.; CUERVO-LÓPEZ, F. M.; GOMEZ, J. Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1717–1723, 2007.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S. *et al.* Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 679–687, 2009.

MASSALHA, N.; BASHERR, S.; SABBAH, I. Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 6820–6824, 2007.

MAZZEO, D E. C. *et al.* BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.

MCCARTY, P. L.; SMITH, D. P. Anaerobic waste-water treatment 4. **Environmental Science & Technology**, v. 20, n°. 12, p. 1200–1206, 1986.

MCKEOWN, R. M. *et al.* Low temperature anaerobic biotreatment of priority pollutants. **Water Science & Technology**, v. 57, n°. 4, p. 499-503, 2008.

MEHLMAN, M.A. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry. VIII. Health effects of motor fuels: carcinogenicity of gasoline-scientific update, **Environmental Research**, v. 59, p. 238–249, 1992.

MELLO, Josiane Maria Muneron. **Biodegradação dos BTEX em um reator com biofilme**. 2007. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MENÉNDEZ, J. C. F. *et al.* Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 971, p. 173–184, 2002.

MENÉNDEZ, J. C. F. *et al.* Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 415, p. 9–20, 2000.

MILHOME, M. A. L. **Emprego de quitina e quitosana para adsorção de fenol de efluente de refinaria de petróleo**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

MORLETT-CHÁVEZ, J. A. *et al.* Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 581-587, 2010.

NAKHLA, G. Biokinetic Modeling of In-Situ Bioremediation of BTX Compounds- Impact of Process Variables and Scale-Up Considerations. **Water Research**, v.37, N°.6, p.1296-1307, 2003.

NETO, M. A. F. *et al.* Emprego de reatores biológicos com fungos para remoção de compostos nitrogenados presentes em efluentes de indústrias petroquímicas. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais...Recife**: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 167-182.

NIETO, Pedro P. Diez **Desarrollo de equipos automatizados para la realización de ensayos anaerobios**. 2006. 415f. Tese de doutorado (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências, Universidade de Valladolid, Valladolid, Espanha, 2006.

OHLEN, K. *et al.* Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidizedbed reactor. **Chemosphere**, v. 58, n°. 3, p. 373–377, 2005.

OLIVEIRA, E. C. *et al.* Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. **Anais...Recife**: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 133-148.

PAIXÃO *et al.* Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: an approach to minimize environmental pollution risk. **Environmental Research**, v. 103, n°. 3, p. 365–374, 2007.

PÉRALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n° 2, p.106-110, 2005.

PÉREZ-PAVÓN, J. L. *et al.* Simultaneous determination of gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 106-111, 2007.

PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. **Advances in Agronomy**, v. 70, p. 329–357, 2001.

POETSCH, P. B.; KOETZ, P. R. Sistema de determinação da atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, nº. 3, p. 161-165, 1998.

PRUDEN, A. *et al.* Biodegradation of MTBE and BTEX in an aerobic fluidized bed reactor. **Water Science Technology**, v. 47, nº. 9, p 123–128, 2003.

QUAN, X. *et al.* Continuous removal of aromatic hydrocarbons by an AF reactor under denitrifying conditions. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 1711–1717, 2007.

RANA, S.V. VERMA, Y. Biochemical toxicity of benzene, **Journal Environmental Biology**, v. 26, p. 157–168, 2005.

REDDY, C. M.; QUINN, J. G. GC-MS analyses of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after North Cape oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 126-135, 1999.

REIMANN, C. *et al.* **Statistical Data Analysis Explained: applied environmental statistics**. Chichester, UK: Wiley: 2008. 343 p.

RIBAS, M. M. F.; MORAES, E. M.; FORESTI, E. Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, nº. 3, p. 240-246, 2007.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, nº 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na Validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, nº 1, p. 164-171, 2008.

RODIER, J. **L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduales, eaux de mer**. Volume 1, 5 ed. Paris: Dunod (Ed.), 1975. 692 p.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, 1ªed. –Campinas –SP, Casa do Pão Editora, 2005.

