INCÊNDIOS DE PETRÓLEO E PETROQUÍMICOS: BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS AFETADAS

RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro – SP

Fevereiro / 2015

À minha família

Agradecimentos

Agradeço a todos que tornaram possível a realização dessa tese. Sou grato por todos os momentos e aprendizados, que ao longo dos últimos 4 anos, tive a chance de vivenciar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, com quem tenho aprendido muito desde a iniciação científica. Todo seu incentivo, sabedoria e apoio foram fundamentais para o meu caminho acadêmico e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada e ao Instituto de Biociências da UNESP, campus Rio Claro, pela oportunidade e a estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço aos professores do Departamento de Bioquímica e Microbiologia que, sem dúvida, me deram uma excelente formação e exemplo a ser seguido. Agradeço a todos pelo exemplo de caráter, ética, profissionalismo e dedicação. Agradeço aos técnicos de laboratório: Adriano, Beto, Carmen, Fátima, Inês e Luiza. Também, à Ângela, ao Ronaldo e ao Zito.

À Profa. Dra. Lisa Alvarez-Cohen, da Universidade da Califórnia em Berkeley, com quem tive a honra de trabalhar por 2 anos em seu laboratório. Agradeço também aos meus colegas e amigos de laboratório no O'Brien Hall, com os quais aprendi muito ao longo dos anos: Katie Harding, Shan Yi, Wei Zhuang, Jennifer Lawrence, Ariel Grostern, Ben Stenuit, Yujie Men, Tom Hennebel, Jannis Wenk, Mi Nguyen e Bradley Harken.

Aos amigos dos tempos de International House na Piedmont Avenue, hoje em várias universidades pelo mundo: Edwin Dollekamp, Olga Vasileva, Josh Ericcson, Louis Bur, Arthur Querou, Takuya Koyama, Raphael Cohen e Ella Grilz.

Aos estudantes e pesquisadores internacionais na Universidade da Califórnia, com os quais tive o prazer de compartilhar experiências e, principalmente, por sempre poder contar com o apoio e companhia de Adrien Serve, Sarah Wachlin, Brent Perumal, Bastian Waag, Greta Lein e Tobias Strittmatter.

À CAPES e CNPq pelo programa Ciências Sem Fronteiras que permitiram a realização dos meus estudos no exterior e ao apoio de outros alunos do programa: Mauricio Baiocco, Ana Flávia Lira e Caue Drezza.

Ao Programa de Programa de Formação de Recursos Humanos em Geologia do Petróleo e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo e Gás e de Biocombustíveis (PRH-05) pela bolsa concedida no Brasil.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela parceria e permissão em utilizar o Laboratório de Biologia Molecular (Departamento de Solos/Esalq-USP, Piracicaba). Em especial aos doutorandos Pedro Andrade e Ademir Durrer pela amizade e contribuição nas análises moleculares.

Aos meus grandes amigos Paulo Renato Matos Lopes, parceiro de laboratório e de momentos de descontração; e Filipe Marcel Fernandes Gonçalvez, amigo de longa data e pra toda a vida.

A todos os amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente (Ana Paula Justiniano, Artur Mauro, Elis Marina Turini, Érica Almeida, Gabriela Quiterio, Graziely Santos, Ivo Tamada, Jaqueline Cruz, Rubens Moraes) pela prazerosa rotina de trabalho compartilhados e eventos Lab Multi. Faço também um agradecimento a todos os alunos do departamento pela agradável convivência, pelas preocupações e pelo companheirismo.

Aos meus amigos de graduação sempre presentes: Franco Ohnuki, Rodrigo Justino, Mariana Naomi, Ives Bernardelli, Thalles Ribeiro e Luiz Felipe Carvalho. Aos meus amigos da UNESP e Rio Claro, onde já vivo por 10 anos, que tornam tudo mais divertido: Matheus Mantuanelli, Eduardo Marin-Morales, Rafael Ferreira, Rogério Botta, Lucas Fernandes Gonçalves, Diego Landi, Graziela Rossi, Rafael Rossi, Marco Barsotti, Fernandes Pereira. Também agradeço às minhas amizades de Campinas que cresceram junto comigo: Flávia Rolim e Yashmin Queiroz.

Aos meus pais, Décio e Marli, por sempre me darem apoio e conselhos em minhas decisões. Por compreenderem minha ausência durante a pesquisa em Berkeley e entenderem que ainda assim sei o quanto a presença deles é importante na minha vida. Quero que saibam que valorizo e aprecio muito os momentos em que estamos juntos.

Muito obrigado a todos que participaram da minha vida!

Água e ar, dois meios fundamentais dos quais toda a vida depende, se tornaram depósitos de lixo globais.

— Jacques-Yves Cousteau

Resumo

Dos poços e plataformas de petróleo ao transporte e distribuição de petroquímicos, sempre há o risco de acidentes que resultam em incêndios. Nesses casos são muitas vezes utilizadas espumas formadoras de filme aquoso (AFFF), pois compostos fluorados em grandes quantidades nas misturas das AFFFs contribuem com a capacidade extintora de incêndio. Em situações de emergência, toneladas de AFFF são liberadas no ambiente e, portanto, podem afetar em longo prazo o ambiente mesmo depois do incêndio ser apagado, pois contém substâncias que escoam para corpos d'água. Os flúor-carbonados são altamente resistentes à biodegradação e, por isso, têm prolongada persistência ambiental. As vias de biodegradação dos organo-halogenados são bastante específicas e lentas. Nesse estudo foi determinado o potencial de biodegradação de diferentes microbiotas sobre misturas da AFFF em hidrocarbonetos, e estudado o processo de biotransformação dos compostos presentes na formulação da AFFF. Pela combinação de metodologias foi possível conhecer melhor sobre o impacto dos compostos flúor-carbonados no ambiente. Foram realizados estudos com a técnica de espectrometria de massa, para determinar as vias de biotransformação dos componentes perfluorcarbonados; técnicas respirométricas, para estudar a biodegradabilidade da AFFF em associação com hidrocarbonetos de petróleo; bioensaios com plantas, para determinar a toxicidade da AFFF; e técnicas de biologia molecular, para análise metagenômica de alteração no perfil da comunidade microbiana de solo após a introdução da AFFF ao meio. Os hidrocarbonetos de petróleo influenciaram, durante a aplicação de espumas de incêndio, o processo de transformação de fluorcarbonados, alterando o metabolismo de comunidades microbianas. Em geral, a biotransformação de fluorcarbonados foi mais lenta por uma interferência mútua entre BTEX e AFFF, mas a produção de CO_2 foi maior pelo efeito surfactante dos compostos perfluorados combinados com a gasolina. Somado a isso, outros compostos ainda não detectados são formados a partir de AFFF quando em casos de co-contaminação com BTEX. Solos contaminados com AFFF em altas concentrações são tóxicos para plantas e alteram o perfil microbiano do solo.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos. AFFF. Perfluorados. Biodegradação. Ecotoxicidade.

Abstract

From oilrigs extraction to transport and distribution of petrochemicals, there is always the risk of accidents resulting in fires. In such cases, the release of aqueous film forming foams (AFFF) are a usual practice. These compounds are comprised of compounds containing fluorine-carbon, which contribute to their fire extinguishing capabilities when released in large amounts. Tons of AFFF are released into the environment during emergencies and thus causing long term harnessing of the environment even long after the fire is extinguished, since such substances end up in water bodies. Fluorine and carbon bonds are highly resistant to degradation and therefore have long environmental persistence. Biodegradation pathways of organic halogens are quite specific and slow. In this study, we determined the potential microbiota in different biodegradation AFFF mixtures of hydrocarbons, and studied the biotransformation of compounds in the formulation of AFFF. Thus, it was possible to better understand the impact of fluorinated compounds into the environment. A wide variety of techniques was applied, involving a combination of mass spectrometry techniques to determine the biotransformation pathways of perfluorcarbonados components; respirometric techniques to study the biodegradability of AFFF in association with petroleum hydrocarbons; bio-assays to determine the phyto-toxicity of AFFF; and molecular biology techniques for metagenomic analyzes evaluating changes in the profile of soil microbial communities after AFFF was introduced in the medium. It was observed that petroleum hydrocarbons during application of fire foams fluorocarbon influenced the overall biotransformation process, altering the metabolism of the microbial communities. In general, the fluorocarbon biotransformation is slower by a mutual interference between AFFF and BTEX, but the CO_2 production is increased by the effect of the perfluorinated surfactant combined with the petrochemical compounds. In addition to this, other unknown compounds are still formed from AFFF in co-contamination with BTEX. AFFF soils contaminated with high concentrations are toxic to plants and profound microbial changes were detected in the microbial soil profile.

Keywords: Hydrocarbons. AFFF. Perfluorinated compunds. Biodegradation. Ecotoxicity.

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação artística do grande incêndio em Roma em 64 A.C. a partir de quando as primeiras medidas de proteção a incêndio registradas foram tomadas no planejamento urbano..... 28
Figura 2 – Incêndio em plataforma de petróleo de Montara na Austrália em 2009 e na refinaria de El Palito na Venezuela em 2012..... 32
Figura 3 – Principais compradores das espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) nos EUA..... 37
Figura 4 – Esquema da aplicação da AFFF na ponta de uma mangueira de incêndio com o efeito Venturi para mistura de soluções e formação de espuma... 40
Figura 5 – Processo de extinção de incêndio em líquidos com o uso da AFFF..... 41
Figura 6 – Vetores de espalhabilidade pela tensão superficial em gota de líquido com em uma superfície sólida..... 43
Figura 7 – Fases da mistura de ar, solução de surfactante aquosa e hidrocarbonetos..... 45
Figura 8 – Surfactantes perfluorados presentes na formulação das AFFFs..... 48
Figura 9 – Surfactantes fluortelomerados presentes na formulação das AFFFs... 49
Figura 10 – Estrutura dos ácidos carboxílicos perfluorados (PFCA) e dos ácidos sulfônicos perfluorados (PFSA)..... 51
Figura 11 – Estrutura química de perfloroctano sulfonados (PFOS) e perfluoroctanoatos (PFOA)..... 53
Figura 12 – Resumo da nomenclatura usual para fluorcarbonados e suas rotas de degradação..... 57
Figura 13 - Fabricantes de espumas de incêndio e seu histórico de produção para os militares nos EUA..... 60
Figura 14 – Liberação de grandes volumes de AFFF durante incêndio do avião da China em Okinawa (Japão) em 2007..... 65
Figura 15 - Combate ao incêndio ocorrido na Replan usando espumas extintoras do tipo AFFF..... 67
Figura 16 – Exposição inadequada à AFFF após incêndio em hangar no aeroporto de Long Beach, EUA em 1998 pode ser uma das fontes de contaminação..... 69

Figura 17 - Vias de degradação aeróbia de 6:2 FTOH em lodo ativado e solo. As setas duplas indicam múltiplos passos de biotransformação. As reações de defluoração são indicados por liberação de íons de flúor (F^-). Vias em azul foram apenas observadas em solo (Liu et al., 2010), enquanto vias em vermelho foram apenas observadas no lodo (Wang et al., 2011). Compostos estáveis e semi-estáveis são mostrados dentro de retângulos tracejados..... 76
Figura 18 - Vias de biotransformação aeróbia proposta para 6:2 FtS. As setas duplas indicam vários passos de transformação..... 77
Figura 19 – Estrutura química dos compostos na mistura de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX)..... 83
Figura 20 – Estruturas de compostos precursores padrões usados nos experimentos que são encontrados em formulações de AFFF..... 86
Figura 21 – Imagem de satélite da antiga área de treinamento de incêndio na base da força aérea Ellsworth. Foram marcadas a área de coleta onde eram realizados os treinamentos de incêndio, local das plumas de benzeno e os locais de remediação ambiental, contendo barreiras para as plumas e poços de aeração..... 87
Figura 22 – Imagem de satélite dos tanques de armazenamento da Replan. Foi marcada a área de coleta onde eram historicamente ocorreu o grande incêndio de 1993..... 89
Figura 23 – Frascos de 160 mL utilizados nos experimentos..... 91
Figure 24 – Esquema de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo único (Q1)..... 94
Figura 25 – Modelo conceitual de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo único (Q1)..... 95
Figura 26 – Monitoramento de único íon (SIM)..... 97
Figura 27 – Quadrupolo único funcionando em modo *full scan* MS..... 98
Figura 28 – Íons fragmento em um MS de quadrupolo único..... 99
Figura 29 - Esquema de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo triplo (Q3). A célula de colisão é usualmente considerada um quadrupolo (Q2)..... 100
Figura 30 – Modelo conceitual de um espectrometro de massa de quadrupodo triplo. No modo SIM, Q1 e Q3 são definidos para um m / z especificado,

enquanto que em *full scan* MS Q1 é mantido em um m / z especificado e Q3 escaneia completamente as amostras..... 101
Figura 31 – Monitoramento de multiplas reações (MRM)..... 102
Figura 32 - Cromatógrafo líquido associado a espectrômetro de massa com quadrupolo triplo utilizado nos experimentos..... 104
Figura 33 – Reação de Precursores Oxidativos Totais com quebra das moléculas pelo radical hidroxila..... 110
Figura 34 – Cromatógrafo gasoso GC-FID Agilent 7890A..... 111
Figura 35 – Cromatografia gasosa de BTEX. Os picos de resposta indicam diferentes substâncias com base nos diferentes tempos de retenção, sendo 4,2 minutos para benzeno, 5,2 minutos para tolueno, 6,1 minutos para etil-benzeno e 6,5 minutos para o-xileno..... 112
Figura 36 – Curva de calibração para componentes do BTEX..... 113
Figura 37 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco FC+ durante o monitoramento da biodegradação. As linhas laranja indicam os períodos em que benzeno que foi adicionada a cada enriquecimento da cultura. A concentração adicionada ao meio é indicada pelos números acima das linhas verticais (FC+: Controle de AFFF contendo BTEX)..... 117
Figura 38 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco MC+ durante o monitoramento da biodegradação. As linhas laranja indicam os períodos em que benzeno que foi adicionada a cada enriquecimento da cultura. A concentração adicionada ao meio é indicada pelos números acima das linhas verticais (MC+: Controle do meio contendo BTEX)..... 118
Figura 39 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco AC+ durante o monitoramento da biodegradação. (AC+: Controle autoclavado contendo BTEX)..... 119
Figura 40 - Concentração de benzeno nos ensaios de biodegradação com solo A (SCA+: Controle de solo A, LVA+: Ensaio de biodegradação com solo A)..... 120
Figura 41 - Concentração de benzeno nos ensaios de biodegradação com solo B (SCB+: Controle de solo B, LVB+: Ensaio de biodegradação com Solo B)..... 120
Figura 42 – Cromatografia dos ensaios anaeróbios de biodegradação contendo BTEX LVA+ em condições de redução de nitrato..... 122

Figura 43 – Formação de PFCAs em microcosmos aeróbios a partir de Lodyne em cadeias carbônicas perfluoradas de 4 a 8 carbonos - (n) indica o número de carbonos perfluorados na cadeia..... 123
Figura 44 - Compostos fluorcarbonados telomerados encontrados em AFFF produzido pela Ansul..... 126
Figura 45 - Principal via metabólica de biodegradação de 6:2 FtTAoS (Lodyne).. 126
Figura 46 - Concentração de 6:2 FtTAoS (principal componente de Lodyne) nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC-: Controle de AFFF, AC-: Controle autoclavado, LVA-: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB:Ensaio de biodegradação com solo B)..... 128
Figura 47 - Concentração de 6:2 FtTAoS (principal componente de Lodyne) nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA+: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB+: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 128
Figura 48 - Concentração de 6:2 FtS nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 130
Figura 49 - Concentração de 6:2 FtS nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 131
Figura 50 - Concentração de PFHxA nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 132
Figura 51 - Concentração de PFHxA nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 132
Figura 52 - Concentração de 6:2 FtTAoS e 6:2 FtS nos ensaios anaeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX..... 133

Figura 53 – Concentração de Lodyne nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) e com solo B (LVB) no tempo iniciail (T0) e final (T95) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX..... 134
Figura 54 - Concentração dos produtos de biotransformação nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) e com solo B (LVB) no tempo iniciail (T0) e final (T95) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX..... 135
Figura 55 - Concentração dos precursores totais oxidativos nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) no tempo inicial (0) e final (90) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX..... 137
Figura 56 - Concentração constante de NO_3 nos ensaios anaeróbios em condição redutora de nitrato, indicando baixa ou nenhuma atividade metabólica nos frascos contendo BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado e LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 140
Figura 57 – Concentração de CH_4 nos ensaios anaeróbios em condição metanogênica, indicando baixa ou nenhuma atividade metabólica nos frascos contendo BTEX (FC: Controle de AFFF, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B)..... 141
Figura 58 - Concentração de O_2 nos ensaios MC+ (controle do meio) e LV+ (biodegradação) em solo A..... 142
Figura 59 - Concentração de benzeno em ensaios contendo Lodyne sem butil carbitol em controle autoclavado (AC), controle de AFFF (FC) e ensaio de biodegradação em solo A (LVA) e B (LVB)..... 144
Figura 60 – Estrutura química do dietileno glicol butil éter (butil carbitol)..... 146
Figura 61 – Imagem de satélite do Jardim Experimental (dentro da área do retângulo amarelo) – IB / UNESP, campus Rio Claro..... 149
Figura 62 - Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990). A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm)..... 151

Figura 63 – Galão de AFFF contendo a solução utilizadas nos experimentos de respirometria..... 152
Figura 64 – Proporção de BTEX em gasolina e componentes individuais de BTEX..... 153
Figura 65 – Curva de calibração de CO_2 em função da condutividade em solução 0,2 M de KOH..... 157
Figura 66 - Produção de CO_2 semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina)..... 160
Figura 67 – Moléculas surfactantes presentes na formulação de AFFF Sintex e Ansul..... 163
Figura 68 - Produção de CO_2 semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina) ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009)..... 166
Figura 69 - Produção de CO_2 acumulada pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina) ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnolli et al. (2014)..... 167
Figura 70 - Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação previsto pelos dois modelos para os dados de produção de CO_2. BRminT – semanal (Membré et al., 1996); BmaxT – acumulada (Schmidt et al., 1985)..... 169
Figura 71 – Amostras sendo enterradas no Jardim Experimental – IB / UNESP, campus Rio Claro..... 175
Figura 72 – Sementes de alface utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade (tempo zero) dentro das placas de Petri..... 177
Figura 73 – Montagem dos ensaios de toxicidade..... 178
Figura 74 – Semente de pepino e estruturas medidas..... 180
Figura 75 – Disposição dos dados em um ambiente tridimensional dadas 3 variáveis (x, y e z)..... 181
Figura 76 – Mapa de triangulação dos dados nos eixos x,y..... 182
Figura 77 – Linha de contorno traçada na lateral da pirâmide de triangulação dos dados..... 183
Figura 78 – Linhas de contorno traçadas em vários planos em que *open contour*: contorno aberto, *close contour*: contorno fechado e *intersection*: intersecção..... 183

Figura 79 – Germinação de alface em AFFF em diferentes concentrações. A região A mostra a maior germinação na concentração de 1% em 60 dias. As regiões de menor e maior germinação são indicadas pela letra B e C respectivamente..... 185
Figura 80 – Crescimento de alface em AFFF em bioensaios de toxicidade..... 187
Figura 81 – Inibição relativa do crescimento de alface por AFFF em bioensaios de toxicidade..... 187
Figura 82 - Germinação de alface em AFFF em diferentes concentrações. A região A menor germinação na concentração de 0,1% no tempo inicial. A região de menor e maior germinação é indicada pela letra B..... 188
Figura 83 – Crescimento de rúcula em AFFF em bioensaios de toxicidade..... 189
Figura 84 - Inibição relativa do crescimento de rúcula por AFFF em bioensaios de toxicidade..... 190
Figura 85 – Visão geral da bioacumulação da AFFF..... 192
Figura 86 - Pares de base adenina-timina (a) e guanina-citosina (b). As ligações de hidrogênio são mostradas dentro dos círculos em vermelho..... 199
Figura 87 – Visão geral da técnica de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE)..... 200
Figura 88 – Equipamento para registro fotográfico do gel de agarose em lux UV. 204
Figura 89 – Equipamento para eletroforese em gel de DGGE..... 205
Figura 90 – Eletroforese da extração de DNA de solo em gel de agarose (C: controle sem solo)..... 207
Figura 91 - Eletroforese da primeira reação de PCR e da segunda reação de PRC em gel de agarose (C: controle, M: marcador molecular Gene Ladder para 1000 kb). As setas indicam as bandas de produtos da primeira reação de PCR em excesso e produtos da segunda reação de PCR..... 208
Figura 92 - *Amplicons* do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Poliacrilamida 6,0%; gradiente desnaturante 45-65%; TAE 0,5 x; 60º C; 90 volts; 16 horas (M: marcador molecular Gene Ladder para 1000 kb, C0: controle sem AFFF no tempo inicial, C60: controle sem AFFF após 60 dias, 0,1x, 1x e 10x: amostras com concentrações diferentes de AFFF)..... 209

Figura 93 – Detalhe dos a*mplicons* do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Cada uma das setas indica bandas de grupos específicos de bactérias encontrados no solo contaminado por hidrocarbonetos e AFFF..... 210
Figura 94 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA)..... 211

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação de tipos de incêndio baseados no material..... 31
Tabela 2 – Composição das espumas de incêndio..... 36
Tabela 3 – Composição media da AFFF Ansul 6% (AFC-3)..... 39
Tabela 4 – Comparação entre os tipos de AFFF baseados no modo de produção 58
Tabela 5 - Conteúdo dos frascos controle nos ensaios aeróbios e anaeróbios..... 92
Tabela 6 – Componentes dos padrões de calibração e quantificação utilizados nos frascos de LC-MS / MS..... 103
Tabela 7 – Transições monitoradas por espectrometria de massa durante a biotransformação de AFFF..... 106
Tabela 8 – Distribuição no ambiente de butil carbitol..... 146
Tabela 9 – Ensaios de respirometria realizados..... 153
Tabela 10 - Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos, após 105 dias..... 161
Tabela 11 - BRminT, Bmax, BmaxT e R^2 dos modelos matemáticos ajustados às produções semanal e acumulada de CO_2..... 168
Tabela 12 - Amostras de solo para análises toxicológicas e metagenômicas..... 180
Tabela 13 - Amostras de solo para realização de análises moleculares..... 198
Tabela 14 - Lista de *primers* utilizados para amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total..... 202
Tabela 15 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR..... 203
Tabela 16 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR..... 203

Lista de Abreviaturas

Compostos fluorcarbonados

AFFF	Espuma formadora de filme aquoso
PFC	Composto poli- ou per- fluorado
LGE	Líquido gerador de espuma
PFAS	Substância poli- ou per- fluoralquilada
FTOH	Alcoól fluotelomerado
Perfluoralquil Sulfonamido Aminas	
PFBSaAm	N,N-dimetil-3-{[(trideca-perfluorobutil)sulfonil]amino}propan-1-amino
PFPeSaAm	N,N-dimetil-3-{[(trideca-perfluoropentil)sulfonil]amino}propan-1-amino
PFHxSaAm	N,N-dimetil-3-{[(trideca-perfluorohexil)sulfonil]amino}propan-1-amino
PFHpSaAm	N,N-dimetil-3-{[(trideca-perfluoroheptil)sulfonil]amino}propan-1-amino
PFOSaAm	N,N-dimetil-3-{[(trideca-perfluorooctil)sulfonil]amino}propan-1-amino
Perfluoralquil Sulfonoamido Amino Carboxilados	
PFBSaAmA	3-(N-(2-carboxietil)-trideca-perfluorobutilsulfonamido)-N,N-dimetilpropan-1-amino
PFPeSaAmA	3-(N-(2-carboxietil)-trideca-perfluoropentilsulfonamido)-N,N-dimetilpropan-1-amino
PFHxSaAmA	3-(N-(2-carboxiethil)-trideca-perfluorohexilsulfonamido)-N,N-dimetilpropan-1-amino
PFHpSaAmA	3-(N-(2-carboxyetil)-trideca-perfluoroheptilsulfonamido)-N,N-dimetilpropan-1-amino
PFOSaAmA	3-(N-(2-carboxiethil)-trideca-perfluorooctilsulfonamido)-N,N-dimetilpropan-1-amino
Perfluoralquil sulfonados	
PFBS	Acido perfluorbutano sulfônico
PFPeS	Ácido perlfuorpentano sulfônico
PFHxS	Ácido perlfuorhexano sulfônico
PFHpS	Ácido perlfuorheptano sulfônico
PFOS	Ácido perfluoroctano sulfônico
PFNS	Perfluornonano sulfonato
PFDS	Perfluordecano sulfonato
N-EtFOSA	N-etil perfluorooctano sulfonamido
N-EtFOSAA	N-etil perfluorooctano sulfonamido acetato
N-EtFOSE	N-etil perfluorooctano sulfonamidoetanol
MeFOSA	N-metil sulfonamido perfluoroctano
MeFOSE	N-metil sulfonamidoetanol perfluoroctano
Perfluoralquil carboxilados	
PFBA	Ácido perfluorbutanóico
PFPeA	Ácido perfluorpentanóico
PFHxA	Ácido perfluorhexanóico

PFHpA	Ácido perfluorheptanóico
PFOA	Ácido perfluoroctanóico
PFNA	Ácido perfluornonanóico
PFDA	Ácido perfluordecanóico
PFUdA	Ácido perfluorundecanóico
PFDoA	Ácido perfluordodecanóico
PFTrA	Ácido perfluortridecanóico
Fluortelômero sulfonados	
FtTAoS	Fluotelômero tioamido sulfonados
$FtTHN^+$	Fluotelômero tiohidroxi amônias
FtSaAm	Fluotelômero sulfonoamido aminas
FtS	Fluotelômero sulfônico
Fluortelômero betaínas	
FtSaB	Fluotelômero sulfonoamido amina
FtB	Fluotelômero betaína

Equações

S	Coeficiente de espalhamento
σ_{sv}	Tensão superficial entre sólido e vapor (liquido de baixo)
σ_{sl}	Tensão superficial entre sólido e líquido (liquido de cima)
σ_{lv}	Tensão superficial entre liquivo e vapor (entre os dois líquidos)
M	Massa do composto aromático volátil adicionada
S_{liq}	Concentração na fase líquida
V_{liq}	Volume na fase líquida
S_{gas}	Concentração na fase gasosa
V_{gas}	Concentração na fase gasosa
H_c	Constante de Henry específica para o composto
GCO_2	Geração de gás carbônico
A	Volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação do branco
B	Volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação da amostra
$\theta_{(HCl)}$	Fator do HCl 0,1 N
B	CO_2 Produzido
Bmax	Produção máxima de CO_2
Bo	Produção inicial de CO_2
r	Taxa máxima de produção especifica para determinado óleo
K1	Constante de Aumento de Produção
K2	Constante de Diminuição de Produção
m1	Taxa de Aumento na Produção de CO_2
m2	Taxa de Diminuição na Produção de CO_2
t	Tempo

BRminT	Tempo estimado para o término da biodegradação
Bmax	Valor máximo de biodegradação previsto
BmaxT	Tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto
SGa	Número total de sementes germinadas
SGt	Número total de sementes na placa de Petri
SGc	Numero total de sementes germinadas no controle negativo
CMc	Comprimento médio da raiz ou hipocótilo no controle negativo
Ca	Comprimento médio da amostra analisada

Ensaios e grupos de experimento

Capítulo 1

MC-	Controle do meio sem BTEX
MC+	Controle do meio com BTEX
FC-	Controle da AFFF sem BTEX
FC+	Controle da AFFF com BTEX
SCA-	Controle do solo A sem BTEX
SCA+	Controle do solo A com BTEX
SCB-	Controle do solo B sem BTEX
SCB+	Controle do solo B com BTEX
ACA-	Controle autoclavado do solo A sem BTEX
ACA+	Controle autoclavado do solo A com BTEX
ACB-	Controle autoclavado do solo B sem BTEX
ACB+	Controle autoclavado do solo B com BTEX
LVA-	Ensaio de biodegradação com solo A sem BTEX
LVA+	Ensaio de biodegradação com solo A com BTEX
LVB-	Ensaio de biodegradação com solo B sem BTEX
LVB+	Ensaio de biodegradação com solo B com BTEX