ROSS, S. M. **Introduction to probability and statistics for engineers and scientists**, Volume 1, 3<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Academic Press, 2004, 624 p.

SAFAROVA, V. I. *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry with headspace for the analysis of volatile organic compounds in waste water. **Journal of Chromatography B**, v. 800, p. 325-335, 2004.

SAKATA, S. K. *et al.* Development of a static headspace gas chromatographic/mass spectrometric method to analyze the level of volatile contaminants biodegradation. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 67–71, 2004.

SANTAELLA, S. T. *et al.* Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 139-148, 2009.

SHAH, M.R.; NOBLE, R.D.; CLOUGH, D.E. Pervaporation–air stripping hybrid process for removal of VOCs from groundwater. **Journal of Membrane Science**, v. 241, n°. 2, p. 257–63, 2004.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p.203-216, 2002.

SINGH, D.; FULEKAR, M. H. Benzene bioremediation using cow dung microflora in two phase partitioning bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 336-343, 2010.

SOUSA, O. L. *et al.* Tratamento biológico de águas residuárias de indústria petroquímica através de reatores aeróbios inoculados com *Cândida sp.* In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1<sup>a</sup> coletânea de trabalhos técnicos. **Anais...Recife: Editora Universitária da UFPE**, 2006. p. 149-166.

TAO, F. T. *et al.* Reverse osmosis process successfully converts oil field brine into freshwater. **Oil & Gas Journal**, v. 91, p. 88-91, 1993.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTX e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, N°. 3, p. 441-446, 2004.

TRIGUEROS, D. E. G. *et al.* Modeling of biodegradation process of BTEX compounds: Kinetic parameters estimation by using Particle Swarm Global Optimizer. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1355–1361, 2010.

TRIOLA, M. F. Introdução à Estatística. 10ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 726 p.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. P.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, nº 5, p. 1278-1287, 2009.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and applied chemistry**, v. 73, nº. 7, p. 1163–1172, 2001.

VIEIRA, P.A. *et al.* Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Jornal. Hazardous Materials**, v. 140 nº. 1–2, p. 52–59, 2007.

WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 62, p. 131–140, 2005.

WANG, Z. *et al.* Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 971, p. 173–184, 2002.

WEELINK, S. A. B.; VAN EEKERT, M. H. A.; STAMS, A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Review Environmental Science Biotechnology**, v. 9, p. 359-385, 2010.

YANG, H.; JIANG, Z.; SHI S. Aromatic compounds biodegradation under anaerobic conditions and their QSBR models. **Science of the Total Environment**, v. 358 , p. 265-276, 2006.

ZEIN, M. M. *et al.* Treatment of groundwater contaminated with PAHs, gasoline hydrocarbons, and methyl tert-butyl ether in a laboratory biomass-retaining bioreactor. **Biodegradation**, v. 17, nº. 1, p. 57–69, 2006.

## APÊNDICE A

### Testes estatísticos complementares aplicados aos conjuntos de dados de DQO e de concentrações de BTEX nos reatores anaeróbios estudados

Tabela 25 – Testes de normalidade para DQO no afluente e efluente dos reatores nas três fases experimentais.

Fase	Reator	Significância (p) ***			
		Afluente		Efluente	
		K-S*	S-W	K-S*	S-W
<b>I</b>	M	0,200**	0,364	0,200**	0,579
	N	0,200**	0,364	<u>0,013</u>	<u>0,036</u>
	S	0,200**	0,364	0,200**	0,657
<b>II</b>	M	0,161	<u>0,018</u>	0,082	<u>0,025</u>
	N	0,059	<u>0,022</u>	0,061	<u>0,041</u>
	S	0,200**	0,584	<u>0,042</u>	<u>0,009</u>
<b>III</b>	M	0,129	0,208	0,200**	0,920
	N	0,200**	0,185	0,200**	0,492
	S	0,200**	0,393	0,200**	0,966

Fonte: a autora.

Notas: \* Correção de significância de *Lilliefors*;

\*\* limite inferior da verdadeira significância.

\*\*\* as significâncias inferiores a 0,05 estão sublinhados para melhor visualização.