Capítulo 2

C	Controle
F	Controle da AFFF
G	Controle da gasolina
B	Ensaio completo de biodegradação

Capítulo 3

C0	Controle de solo no tempo inicial
C60	Controle de solo em 60 dias
C120	Controle de solo em 120 dias
F0 0,1x	AFFF em solo na concentração 0,1x no tempo inicial
F60 0,1x	AFFF em solo na concentração 0,1x em 60 dias
F120 0,1x	Controle da AFFF em solo na concentração 1x em 120 dias
F0 1x	AFFF em solo na concentração 1x no tempo inicial

F60 1x	AFFF em solo na concentração 1x em 60 dias
F120 1x	Controle da AFFF em solo na concentração 10x em 120 dias
F0 10x	AFFF em solo na concentração 10x no tempo inicial
F60 10x	AFFF em solo na concentração 10x em 60 dias
F120 10x	Controle da AFFF em solo na concentração 10x em 120 dias
Capítulo 4	
C0	Controle de solo sem AFFF no tempo inicial
C60	Controle de solo sem AFFF em 60 dias
0,1x	AFFF em solo na concentração 0,1x em 60 dias
1x	AFFF em solo na concentração 1x em 60 dias
10x	AFFF em solo na concentração 10x em 60 dias
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo

Metodologias

ANOVA	Análise de variância
API	Ionização à pressão atmosférica
APS	Persulfato de amônia
BTEX	Mistura de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno
DC	Corrente contínua
DGGE	Gel de eletroforese em gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
E_{24}	Índice de emulsificação E_{24}
FAB	Bombardeamento rápido de átomos
FID	Detector por chama ionizante
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida em alta pressão
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução
IC	Cromatografia iônica
LC	Cromatografica líquida
LVI	Injeção de baixo volume
MRM	Monitoramento de múltiplas reações
MS	Espectrometria de massa
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEEK	Polieteretercetona
POT	Precursores Totais por Oxidação
PTFE	Politetrafluoretileno

Q1	Quadrupolo único
Q3	Quadrupolo triplo
RF	Radio frequência
SIM	Monitoramento de íon único
SPE	Extração de fase sólida
TCD	Detector por condutividade térmica
TES	Ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfonico
UV-Vis	Ultravioleta e visível

Locais e Organizações

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ICAO	Organização Internacional de Aviação Civil
NFPA	Associação Americana de Proteção a Incêndios
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
Replan	Refinaria de Paulínia
UCB	Universidade da Califórnia – Berkeley
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USEPA	Agencia de Proteção Ambiental Americana
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1. Revisão de Literatura..... 26
1.1. Histórico da proteção contra incêndios..... 26
1.2. Classes de incêndio..... 30
1.3. Incêndios da indústria petroquímica..... 32
1.4. Espumas extintoras de incêndio..... 33
1.5. Espumas formadoras de filme aquoso (AFFF)..... 38
1.5.1. Aplicação da AFFF..... 39
1.5.2. Espalhamento..... 42
1.6. Compostos fluorados nas espumas de incêndio..... 46
1.6.1. Substâncias perfluoralquiladas (PFAS)..... 50
1.6.2. Substâncias fluortelomeradas..... 51
1.6.3. Produto final de degradação (PFOA e PFOS)..... 53
1.6.4. Métodos analíticos recentes..... 54
1.6.5. Resumo sobre a nomenclatura dos PFCs..... 56
1.7. Produção de AFFF..... 58
1.7.1. Principais fabricantes..... 60
1.8. Liberação da AFFF no ambiente..... 63
1.8.1. Caso do incêndio no Brasil (Replan-SP)..... 66
1.8.2. Bioacumulação e Toxicidade da AFFF..... 68
1.9. Regulamentação do uso de AFFF..... 71
1.10. Biodegradabilidade de AFFF..... 72
1.11. Desafios no estudo da AFFF e seus compostos..... 78
2. Objetivos..... 80
2.1. Objetivos Gerais..... 80
2.2. Objetivos Específicos..... 80
3. Capítulo 1 - Biotransformação de AFFF em meio contendo BTEX..... 82
3.1. Introdução..... 82
3.1.1. Motivação..... 84
3.2. Metodologia..... 86
3.2.1. Materiais..... 86
3.2.2. Amostras de solo..... 87

3.2.2.1. Base da Força Aérea Americana em Ellsworth (EUA)..... 87
3.2.2.2. Refinaria de petróleo da Petrobras em Paulínia (Brasil)..... 88
3.2.3. Local de estudo e experimentos..... 89
3.2.4. Montagem dos ensaios..... 90
3.2.4.1. Manutenção das culturas aeróbias e anaerobióbias..... 92
3.2.5. Biotransformação de AFFF..... 93
3.2.5.1. Preparo das amostras e extração de AFFF..... 93
3.2.5.2. Como funciona o LC-MS / MS..... 94
3.2.5.2.1. Espectrometria de massa com quadrupolo único..... 94
3.2.5.2.2. Espectrometria de massa com quadrupolo triplo..... 99
3.2.5.3. Monitoramento da biotransformação de AFFF por LC-MS / MS..... 103
3.2.5.4. Determinação de produtos de biotransformação..... 105
3.2.5.5. Ensaios complementares de precursores oxidativos totais (POT)... 109
3.2.6. Biodegradação de BTEX..... 110
3.2.6.1. Cromatografia gasosa com detector de chama ionizada (GC-FID).. 110
3.2.7. Monitoramento dos processos aeróbios e anaeróbios..... 114
3.2.7.1. Cromatografia iônica (IC)..... 114
3.2.7.2. Produção de O_2 e metanogênese..... 114
3.2.7.3. pH..... 115
3.3. Resultados e Discussões..... 116
3.3.1. Biodegradação de BTEX..... 116
3.3.2. Biotransformação de AFFF..... 124
3.3.2.1. Análise qualitativa da via metabólica..... 124
3.3.2.2. Análise quantitativa da biotransformação..... 127
3.3.3. Produtos de biotransformação e ensaios POT..... 134
3.3.4. Dados complementares de IC e GC-TCD..... 139
3.3.5. Interação entre AFFF e BTEX..... 142
4. Capítulo 2 - Respirometria de solo com AFFF e gasolina..... 145
4.1. Introdução..... 145
4.1.1. Motivação..... 147
4.2. Metodologia..... 148
4.2.1. Preparo dos reagentes..... 148
4.2.2. Coleta do solo..... 149

4.2.3. Montagem dos ensaios..... 149
4.2.4. Método tradicional por titulação..... 154
4.2.5. Novo método por condutividade..... 156
4.2.6. Modelagem matemática..... 158
4.3. Resultados e Discussões..... 160
4.3.1. Modelagem matemática e biodegradação prevista..... 165
5. Capítulo 3 - Fito-toxicidade de AFFF..... 171
5.1. Introdução..... 171
5.1.1. Motivação..... 172
5.2. Metodologia..... 174
5.2.1. AFFF Utilizado..... 174
5.2.2. Solo Utilizado..... 174
5.2.3. Primeiro grupo de experimentos..... 174
5.2.4. Segundo grupo de experimentos..... 175
5.2.5. Como funcionam os bioensaios de toxicidade..... 176
5.2.5.1. Germinação e crescimento..... 178
5.2.5.2. Crescimento de raiz e hipocótilo..... 180
5.2.6. Análise dos resultados..... 181
5.3. Resultados e Discussões..... 184
5.3.1. Toxicidade das diluições de AFFF..... 184
5.3.2. Alface (*Lactuca sativa*)..... 184
5.3.3. Rúcula (*Eruca sativa*)..... 188
5.3.4. Fito-toxicidade de AFFF e bioacumulação..... 190
6. Capítulo 4 - Metagenômica de solo com AFFF..... 194
6.1. Introdução..... 194
6.1.1. Motivação..... 196
6.2. Metodologia..... 198
6.2.1. Local de estudo..... 198
6.3. Como funciona a metagenômica por DGGE..... 198
6.3.1. Extração de DNA total das amostras de solo..... 201
6.3.2. Amplificação de genes específicos do DNA extraído por PCR..... 202
6.3.3. Análise da estrutura da comunidade microbiana por PCR-DGGE..... 204
6.3.4. Análises estatísticas..... 206

6.4. Resultados e Discussões..... 207
6.4.1. Extração de DNA e PCR..... 207
6.4.2. Análise da estrutura da comunidade microbiana por DGGE..... 209
7. Conclusões..... 214
8. Referências bibliográficas..... 216

Apêndice A – Dados de LC-MS / MS..... 254
Apêndice B – Dados de GC-FID..... 259
Apêndice C – Dados de respirometria..... 262
Apêndice D – Dados de fito-toxicidade..... 263
Anexo - Especificação técnica da AFFF pelo fabricante..... 264

1. Revisão de Literatura

1.1. Histórico da proteção contra incêndios

O primeiro poço de petróleo comercialmente viável e bem sucedido foi perfurado em agosto de 1859, em Titusville (*Oil Creek*), Pensilvânia (EUA), por Edwin Drake, embora este fato seja debatido pelos registros históricos de poços pioneiros construídos em 1853 na Polônia. O poço de petróleo construído por Drake pegou fogo e alguns danos na sua estrutura afetaram seu funcionamento, pouco depois do início de sua operação. Mais tarde, em 1861, um outro poço de petróleo em *Oil Creek*, perto do poço de Drake, pegou fogo. O incêndio se espalhou por uma área ocupada, queimando durante três dias e causando 19 mortes (KNOWLES, 1983). Uma das primeiras refinarias de petróleo na área, Acme *Oil Company*, também sofreu com um grande incêndio em 1880, da qual a empresa nunca se recuperou, sendo decretada sua falência (TIPPET, 2013).

Foi nesse contexto que, em 1863, o estado da Pensilvânia passou as primeiras leis antipoluição para a indústria petrolífera. Estas leis foram aprovadas para a evitar a liberação de petróleo bruto em cursos de água ao lado de áreas de produção de petróleo. Em outro campo de petróleo, o *Spindletop*, famoso pela icônica liberação de petróleo jorrando como um chafariz, sofreu um incêndio causado por um indivíduo fumante, pouco cuidadoso, nas proximidades. A partir desse incêndio iniciaram-se vários outros focos de incêndios em uma catástrofe que durou uma semana, apenas três anos após a descoberta do reservatório. Grandes incêndios, como os que

ocorreram em *Spindletop,* surgiram na indústria petroquímica quase todos os anos após a sua produção inicial (NOLAN, 1996).

De acordo com registros históricos, os incêndios de hidrocarbonetos eram bastante comuns nos primeiros campos de petróleo. Estes incêndios ocorreram a partir de falhas humanas, desastres naturais, ou de queima deliberada e extensa do, até então, invendável gás natural. Incêndios de hidrocarbonetos eram aceitos como eventos comuns da indústria onde geralmente eram feitos pequenos esforços para conter a sua existência (MACDONALD, 1990).

Desde o início da indústria do petróleo, a quantidade de incêndios, as explosões e a poluição ambiental que surgiu a partir dela cresceu proporcionalmente ao desenvolvimento do setor (WILLIAMS; OLANIRAN, 1994). Conforme a indústria do petróleo crescia, aumentava também a magnitude de seus acidentes. Eventos relativamente recentes, como o derramamento de óleo da Exxon Valdez em 1989 (BRADDOCK et al., 1995) ou a explosão no duto da Deepwater Horizon da British Petroleum em 2010 (ROBERTSON; KRAUSS, 2010) demonstraram o impacto financeiro extremo que esses acidentes podem causar.

Após o incêndio catastrófico que queimou a Roma antiga, em 64 A.C., o imperador Nero reconstruiu a cidade e estabeleceu políticas de precauções contra incêndios, que incluía amplas avenidas públicas, limitações em alturas de construção, criação de estruturas à prova de fogo e melhorias para o abastecimento de água da cidade para ajudar no combate a incêndios (Figura 1). Assim, é muito evidente que os requisitos modernos de proteção básicos contra incêndios, tais como a limitação de suprimentos combustíveis (construção à prova de fogo), remoção das fontes disponíveis de ignição (avenidas largas e alturas de edifícios limitados para evitar o carregamento de brasas pelo vento) e criação de um mecanismo local de controle e supressão do fogo (abastecimento de água) têm sido essencialmente aplicados desde a antiguidade (NOLAN, 1996).

Incrivelmente, "Heron de Alexandria", o escritor técnico da antiguidade (cerca de 100 A.C.), descreve em seus diários um mecanismo de bombeamento de dois cilindros com um bico flexível e direcionador de jatos para combater incêndios. O mecanismo é muito parecido com um sistema romano de bombeamento de água em exposição no Museu Britânico, em Londres (BLACK, 2014). Dispositivos similares também foram usados no século XVIII e XIX na Europa e Américas, para fornecer água em situações de incêndio. Existem, portanto, evidências consideráveis que a

sociedade de um modo geral tentou evitar ou atenuar os efeitos dos incêndios, reconhecidamente, após grandes acidentes (DE CAMP, 1986).

Figura 1 – Representação artística do grande incêndio em Roma em 64 A.C. a partir de quando as primeiras medidas de proteção a incêndio registradas foram tomadas no planejamento urbano. Fonte: pintura por Francisco Gutiérrez Cabello, pintor barroco espanhol do século XVI, reproduzido do website do Museo del Prado (2015).

A indústria petroquímica foi por muito tempo relutante em investir capital onde um retorno direto e imediato sobre o investimento para a empresa não era óbvio, como faria qualquer empresa. Além disso, perdas financeiras nas indústrias de petróleo causadas por incêndio eram relativamente pequenas até cerca de 1950, quando comparadas aos altos lucros da época. Isto era devido ao tamanho pequeno das instalações e o valor baixo de óleo e gás comparados ao volume total de produção (TUGNOLI et al., 2012).

Até 1950, um incêndio ou explosão cujas perdas somaram mais de cinco milhões de dólares não haviam ocorrido na indústria de refino nos EUA. Também neste período, o grande fluxo de capital para a exploração de petróleo e produção

offshore estavam apenas começando. O uso de gás natural também era bastante limitado no início do século. Consequentemente, seu valor também era muito baixo. Normalmente, a produção de gás era imediatamente queimada ou o poço era tampado e considerado como um reservatório inexplorável economicamente. Dado que o manuseio de gás era limitado, grandes explosões de vapor eram relativamente raras e a destruição catastrófica por incidentes de petróleo era algo pouco comum (TOWLER; SINNOTT, 2013). Os gastos da indústria do petróleo com dispositivos de segurança eram tradicionalmente o mínimo exigido pelos regulamentos governamentais. Assim, o desenvolvimento de filosofias e práticas de prevenção de perdas, portanto, não foi efetivamente desenvolvido dentro da indústria desde seu início.

Nos primórdios da indústria do petróleo, os recursos para segurança em caso de incêndio ou proteção contra explosão eram limitados. Isso é evidente pela quantidade de explosões e incêndios na época. A indústria ficou conhecida como uma operação "de risco", não só com relação ao retorno econômico, mas também quanto à segurança (perda de vidas e destruição de propriedade) e até mesmo seus impactos ambientais (EMMONS, 1985), embora o conceito de ecologia ainda não fosse bem compreendido na época.

Somente nas últimas décadas as medidas de proteção contra incêndio e explosão foram bem compreendidas e aceitas pela maioria das indústrias como uma medida de melhoramento operacional, simplesmente pelo fato de proteger a instalação contra a destruição (PASMAN; SUTER, 2005). Um exemplo de como o princípio da boa prática de segurança equivale a boas práticas operacionais é a instalação de válvulas de isolamento de emergência na entrada e saída de dutos. Em caso de emergência, elas servem para isolar o fornecimento de combustível para uma área em chamas e, portanto, limitar os danos. Em teoria, eles poderiam também servir como uma maneira adicional de isolamento de uma instalação para manutenção de suas atividades operacionais, mesmo no caso de algum incidente maior (ABBASI; ABBASI, 2005).

Atualmente, os recursos de segurança devem promulgar o projeto e planejamento de todas as instalações de petróleo. De fato, em sociedades industriais, o setor petroquímico deve demonstrar aos órgãos reguladores que a instalação foi adequadamente projetada para a segurança de pessoas e do ambiente, antes que seja dada permissão para a sua construção. É, portanto, imperativo que estas

medidas sejam bem definidas, desde o início do conceito ou *design*, a fim de evitar projetos dispendiosos, pedidos de alteração ou incidentes tardios com despesas corretivas exigidas pelos órgãos reguladores. A experiência da indústria tem demonstrado que rever a concepção do projeto no início das fases conceituais e etapas preliminares, quanto à segurança e proteção contra incêndio é mais rentável do que realizar consertos e revisões, após a conclusão dos projetos.

A curva de custo-benefício para qualquer projeto propõe que 75% do custo de um projeto é definido nos primeiros 25% do *design*. Em média, os primeiros 15% do custo total do projeto é geralmente gasto em 90% do projeto de engenharia (KHAN; ABASSI, 1999). Custos de modificação estão estimados em 10 vezes o custo inicial depois que uma instalação é construída e 100 vezes depois de um incidente ocorre. Além disso, deve-se perceber que os princípios e práticas de segurança para proteção contra incêndios são também medidas comerciais prudentes que contribuem para a eficiência operacional de uma instalação. A maioria destas medidas são atualmente identificadas e avaliados através de extensas e sistemáticas análises de risco operacional e ambiental (CROKER; NAPIER, 1998).

1.2. Classes de incêndio

Para que as reações em cadeia responsáveis pelos incêndios ocorram, são necessários três componentes fundamentais: combustível, oxigênio e uma fonte de calor para o início do fogo (CLARK, 1991).

Os objetivos dos sistemas de extinção de incêndios são fornecer refrigeração, controlar o fogo (ou seja, evitar a sua propagação) e fornecer extinção do fogo no local do incidente. Existe uma variedade de métodos de extinção de incêndios para proteger instalações. Ambos os sistemas portáteis (extintores) e fixos (hidrantes e caminhões de bombeiros) podem ser usados. A eficácia de todas as medidas de extinção de incêndios pode ser determinada pelo fluxo do agente extintor e o método de aplicação. No Brasil os incêndios são comumente classificados no mesmo sistema de classes europeu e australiano, conforme a Tabela 1, estabelecida pela ABNT-NBR 14276 em 2006.

Tabela 1 – Classificação de tipos de incêndio baseados no material

Classe	Agente extintor	Aplicação
A	Extintores de incêndio classe A são geralmente à base de água. A água proporciona um efeito de absorção de calor (arrefecimento) no material em chamas para extinguir o fogo. Extintores de água pressurizada utilizam ar sob pressão para expulsar a água.	Materiais que queimam em superfície e profundidade (ex. madeira, papel, tecido)
B	Incêndios de classe B são extintos através da exclusão de ar ao abrandar a liberação de vapores inflamáveis ou pela interrupção da reação em cadeia de combustão. Três tipos de agentes extintores podem ser utilizados para incêndios envolvendo líquidos inflamáveis, graxas e óleos: dióxido de carbono, pó químico seco, e espuma aquosa. O dióxido de carbono é um agente de gás comprimido que evita a combustão pelo deslocamento do oxigénio no ar circundante o fogo. Os dois tipos de extintores de pó químicos secos incluem um que contém bicarbonato de sódio comum ou de potássio, bicarbonato de potássio e ureia, e agentes a base de cloreto de potássio. O segundo tipo, multiuso, contém uma base de fosfato de amônio. O terceiro tipo são os extintores de espuma, geralmente para formação de um filme aquoso que expele uma camada de espuma quando é descarregado através um bocal, atuando como uma barreira para excluir oxigênio do fogo.	Líquidos inflamáveis (ex. alcool, gasolina, querosene)
C	O agente extintor de classe C deve ser não condutor de eletricidade. Tanto o dióxido de carbono e os produtos químicos secos podem ser utilizados em incêndios em instalações eléctricas. Uma vantagem do dióxido de carbono é que ele não deixa resíduos depois que o fogo é extinto. Quando o equipamento elétrico não é energizado, podem ser utilizados extintores de incêndios de classe A ou B.	Equipamentos elétricos e energizados (ex. eletrônicos e eletrodomésticos, motores, cabos elétricos)
D	É necessário um agente extintor de absorção de calor para incêndios em metais combustíveis. Além disso, o agente extintor não deve reagir com o metal da queima. Os agentes de extinção devem cobrir o metal incandescente e fornecer um cobertor isolante.	Metais e sais combustíveis (ex. sódio, magnésio e potássio)

(Adaptado de ABNT-NBR 14276, 2006; Mannan, 2014)

O tratamento exigido em caso de incêndio desses materiais depende de uma logística capaz de fornecer agentes extintores em abundância e com agilidade. Deve ser dada grande importância para que sejam escolhidas as técnicas adequadas de combate aos incêndios, considerando também as consequências e problemas ambientais associados às técnicas aplicadas aos diferentes materiais (MARZOUK; GHOULMAN, 2007).

O rótulo do extintor dá instruções de operação e identifica a classe ou classes de fogo em que o extintor pode ser usado com segurança. Supõe-se que o corpo de bombeiros seja treinado para reconhecer e aplicar os produtos extintores adequados à cada situação. Agentes extintores aprovados também carregam os rótulos dos laboratórios em que foram testadas (NFPA, 1991).

1.3. Incêndios da indústria petroquímica

Dos poços e plataformas de petróleo ao refino e distribuição desses produtos, sempre há o risco de acidentes e catástrofes que resultem na combustão dos petroquímicos (Figura 2). Para que o processo se inicie com a ignição das substâncias, basta que o combustível apresente-se em porções voláteis. A partir disso, um único ponto de maior calor perto da superfície já é suficiente para que a combustão ocorra e uma situação de incêndio se estabeleça. De acordo com a NFPA (1991), incêndios e explosões subsequentes podem ocorrer tanto em espaços confinados (como tanques de armazenamento de combustíveis em refinarias ou postos de gasolina), quanto em áreas abertas (como poços de petróleo e derramamentos).

Incêndios, explosões e poluição ambiental são os mais graves e imprevisíveis eventos que podem acontecer na indústria petroquímica. Em geral, as perdas são altas e a recuperação sobre os prejuízos ocorre em longo prazo. Estas questões existem, essencialmente, desde o início das operações petrolíferas e químicas, realizadas em escala industrial, do meio do século passado, e, apesar de todos os métodos de prevenção disponíveis, eles continuam a ocorrer com crescentes prejuízos financeiros. Parece que a gestão da indústria é alheia, ou então descuidada, aos potenciais perigos das atividades que ocorrem sob seu comando. Embora acredite-se que a maioria dos acidentes não possa ser evitada, a verdade é que todos os acidentes são, de fato, possíveis de se prevenir (NOLAN, 1996).

Figura 2 – Incêndio em plataforma de petróleo de Montara na Austrália em 2009 (esquerda) e na refinaria de El Palito na Venezuela em 2012 (direita). Fonte: Reproduzido de AAP (2009 e 2012).

A verdadeira causa da maioria dos acidentes na indústria petroquímica são os erros humanos (HEAD; HORN, 1985). A maioria das pessoas têm boas intenções para desempenhar suas funções corretamente, mas, onde os atalhos ou métodos mais fáceis associados às consideráveis oportunidades de ganho econômico acontecem, a vulnerabilidade humana geralmente sucumbe à tentação. Por isso, é prudente em qualquer organização, especialmente onde haja instalações de alto risco, ter um sistema para realizar verificações independentes, inspeções e auditorias de segurança da planta, construção e manutenção das instalações.

Incêndios envolvendo petróleo são mais difíceis de extinguir comparados a outros devido ao enorme volume de combustível geralmente disponível para o aumento da intensidade do fogo. Na luta contra incêndios em poços de petróleo são utilizados até mesmo explosivos como dinamite para consumir todo o oxigênio da atmosfera local. Contudo essa estratégia é aplicada apenas a poços de petróleo bastante profundos (HUSAIN, 1995). Nas proximidades de regiões habitadas ou mesmo em tanques de estocagem de combustíveis em refinarias, onde existam combustível e oxigênio abundante, é recomendado recorrer a outras estratégias menos destrutivas de extinção de incêndios. Além disso, qualquer faísca resultante do atrito de metais retorcidos pode incendiar novamente o petróleo e seus derivados presentes no local (GURURAJ et al., 1995).

1.4. Espumas extintoras de incêndio

A água é ainda o meio mais comum e abundantemente usado na extinção de incêndios por não apenas apagar o fogo, como também impedir que ele se alastre. Contudo, a água também pode aumentar a intensidade e danos causados por incêndios de derivados de petróleo contendo hidrocarbonetos (KLEIN, 2004). Conforme descrito na Tabela 1, são atribuídas classes aos incêndios, que determinam o sistema adequado de extinção. Nos incêndios de classe B, em que se incluem os hidrocarbonetos e muitos derivados do petróleo, não é recomendado o uso de água. O uso de espumas melhora a eficácia das operações de combate a incêndio e é considerado como um fator significativo para o sucesso de uma ação de combate ao fogo. Isto é verdade para a maioria dos incêndios, exceto para os casos em que a água e agentes à base de água possam ser perigosos (SARDQVIST, 2002). Assim, é

necessário o uso de espumas extintoras de incêndios capazes de apagá-los e impedir o espalhamento das chamas (NFPA, 2005).

A espuma é utilizada em sistemas fixos e móveis. Sistemas de espuma fixo utilizados em tanques contendo líquidos inflamáveis e tubulações industriais geralmente estão localizados próximos às áreas de risco. Quando existe um planejamento técnico adequado, os sistemas fixos evitam que resíduos, incluindo as próprias espumas de combate a incêndios, sejam liberadas ao ambiente (KLEIN, 2004). No entanto, há momentos em que as espumas são usadas em locais onde o fornecimento de proteção imediata contra possíveis resíduos pós-extinção é difícil ou impossível. Para esses casos, o risco de poluir o meio ambiente é alto e os efeitos negativos dos resíduos no solo e na água podem ser desastrosos (RUPPERT et al., 2005).

A estrutura particular apresentada pelas espumas garante uma vasta aplicação desse sistema. Espumas produzidas com soluções aquosas são utilizadas em combates a incêndios por apresentarem propriedades que as tornam um eficiente agente extintor em comparação com a água.

A aplicação de água em incêndios deve-se ao efeito refrigerador provocado pelo seu calor de vaporização (40,66 $kJ.mol^{-1}$), o qual remove calor do processo de combustão e resfria o material em chamas. Outra propriedade extintora está associada à diminuição da concentração de oxigênio do ar pelo vapor de água produzido no combate. Mas a água apresenta algumas limitações, e as espumas extintoras foram desenvolvidas a fim de contorná-las (ISENBERG, 1992). A alta tensão superficial da água dificulta a molhabilidade da superfície em chamas e a penetração no material, e sua baixa viscosidade provoca escoamento rápido pelas superfícies, dificultando a atuação do líquido sobre elas, principalmente em superfícies verticais. Além disso, os jatos de água podem provocar transbordamento de um líquido em chamas, levando à propagação do incêndio (BHAKTA; RUCKENSTEIN, 1995).

As espumas foram desenvolvidas para se obter melhor aderência ao material em chamas, produzindo um recobrimento contínuo sobre ele. Como apresentam baixa densidade, espalham-se sobre a superfície do material em combustão, abafando-a e isolando-a do contato com o oxigênio atmosférico. Tanto a supressão do vapor comburente, quanto o resfriamento do material em chamas pelo líquido presente na espuma previnem a re-ignição. Para aperfeiçoar tais características, espumas com estruturas cada vez mais resistentes e fluidas têm sido obtidas para diferentes classes

de incêndio, visando-se garantir a rapidez e a segurança do combate (FIGUEREDO, 1999).