Tabela 26 – Testes de Levene (homogeneidade da variância) para DQO de afluentes e efluentes dos reatores nas três fases experimentais.

Fase	Significância (p)			
	Afluente		Efluente	
	Média	Mediana	Média	Mediana
<b>I</b>	1,000	1,000	0,493	0,650
<b>II</b>	0,103	0,231	0,171	0,421
<b>III</b>	0,736	0,760	0,213	0,218

Fonte: a autora.



Tabela 27 – Testes de normalidade para as concentrações dos BTEX no afluente e no efluente dos reatores na Fase II e na Fase III.

Fase	Componente	Reator	Significância (p)			
			Afluente		Efluente	
			K-S*	S-W	K-S*	S-W
<b>II</b>	BZ	M	0,200**	0,316	0,141	<u>0,008</u>
		N	0,200**	0,568	0,146	<u>0,007</u>
		S	0,119	0,156	0,124	0,301
	TO	M	0,190	0,211	0,200**	0,429
		N	0,200**	0,152	0,193	0,609
		S	0,068	0,374	0,200**	0,722
	EB	M	0,051	<u>0,009</u>	0,110	0,233
		N	0,200**	<u>0,012</u>	0,035	0,051
		S	0,090	<u>0,005</u>	<0,001	<0,001
	PX/MX	M	<u>0,036</u>	<u>0,006</u>	0,200**	0,822
		N	0,157	0,303	0,200**	0,363
		S	0,200**	0,927	0,200**	0,847
	OX	M	0,200**	0,861	0,200**	0,950
		N	0,200**	0,187	0,200**	0,304
		S	0,133	0,248	0,200**	0,893
	BTEX	M	0,200**	0,292	0,200**	0,183
		N	0,200**	0,396	<u>0,033</u>	<u>0,018</u>
		S	0,200**	0,712	<u>0,032</u>	<u>0,006</u>
<b>III</b>	BZ	M	<u>0,048</u>	0,160	0,184	0,106
		N	0,200**	0,217	0,200**	0,949
		S	0,200**	0,366	0,194	<u>0,023</u>
	TO	M	0,060	<u>0,026</u>	0,075	0,054
		N	0,200**	0,470	0,200**	0,653
		S	0,200**	0,349	0,130	0,157
	EB	M	0,200**	0,198	0,104	0,148
		N	0,200**	0,990	0,200**	0,932
		S	0,200**	0,867	0,114	0,334
	PX/MX	M	0,200**	0,381	0,065	0,114
		N	0,200**	1,000	0,200**	0,962
		S	0,200**	0,636	0,200**	0,458
	OX	M	0,200**	0,715	0,075	0,124
		N	0,200**	0,966	0,200**	0,788
		S	0,200**	0,634	0,200**	0,390
	BTEX	M	0,168	0,557	0,067	0,060
		N	0,200**	0,824	0,200**	0,906
		S	0,200**	0,604	0,182	0,200

Fonte: a autora.

Notas: \* Correção de significância de *Lilliefors*;

\*\* limite inferior da verdadeira significância.

Tabela 28 – Testes de Levene para as concentrações dos BTEX no afluente e no efluente, em relação aos três reatores na Fase II e na Fase III

Fase	Componente	Significância (p)			
		Afluente		Efluente	
		Média	Mediana	Média	Mediana
<b>II</b>	BZ	0,372	0,733	0,506	0,709
	TO	0,724	0,893	0,895	0,853
	EB	0,320	0,379	<u>0,003</u>	0,289
	PX/MX	0,381	0,478	0,391	0,411
	OX	0,419	0,549	<u>0,045</u>	0,057
	BTEX	0,777	0,894	<u>0,044</u>	0,116
<b>III</b>	BZ	0,734	0,747	0,076	0,247
	TO	0,823	0,905	0,084	0,311
	EB	0,634	0,713	0,429	0,748
	PX/MX	0,417	0,507	0,362	0,719
	OX	0,236	0,294	0,279	0,636
	BTEX	0,778	0,826	0,142	0,442

Fonte: a autora.