Na Europa e em parte em outros países, a classificação de espumas de incêndio baseia-se na norma europeia para extinção de incêndio. De acordo com a norma EN 1568 (2000), as espumas são classificadas como:

- S (da inicial em inglês *synthetic*): Concentrados de espuma sintética à base de misturas de agentes tensoativos de hidrocarboneto que pode também conter agentes fluorados como estabilizadores adicionais;
- AFFF (da sigla em inglês *aqueous film forming foam*): Espuma formadora de filme aquoso à base de misturas de hidrocarbonetos e agentes fluorados tensoativos com a capacidade para formar um filme aquoso sobre a superfície de combustíveis de hidrocarbonetos;
- P (da inicial em inglês *protein*): Concentrado de espuma de proteína à base de líquidos derivados de materiais com proteína hidrolisada;
- FP (da sigla em inglês *fluorinated protein*): Concentrados de espuma de proteína fluorada à base de concentrados de proteína adicionados de surfactantes fluorados;
- FFFP (da sigla em inglês *film forming fluoroprotein*): Concentrado de espuma de proteína fluorada formadora de filme à base de concentrados de fluorproteínas com a capacidade de formar um filme aquoso em alguns hidrocarbonetos combustíveis;
- AR (da sigla em inglês *alcohol resistant*): Concentrados de espuma álcool-resistentes, que também podem ser usados em hidrocarbonetos e são capazes de precipitar uma membrana polimérica na superfície de álcool. Em geral, essas espumas são misturadas aos outros tipos de espuma e descritas como AFFF-AR, FFFP-AR ou FP-AR.

Espumas de combate a incêndios contêm muitas substâncias adicionais, a fim de alcançar a formação de espuma adequada e também propriedades funcionais. Um concentrado de espuma típico contém até oito ingredientes, sendo a maioria deles tensoativos fluorados ou hidrolisados de proteínas, solventes e água. Normalmente, a informação disponível sobre a composição detalhada de um concentrado de espuma é limitada pelos fabricantes. A Tabela 2 apresenta os ingredientes de diferentes tipos de espuma, com base em fichas de segurança dos fabricantes.

Tabela 2 – Composição das espumas de incêndio

Tipo de espuma	Componentes	Concentração ($m.V^{-1}$ %)
S	Surfactantes	10 , 20
	Solventes orgânicos	15 , 30
	Inibidores de corrosão	1 , 3
	Estabilizantes de espuma	<2
	Água	---
AFFF	Surfactantes	1 , 10
	Surfactantes fluorados	1 , 5
	Solventes orgânicos	15 , 40
	Sulfato de magnésio	<5
	Etileno glicol	<20
	Água	---
P	Proteínas hidrolisadas	<20
	Hexileno glicol	<10
	Etileno glicol	<10
	Cloreto de sódio	5 , 10
	Sais metálicos	1 , 5
	Óxido de zinco	<1
	Conservantes	<2
	Água	---
FP	Proteínas hidrolisadas	25 , 50
	Surfactantes fluorados	<5
	Hexileno glicol	<10
	Etileno glicol	<10
	Cloreto de sódio	5 , 10
	Sais metálicos	<5
	Conservantes	<2
	Água	---
FFFP	Proteínas hidrolisadas	10 , 50
	Surfactantes fluorados	<5
	Hexileno glicol	1 , 10
	Etileno glicol	<10
	Cloreto de sódio	5 , 10
	Sais metálicos	<5
	Conservantes	<2
	Água	---

(Adaptado de EN 1568, 2000; Krol, 2010)

Incêndios de combustíveis e hidrocarbonetos, em geral, representam uma séria ameaça à vida e às propriedades, e eles exigem resposta imediata. Para ativar uma resposta rápida aos incêndios, são necessários agentes extintores eficazes e eficientes para evitar danos e re-ignição dos incêndios. Dentre todas as espumas, as AFFFs foram as primeiras desenvolvidas na década de 1960 como ferramentas

importantes para extinção de incêndios envolvendo combustíveis líquidos inflamáveis como por exemplo, gasolina e querosene (DARWIN et al., 1995). Devido à presença de grande quantidade de líquidos inflamáveis, os municípios (corpo de bombeiros), a indústria de processamento de hidrocarbonetos (refinarias de petróleo) e setores militares utilizam AFFFs (Figura 3). Nos EUA, os militares compreendem 75% do total mercado, enquanto as entidades municipais e da indústria de processamento de hidrocarbonetos representam 13% e 5%, respectivamente (MOODY; FIELD, 2000). No Brasil não existem dados disponíveis sobre os principais compradores, mas é seguro afirmar que a proporção de uso pelos militares é menor, considerando a diferença de orçamentos militares entre os países. Em 1985, o mercado norte-americano para os produtos AFFF (vendidos em soluções de 3% e 6%) foi de 6,8 milhões de litros, com uma receita total de 10 milhões de dólares em vendas nos Estados Unidos. Por razões históricas, o Departamento de Defesa para Especificações e Regulamentos Militares dos EUA têm especificado e estabelecido de critérios de desempenho das AFFFs aos fabricantes (MOODY; FIELD, 2000).

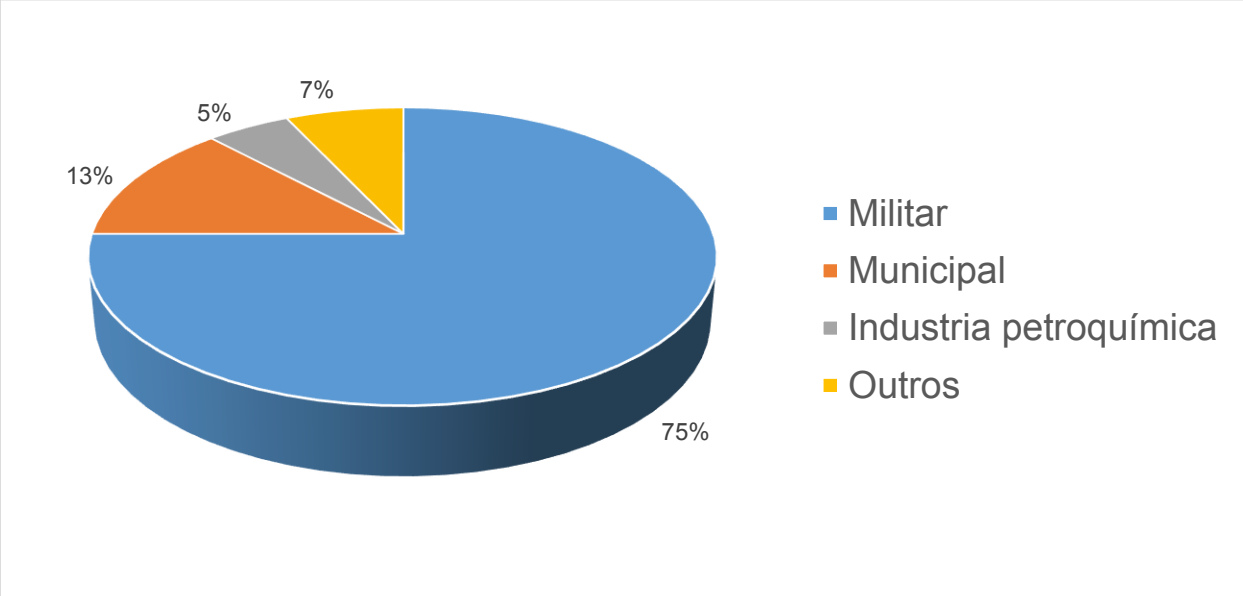


Figura 3 – Principais compradores das espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) nos EUA. Fonte: Traduzido e adaptado de IMR International (2006).

A escolha pelas AFFFs é feita pois necessita de uma quantidade muito baixa de energia para produzir uma espuma de qualidade elevada. Consequentemente, elas podem ser aplicadas em uma grande variedade de sistemas de distribuição de

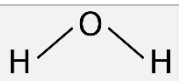
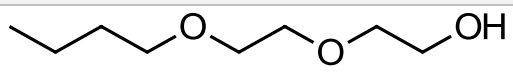
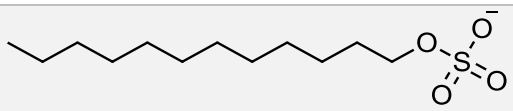
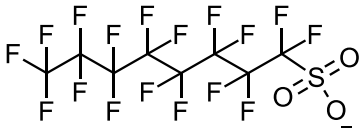
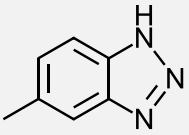
espuma. Esta versatilidade faz das AFFF uma escolha óbvia para aeroportos, refinarias de petróleo, fábricas, corpos de bombeiros, e toda a outra operação que envolve o transporte, processo, ou manuseio de líquidos inflamáveis (MULLIGAN, 1990).

1.5. Espumas formadoras de filme aquoso (AFFF)

Formulações comerciais das AFFFs são misturas complexas cujos componentes principais são um solvente (tipicamente um éter de glicol), surfactantes fluorados (perfluorado aniônico ou anfotérico parcialmente fluorado) e agentes surfactantes à base de hidrocarbonetos (Tabela 3). Tensoativos contendo flúor em misturas de AFFF contribuem para o desempenho como principal substância para extinção de incêndio e como selantes de vapor que previnem a re-ignição de combustível e solventes (FALK, 1978; ALM; STERN, 1992; KISSA, 1994). O mecanismo de extinção dos compostos de AFFF combinados consiste de três fatores: (i) a supressão de vapores inflamáveis a partir da superfície do material submetido a combustão; (ii) isolamento da superfície inflamável do ar; e (iii) o resfriamento do combustível (CASEY, 1984).

Os surfactantes fluorados podem ser perfluorados, em que todos os carbonos estão ligados ao flúor sem hidrogênio na cadeia, ou polifluorados, em que apenas alguns átomos de flúor estão ligados à cadeia carbônica, mas com hidrogênio ou outros compostos ligados ao carbono (BOBERT et al., 1997).

Tabela 3 – Composição media da AFFF Ansul 6% (AFC-3)

Componente	Estrutura química	Concentração	Função
Água		77~85%	Diluente
Dietilenoglicol butil éter (Butil carbitol)		12%	Co-solvente / anti-congelante
Alquil-sulfatos		1~5%	Formação de espuma
Surfactantes fluorcarbonados		1~6%	Formação de espuma, espalhamento, limitador de difusão de combustível
Toliltriazol		0,05%	Inibidor de corrosão

(Adaptado de MOODY; FIELD, 2000)

1.5.1. Aplicação da AFFF

Na geração de espumas de combate a incêndios, a água é bombeada mediante um tubo ou mangueira enquanto uma solução de agentes tensoativos é aspirada para a linha, utilizando um sistema de Venturi posicionado na extremidade (no bocal de espuma), dispostos conforme a Figura 4. Nesses dispositivos, chamados aspiradores de descarga, a solução de espuma passa através de um orifício, após as entradas de ar, para uma área de expansão para produzir uma espuma expandida (CASEY, 1984).

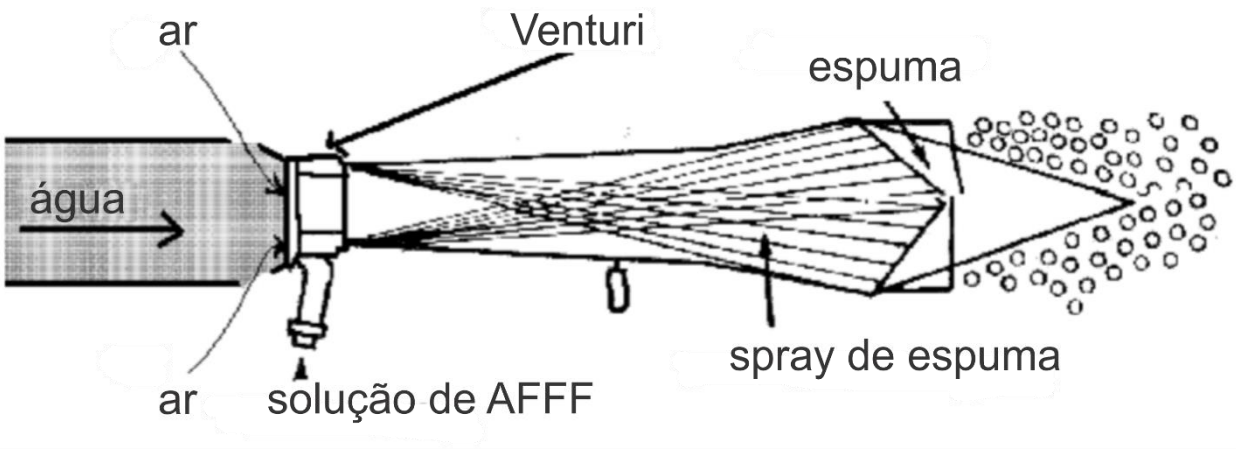


Figura 4 – Esquema da aplicação da AFFF na ponta de uma mangueira de incêndio com o efeito Venturi para mistura de soluções e formação de espuma. Fonte: Traduzido de FIGUEREDO; SABADINI (2003).

Os agentes de espuma para combate a incêndio suprimem o fogo, separando o combustível do oxigênio. Dependendo do tipo de agente, a espuma atua de diversas maneiras: criando colchões de espuma na superfície do combustível, sufocando o fogo e separando as chamas da superfície do combustível. O colchão de espuma suprime a liberação dos vapores inflamáveis que poderiam se misturar com o ar e provocar as chamas novamente (Figura 5).

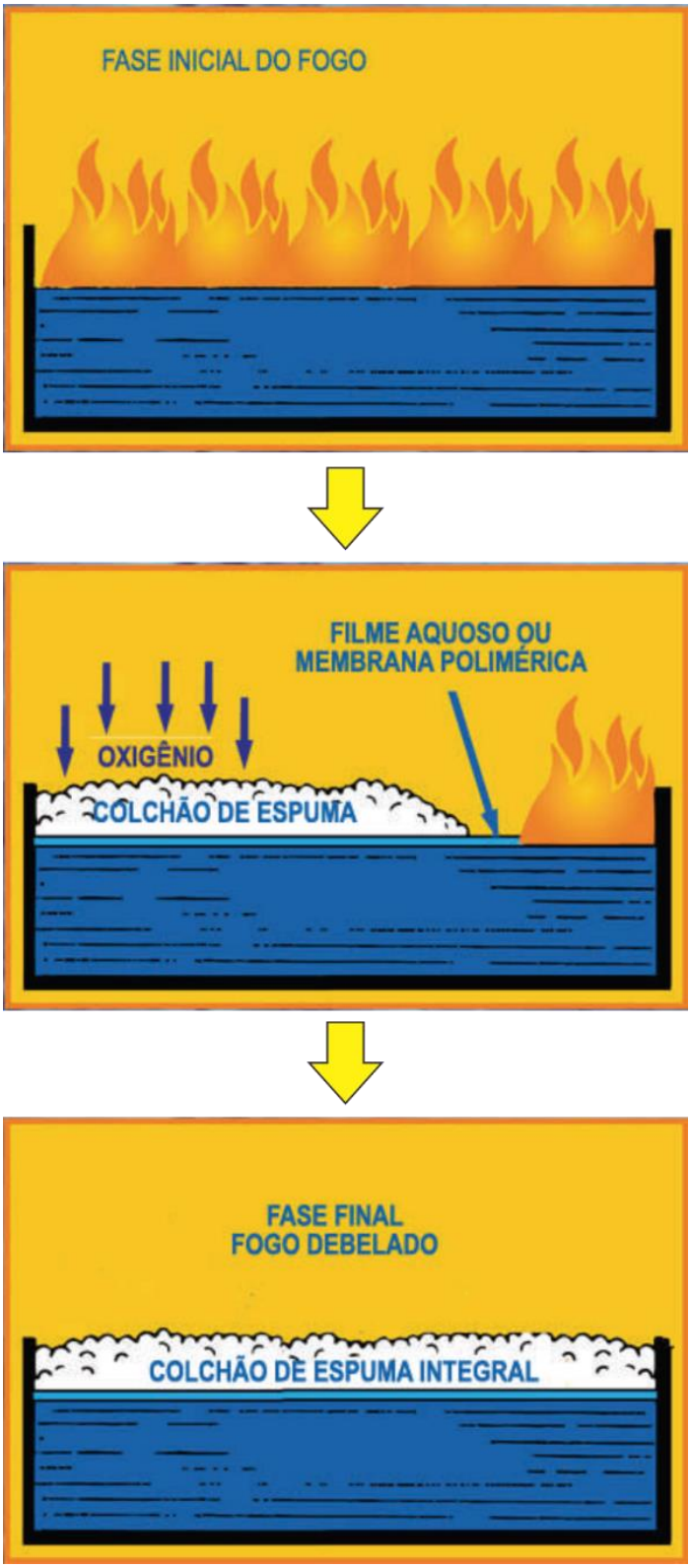


Figura 5 – Processo de extinção de incêndio com o uso da AFFF. Fonte: Traduzido de Overige Blussystemen (2008).

Deste modo, a AFFF forma uma película aquosa na superfície de um combustível de hidrocarboneto e extingue o incêndio.

AFFF são os agentes mais eficientes em uso hoje para a extinção de incêndios de combustíveis e hidrocarbonetos. O princípio que rege a alta capacidade de recobrir e resfriar a superfície de queima de combustível é dada pela vaporização rápida da água para formar uma película aquosa única que se espalha sobre a superfície do hidrocarboneto menos denso. Devido a esta película aquosa, a taxa de evaporação do hidrocarboneto é reduzida, esgotando assim o fornecimento de combustível para as chamas. Ambos estes fenômenos são fortemente dependentes das tensões superficiais das AFFFs e hidrocarbonetos líquidos e sobre as propriedades da tensão superficial e interfacial entre eles (FIGUEIREDO; SABADINI, 2003).

1.5.2. Espalhamento

A característica essencial da AFFF é a possibilidade de espalhar filme aquoso sobre a superfície de hidrocarboneto líquido e deste modo a impedir o acesso do oxigénio ao fogo e também para reduzir a evaporação do hidrocarboneto. Logo, é óbvio que as propriedades de espalhamento de líquido formador de espuma sejam de grande importância para essa função. Para garantir o rápido e completo espalhamento, o líquido espumante contém hidrocarbonetos e fluorcarbonos surfactantes: os surfactantes de hidrocarbonetos diminuem a tensão interfacial hidrocarboneto / água, enquanto surfactantes fluorcarbonados diminuem a tensão superficial água / ar para estabelecer de um coeficiente de espalhamento positivo da solução aquosa em hidrocarboneto líquido (PABON; COPART, 2002; RANJBAR; SHAHRAKI, 2013).

Ao nível macroscópico, o equilíbrio de molhabilidade de uma gota em superfície sólida (Figura 6) é descrito pela Equação 1:

$$\sigma_{sv} = \sigma_{sl} + \sigma_{lv} cos\theta \qquad (1)$$

onde:

σ_{sv} é a tensão superficial entre sólido e vapor;

σ_{sl} é a tensão superficial entre sólido e líquido;

σ_{lv} é a tensão superficial entre liquivo e vapor;

θ é o ângulo de contato.

A Equação 1 é válida apenas para superfícies planas e sólidas, rígidas, lisas e homogéneas e essencialmente o valor do ângulo de contato é a melhor aproximação para θ (KWOK; NEUMAN, 1999). Os ângulos diferem de θ em superfícies irregulares em casos reais previstos com a Equação 1. O modelo proposto é apenas uma abordagem macroscópica, que não leva em conta a forma complicado de um líquido e uma linha de contato de três fases. No entanto, a Equação 1 fornece uma boa primeira aproximação e é frequentemente utilizada (MARMUR, 2004).

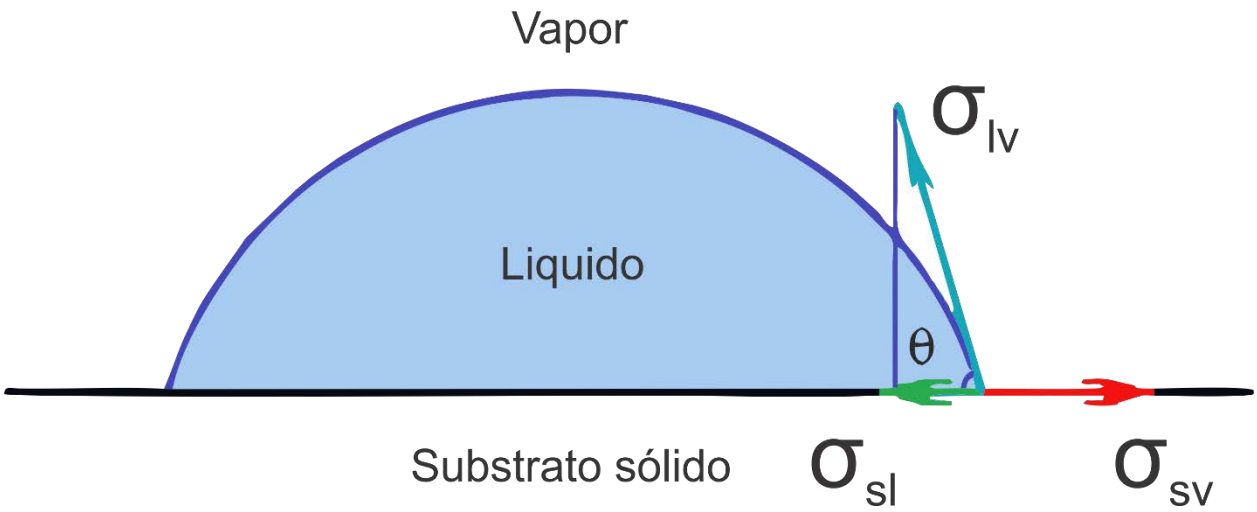


Figura 6 – Vetores de espalhabilidade pela tensão superficial em gota de líquido com em uma superfície sólida. Fonte: Traduzido de Kovalchuk et al. (2014).

O mesmo critério é utilizado também para o espalhamento sobre uma superfície líquida (JOOS; HUNSEL, 1985). Assim, um líquido é capaz de formar uma película sobre a superfície de um segundo líquido com base no coeficiente de difusão, tal como calculado a partir de medidas de tensão superficial (ADAMSON, 1960). Para avaliar o espalhamento das AFFFs e a formação espontânea de filmes aquosos, um coeficiente de espalhamento deve ser calculado. O coeficiente de espalhamento (S) descrito na Equação 2 avalia a redução da superfície e da tensão interfacial (HARKINS; FELDMAN, 1922).

$$S = \sigma_{sv} - (\sigma_{sl} - \sigma_{lv}) \quad (2)$$

onde,

S é o coeficiente de espalhamento;

σ_{sv} é a tensão superficial do liquido de baixo;

σ_{sl} é a tensão superficial do liquido de cima;

σ_{lv} é a tensão interfacial entre os dois líquidos.

Segue-se a partir da Equação 1 que cos θ>0, ou seja, θ<90°, apenas se $\sigma_{sl} < \sigma_{sv}$. Por outro lado, de acordo com a Equação 2 a molhabilidade completa é apenas possível se $\sigma_{lv} + \sigma_{sl} \leq \sigma_{sv}$, isto é, a única forma de alcançar a molhabilidade completa com um líquido inicialmente não molhável é diminuir um ou ambos σ_{sl} e σ_{lv} desde que σ_{sv} permanece constante. É bem conhecido que a adsorção de tensoativos nas interfaces líquido / ar sólido / líquido diminui as tensões interfaciais. Esta é a razão pela qual as soluções de agentes tensoativos podem se espalhar mais eficiente sobre as superfícies hidrofóbicas que não são completamente molhadas por água pura (STAROV et al., 2008).

Para soluções de surfactantes, a adsorção de surfactantes pode mudar as três energias de superfície σ_{sl}, σ_{sv} e σ_{lv} e diferem substancialmente dos valores correspondentes para a água pura (MARMUR, 2004). Este é o motivo mais provável da ausência de uma correlação direta entre a tensão superficial da solução aquosa e as suas propriedades de molhagem. Para compreender as propriedades de molhagem de soluções de tensoativas, deve ser tomado em consideração a adsorção tanto nas interfaces líquido / ar quanto sólido / líquido.

Teoricamente, o líquido se espalha sobre um substrato sólido se S>0 (SCHEFFEY; WRIGHT, 1994). Quando S é positivo, o líquido superior (AFFF) irá espalhar imediatamente sobre a superfície do líquido inferior (hidrocarboneto). Se S é zero ou negativo, a AFFF de maior densidade na parte superior cairá através da superfície do combustível. A solução AFFF, embora seja principalmente água, contém um surfactante químico fluorado que reduz a tensão superficial da água de tal modo que o coeficiente de difusão é positivo em muitos hidrocarbonetos diferentes.

Desta forma, durante a aplicação da AFFF no combate a incêndios os componentes tensoativos fluorados em AFFFs diminuem a tensão superficial da solução aquosa em 15-20 dinas.cm^{-1} enquanto os tensoativos de hidrocarbonetos reduzem a tensão interfacial entre a solução aquosa e a fase de hidrocarboneto (do combustível em combustão) para 0-2 dinas.cm^{-1} (SHINODA; NOMURA, 1980). Assim,

os filmes são formados por soluções de surfactantes fluorados e de hidrocarbonetos constituída por duas monocamadas de agentes tensoativos mistos em que a fase aquosa monocamada-ar é dominado pelo surfactante fluorado e a fase aquosa monocamada-hidrocarboneto é dominado pelo tensoativo de hidrocarboneto (Figura 7).

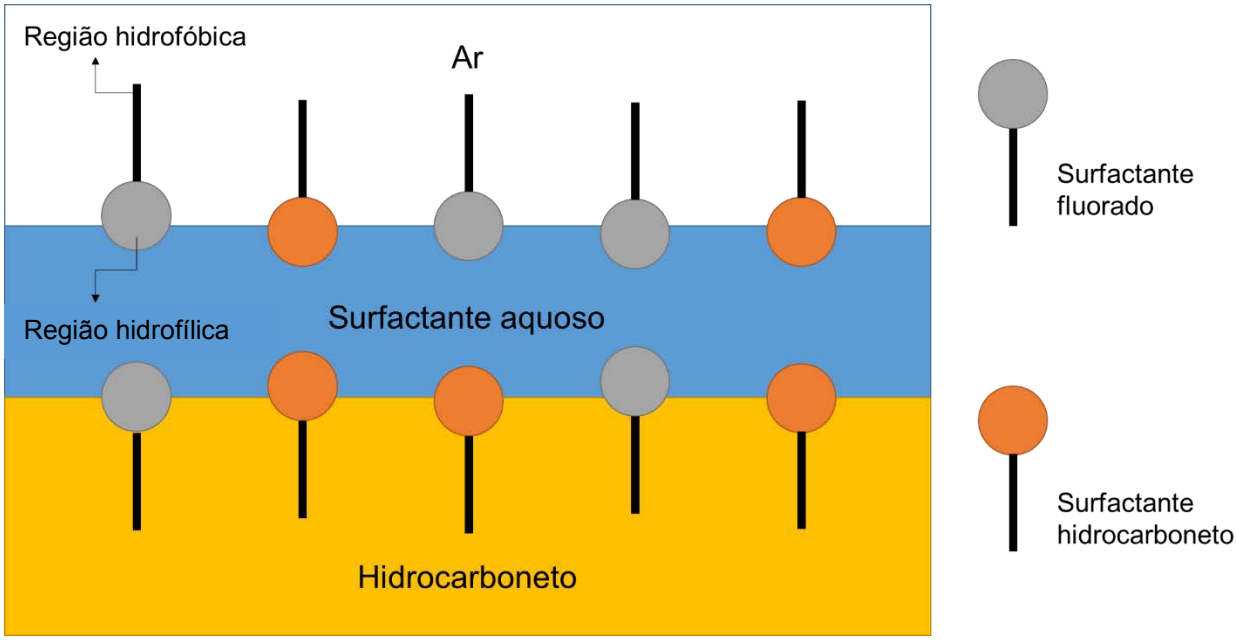


Figura 7 – Fases da mistura de ar, solução de surfactante aquosa e hidrocarbonetos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Há uma ampla gama de classes de compostos fluorados que exploram o caráter hidrofóbico e hidrofílico para repelência de água e óleo (SCHULTZ et al., 2004). Surfactantes fluorados são distintamente diferentes dos agentes tensoativos de hidrocarbonetos. Embora os grupos de cabeça polares de hidrocarbonetos e surfactantes fluorcarbonados possam ser semelhantes, a cauda perfluorcarbonada não polar é tanto hidrofóbica quanto oleofóbica, ao contrário da cauda de tensoativos de hidrocarbonetos, considerada apenas como hidrofóbica.

Os surfactantes perfluorados também são muito mais tensoativos que os surfactantes de hidrocarbonetos (SHINODA et al., 1972). A substituição dos átomos de flúor por átomos de hidrogénio diminui a tensão superficial em soluções aquosas, que promove a micelização sob concentrações mais baixas, ou seja, a concentração micelar crítica (CMC) é menor. Com isso, a tensão superficial diminui mais eficientemente que outros análogos compostos apenas por hidrocarbonetos (KISSA,

1994). Por exemplo, a tensão de superfície de ácido perfluoroctanoato (PFOA) foi reportada como 15,2 dinas.cm^{-1}. Os valores de CMC para surfactantes fluorados com cadeias de 7 e 8 carbonos (sendo referidos deste ponto em diante como C7 e C8, respectivamente, onde o número representa a quantidade de carbonos da cadeia) são aproximadamente iguais às de hidrocarbonetos surfactantes com cadeias C11 e C12 (KISSA, 1994).

Além disso, uma vez que as várias tensões são função da temperatura, a capacidade de espalhamento pode variar conforme a temperatura. Por esta razão, uma solução de AFFF que pode formar um filme aquoso sobre uma superfície de hidrocarboneto à temperatura ambiente, pode não formar uma película nas temperaturas elevadas encontradas quando o hidrocarboneto está em chamas. Uma AFFF, quando aplicado pela primeira vez a uma superfície de queima, resfria a superfície pela rápida evaporação de água presente na formulação da solução AFFF. Nesta altura, a temperatura da superfície será próxima de 100°C, facilitando, assim, a formação da película (WOODMAN et al., 1978).

1.6. Compostos fluorados nas espumas de incêndio

A partir do final da década de 1990 e, particularmente, nos últimos anos, aumentaram as publicações e estudos de monitoramento que descrevem a presença de compostos fluorados no ambiente e em seres humanos. Assim como os clorados e bromados, os contaminantes organofluorados compreendem um grande número de compostos de diferentes classes (LEHMLER, 2005). De interesse mais recente são os compostos perfluorados ou polifluorados (da sigla em inglês *per-* ou *poly fluorinated compounds*, PFC), uma vez que a substituição completa de ligações carbono-hidrogênio para as ligações de flúor-carbono são mais fortes e conferem propriedades físico-químicas únicas, incluindo alta resistência à degradação abiótica e biótica (MARTIN et al., 2004).

Existem diversas maneiras de classificar os PFCs. Surfactantes fluorados podem ser classificados como perfluorados, em que todos os átomos de hidrogénio são substituídos por átomos de flúor, ou como polifluorados parcialmente fluorado, em que alguns átomos de carbono contêm átomos de hidrogênio. Como outras classes de surfactantes, os tensoativos fluorados geralmente são classificados em uma das quatro categorias: não iônicos, aniônicos, catiônicos, e anfotéricos, com surfactantes

aniônicos fluorados sendo a classe mais importante (BOBERT, 1997). Contudo, a maneira mais comum ao se referir aos PFCs é com relação ao método de produção, que pode ser através de fluortelomeração, resultando em fluortelômeros, ou através de eletrofluoração, resultando em perfluoralquilados (da sigla em inglês *poly-* ou *per-fluorialquilate substances,* PFAS).

Backe et al. (2013) fizeram uma excelente revisão da literatura sobre as moléculas de PFCs presentes nas AFFFs conhecidas até hoje. Esses autores compilaram em uma lista compreensível todas as classes identificadas até então dos surfactantes perfluorados alquilados (Figura 8) e fluortelomerados (Figura 9). Muitos deles são estudados nos capítulos seguintes dessa tese.

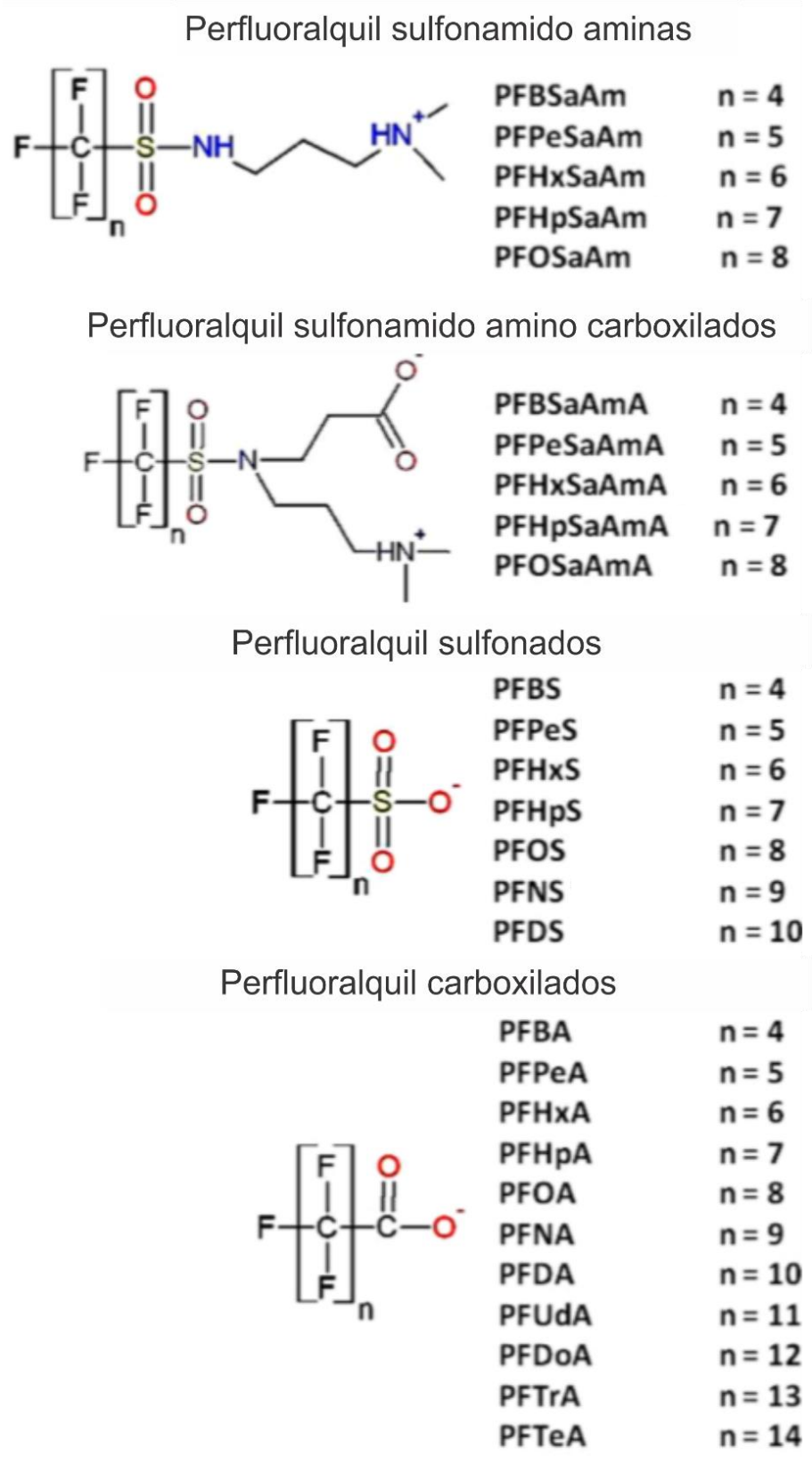


Figura 8 – Surfactantes perfluorados presentes na formulação das AFFFs. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados pode ser consultado na Lista de Abreviações. Fonte: Traduzido de Backe et al. (2013).

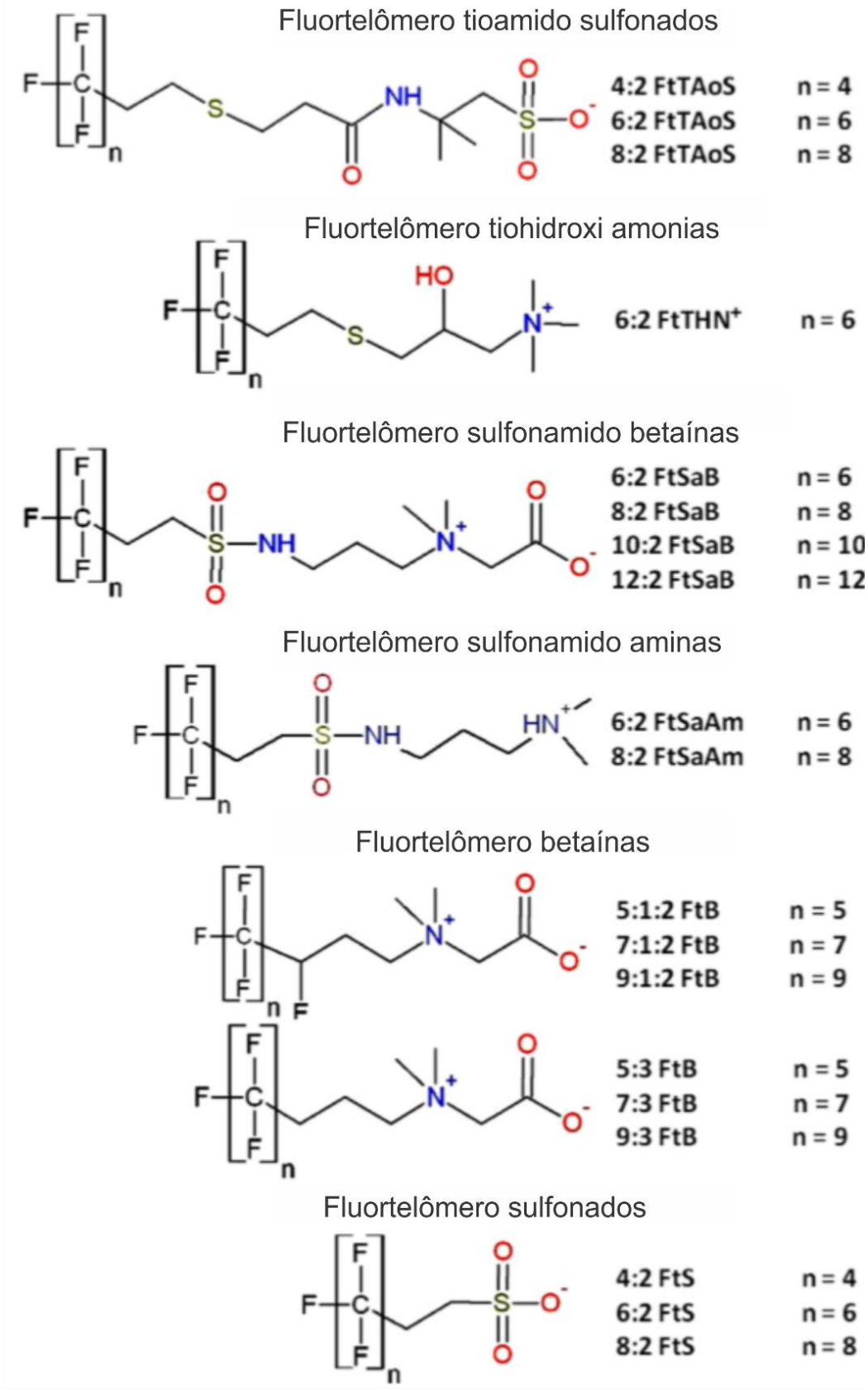


Figura 9 – Surfactantes fluortelomerados presentes na formulação das AFFFs. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados na pode ser consultado na Lista de Abreviações. Fonte: Traduzido de Backe et al. (2013).

Os PFCs compreendem uma classe única de substâncias com propriedades químicas cujo comportamento ambiental tem recebido crescente, porém ainda pouca atenção. Por isso, pouca informação ainda está disponível para permitir uma análise completa de todos desses compostos no ambiente. Contudo, são conhecidos os dados sobre liberação dessas substâncias no ambiente, o que permite inferir sobre o volume esperado em certas áreas e determinar quais substâncias fluorcarbonadas são de fato provenientes das AFFFs.

Sabe-se que dentre os PFCs, as AFFFs contêm em maior parte substâncias per e poli fluoralquiladas (PFAS) como principais agentes (MOODY; FIELD, 2000). As técnicas atuais permitem detectar com precisão razoável a descarga de AFFF em aeroportos militares onde treinamento de incêndio com AFFF costumavam ser feitos semanalmente (MOODY; FIELD, 1999). Nesses e em outros locais, como aeroportos municipais e campos de treinamento do corpo de bombeiros, onde AFFFs foram lançadas sob concentrações elevadas (>1.000.000 $ng.L^{-1}$) são detectados ácidos carboxílicos perfluorados (da sigla em inglês *perfluorinated carboxylic acid*, PFCA), ácidos sulfônicos perfluorados (da sigla em inglês *perfluorinated sulfonic acids*, PFSA) e fluorotelomeros sulfonados (da sigla em inglês *fluotelomer sulfonate*, FtS) em águas subterrâneas e superficiais (AHRENS, 2011; KÄRRMAN et al., 2011). As águas subterrâneas em locais impactados pelo uso de AFFF têm as maiores concentrações registadas de PFAS entre qualquer ambiente (SCHULTZ et al., 2004).

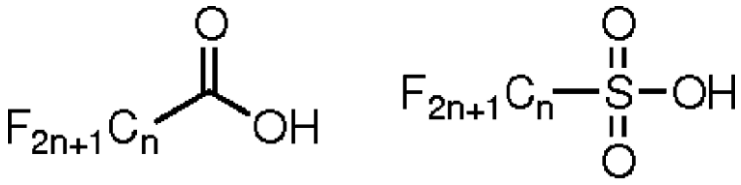
1.6.1. Substâncias perfluoralquiladas (PFAS)

Os métodos analíticos para muitos dos PFAS identificados recentemente ainda não foram totalmente estabelecidos, mas são necessários para determinar a extensão da contaminação PFCs nas águas subterrâneas. A comparação dos perfis de concentração de PFAS em formulações AFFF para aqueles em águas subterrâneas tem fornecido maneiras de inferir sobre o destino ambiental desses fluorcarbonados (MOE et al., 2012).

Em geral, os PFAS encontrados em certas formulações das AFFFs variam bastante em comprimento de cadeia carbônica e classe. Essas substâncias são normalmente referidas como precursoras e podem ser perfluoralquil sulfonoamido, PFSA ou PFCA. O PFSA e PFCA são as mais comumente encontradas. As variações

na proporção dessas substâncias nas amostras ambientais são atribuídas muito em função da formulação dos fabricantes e tempo de exposição das moléculas ao local.

Quando um grupo hidrofílico ácido é adicionado a um PFC, o resultado são os ácidos perfluorados, tais como ácidos PFSA e ácidos PFCA (Figura 10) com alta versatilidade tensoativa (RAYNE et al., 2008).



PFCAs PFSAs

Figura 10 – Estrutura dos ácidos carboxílicos perfluorados (PFCAs) e dos ácidos sulfônicos perfluorados (PFSAs). Fonte: Reproduzido de Rayne et al. (2008).

Dada a alta capacidade tensoativa da estrutura molecular dos PFCs, elas também são usadas em outros produtos além de serem usados diretamente como agentes de combate a incêndios. Aplicações comerciais são tão diversos como têxteis e tecidos, papel e embalagens, materiais, surfactantes de mineração, produtos de limpeza e pesticidas, entre outros. Estas duas classes de PFAS (PFSA e PFCA) podem também surgir a partir da degradação de outros PFCs, tais como perfluoroalquil telômeros sulfonados (da sigla em inglês *fluortelomer sulfonates*, FtS) e fluortelômero betaínas (da sigla em inglês *fluortelomer betaines*, FtB), e seus derivados (GIESY; KANNAN, 2002).

O grupo dos PFAS degrada-se em última instância em perfloroctano sulfonados (PFOS) e perfluoroctanoatos (PFOA). Ao longo do processo de degradação passam por diversas formas, como por exemplo ácido ácido perfluorhexanosulfônico (PFHxS) ou perfluorheptanoato (PFHpA) (MOODY et al., 2003; RHOADS et al., 2008). As vias de degradação serão discutidas em uma seção específica dessa revisão da literatura.

1.6.2. Substâncias fluortelomeradas

Com o avanço nas pesquisas de quantificação de PFCs foram sendo descobertas outras substâncias além dos PFCAs e PFSAs no ambiente. Foi determinado que PFCAs, PFSAs e derivados, como os PFOSs eram os surfactantes

mais usados em AFFF até recentemente (CORTINA; KORZENIOWSKI, 2008a). Contudo, análises ambientais que comprovaram a bioacumulação e toxicidade de alguns dos compostos fizeram que alguns fabricantes, como a 3M alterassem suas formulações. O efeito da liberação da AFFF no ambiente será discutido nas próximas seções dessa revisão da literatura.

Assim, há uma tendência crescente do uso de diferentes tipos de fluorcarbonados, baseados principalmente em fluortelômeros. A mistura comercial padrão de FtS conhecida como Lodyne é o principal componente de algumas marcas de AFFF e tem em sua composição formas precursoras fluortelomeradas com 4, 6 e 8 carbonos. Esses compostos são do grupo fluortelômero tiol, conhecidos como fluortelômero tioamido sulfonados (FtTAoS). Existem muitos outros surfactantes fluorados baseados em fluortelômero tiol e sulfonados usados na formulação das AFFFs (BACKE et al., 2013).

Surfactantes fluorados com base em fluorotelômeros de seis carbonos têm substituído amplamente o PFOS e surfactantes à base de PFSA e PFCA em produtos AFFF ao longo dos últimos anos (CORTINA; KORZENIOWSKI, 2008b). Estudos indicam que existem diferença significativa nas propriedades físico-químicas e nas rotas metabólicas de degradação de PFAS, PFHxS e 6:2 FtS (BACKE et al., 2013).

Ainda assim, os fluortelômero tiol e sulfonil também se degradam às formas persistentes PFOA e PFOS, mas passam antes por formas intermediárias 6:2 FtS, 4:2 FtS e 8:2 FtS (SCHULTZ et al., 2004). Os FtTAoS, por fazer parte de muitas outras formulações de AFFF, são encontrados, junto com os seus produtos de degradação em aquíferos, solo e biota (MOODY et al., 2003; SCHULTZ et al., 2004; OAKES et al., 2010). Não diferente dos PFAS, os FtS, ao longo da sua degradação também passam por estruturas de PFHxS e perfluorbutanoato (PFBA), segundo WANG et al. (2005a)

O 6:2 FtS é análogo a outro fluortelômero de interesse ambiental chamado álcool fluorotelomero (FTOH), pois se degrada em condições aeróbias em inúmeras matrizes ambientais com múltiplos grupos CF_2 sendo removidos (WANG et al., 2005b; LIU et al., 2007; WANG et al., 2009). Da mesma forma, o 6:2 FTOH é biodegradável em condições aeróbias em cultura bacteriana de solo para formar um maior rendimento de produtos de transformação, incluindo ácido perfluorbutanóico (PFBA) com mais grupos CF_2 removidos (LIU et al., 2013). O problema é que ainda assim todos eles levam a substâncias inertes fluorcarbonadas.

1.6.3. Produto final de degradação (PFOA e PFOS)

Conforme revelado em um relatório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2007), há cerca de mil PFAS produzidos comercialmente que poderiam degradar a PFOA e PFOS (Figura 11) (OECD, 2007). Estes são a última forma de degradação, seja biótica ou abiótica dos PFASs, e por isso são mais detectados em estudos de bioacumulação e em locais com longo histórico de liberação de AFFF.

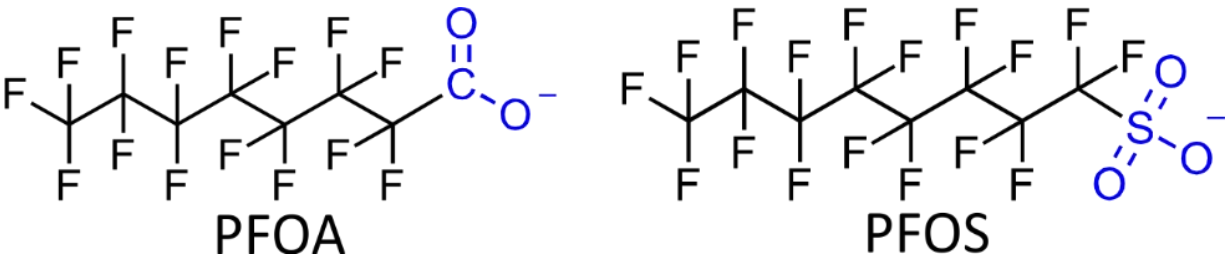


Figura 11 – Estrutura química de perfloroctano sulfonados (PFOS, à direita) e perfluoroctanoatos (PFOA, à esquerda). Fonte: Adaptado de Field e Moore (2010).

Além deles, porém em concentrações muito menores, outras 42 famílias e subfamílias e 268 PFASs individuais foram detalhados por Buck et al. (2011) como compostos de provável importância ambiental, enquanto que apenas uma pequena fração destes compostos foram avaliados quanto à sua biodegradabilidade. As suas estruturas químicas foram caracterizadas como linear, com um radical perfluoroetilo. Outros surfactantes comercialmente importantes, como os ésteres fluorotelômero fosfato, e os polímeros fluorados de cadeia lateral (por exemplo, acrilato fluorado, metacrilato e polímeros à base de uretano) são sintetizados a partir de intermediários chaves, tais como os FTOH. A maior parte dos estudos aponta como todos os compostos estudados se transformarem em produtos inertes.

Tais substâncias finais inertes são os já mencionados PFOS e o PFOA (Figura 11). Eles estão entre os poluentes orgânicos mais proeminentes no meio ambiente, biota e sangue humano (HANSEN et al., 2001; GIESY; KANNAN, 2001; YAMASHITA et al., 2004; HIGGINS et al., 2005; DAVIS et al., 2007; HOUDE et al., 2008; AHRENS, 2011). PFOS é por si só um surfactante importante, pois além de inerte, é utilizado como um precursor para ainda outros surfactantes fluorados e formulações de pesticidas e agrotóxicos (KEY et al., 1998). A OCDE lista os perfluorados compostos

de C5-C18, o que abrange a maior parte dos surfactantes das AFFFs, como substância com volumes de produção de alta escala. Essa classificação corresponde aos produtos de químicos fabricados ou importados para os EUA em volumes superiores a 500.000 kg (ROGERS, 1999). Devido à presença em grande quantidade desses produtos, é fundamental que sejam conhecidas as propriedades físico-químicas, o destino ambiental, a ecotoxicidade, e a toxicologia em mamíferos (JOHNSON, 1999). A literatura recente ainda carece de trabalhos sobre as propriedades ambientais desses compostos.

A finalidade principal dos estudos é avaliar se PFCAs, PFSAs, FtS ou outros PFCs são formados a partir de precursores químicos, que representam a maioria dos PFASs ou FtS já produzidos ou utilizados. Nos estudos realizados até o momento, foi demonstrado que o número de precursores nas formulações comercialmente disponíveis, estrutura química, meia-vida de precursores, a cinética de degradação e contribuições quantitativas dos PFCs podem variar drasticamente e dependem de ambas as estruturas químicas e condições ambientais, tais como o tamanho da cadeia dos PFAS e telômeros, o tipo de ligação química, o tamanho molecular, tipo de microcosmos e outros fatores ambientais (como a temperatura). Apesar do elevado número de possíveis precursores já historicamente fabricados (OCDE, 2007), permanecem pouco conhecidos os detalhes sobre a transformação abiótica, biotransformação e biodegradabilidade de PFAS e FtS. Com exceção de alguns precursores que foram mencionados na revisão, é um fato estabelecido que informações adicionais sobre a determinação sobre os PFCs no ambiente tenha alta prioridade.

1.6.4. Métodos analíticos recentes

Como muitos outros contaminantes organohalogenados, PFAS também não existem como produtos de componentes únicos, mas sim têm uma ampla gama de diferentes comprimentos de cadeia perfluoralquil e ramificação (LEHMLER, 2005). Toda a variedade conhecida foi observada nas Figuras 8 e 9, mas existem muitas outras substâncias a serem descobertas. Infelizmente, não existem métodos analíticos e capacidades sintéticas para identificar todas os ácidos perfluorados presentes em produtos comerciais e matrizes ambientais. Atualmente, estes compostos, muitas vezes, vem sendo quantificados como equivalentes, ou seja, a

maioria como os isômeros de cadeia linear, que tendem a predominar em suas misturas de origem, restringindo assim a compreensão sobre a sua química ambiental e toxicologia (MARTIN et al., 2004). Até 60% a 90% da massa de organofluorados em águas naturais permanece não identificada, o que sugere que a grande maioria de ácidos fluorados em sistemas aquáticos ainda precisa ser descoberta (MIYAKE et al., 2007).

A maioria dos métodos de análise desenvolvidos para quantificar PFAS em amostras aquosas emprega a pré-concentração e extração em fase sólida (da sigla em inglês *solid phase extraction*, SPE) (DE VOOGT; SÁEZ, 2006). No entanto, as abordagens SPE baseadas em C18 e fases de PFCs retém muito pouco os PFCAs e PFSAs de C4-C6 e (YAMASHITA et al., 2004; TANYASU et al., 2005). Métodos baseados em permuta aniônica fraca por SPE foram desenvolvidos para PFAS aniônicos (TANYASU et al., 2008), no entanto, eles podem não ser aplicáveis para PFAS catiônico e zwitteriônico. Além disso, os métodos SPE baseados na geração de resíduos sólidos e líquidos são trabalhosos e propensos a contaminação (HUSET et al., 2011) e a perda de analitos, além de artefatos com falsos negativos (POOLE et al., 2000). Existem equipamentos automatizados que podem reduzir o trabalho associado a SPE; no entanto, esse tipo de equipamento pode não ser economicamente viável.

Alternativamente, injeção de grande volume (≥500 mL) (da sigla em inglês *large volume injection*, LVI) de amostras aquosas é vantajoso, porque é necessário um pequeno volume inicial de amostra bruta (<5 mL) e o pré-tratamento é mínimo, como por exemplo, centrifugação ou filtração. LVI utiliza uma grande parte da amostra do analito (> 60%) para o enriquecimento no início da cromatografia líquida de alto desempenho (da sigla em inglês, *high pressure liquid chromatography*, HPLC) em coluna, em contraste com a HPLC convencional em que apenas uma pequena fracção (1% a 10%) da amostra é analisada (BACKE et al., 2013).

Muitos PFAS estratificam, adsorvem à superfícies (HOLM et al., 2004) e se agregam (LÓPEZ-FONTAN et al., 2005), que resulta na perda aparente de amostras durante algumas metodologias. Estas perdas aparentes são eliminadas por extração líquido-líquido (da sigla em inglês *liquid-liquid extraction*, LLE) porque os analitos são extraídos para um solvente orgânico. Filtração não é necessária para LLE, pois assim os analitos adsorvidos em material particulado em suspensão são potencialmente co-extraídos (GONZALES-BARREIRO et al., 2006). No entanto, os métodos LLE

convencionais utilizam tipicamente volumes de amostra de até 1000 mL, sendo 120 mL de solvente orgânico para a extração, que devem ser ainda passados pela evaporação do solvente (CHIRON et al., 1993; GONZALES-BARREIRO et al., 2006). Embora LVI seja aplicada para utilização com amostras aquosas (CHIAIA et al., 2008), as LVI de extratos orgânicos ainda precisam ser estudados, pois podem ser incompatíveis a de grandes volumes de solvente orgânico (extrato) com HPLC de fase reversa. No entanto, PFAS não são propensos a perda em solventes orgânicos e, assim, as abordagens analíticas mais funcionais integram técnicas de extração de simples com solventes orgânicos associada à injeção de grande volume na etapa de cromatografia.

1.6.5. Resumo sobre a nomenclatura dos PFCs

A Figura 12 simplifica resumidamente toda a coleção de siglas utilizadas para descrever as substâncias perfluorcarbonadas das AFFFs. Em geral, todos os compostos são chamados de PFCs (perfluorcarbonados). Dentre todos os compostos identificados existem duas grandes categorias: perfluoralquilados precursores de cadeia longa (PFAS precursores) e os fluortelômeros sulfonados (FtTAoS) ou álcoois (FTOH). Enquanto os PFAS se degradam em forma intermediárias de ácidos perfluoralquil carboxílicos (PFCA) e ácidos perfluoralquil sulfonicos (PFSA), os fluortelômeros se degradam em formas intermediárias de fluortelômero sulfonados (FtS) e fluortelometos butiratos (FtB). Entretanto existem alguns metabólitos intermediários de PFCs fluortelomerados, como o PFHxS e PFBA que se encaixam na categoria de perfluoralquilados intermediários (PFAS). Por fim, todos os compostos se degradam na última forma de perluoroctanoato (PFOA) ou perfluoroctano sulfonados (PFOS). De modo a facilitar a compreensão e simplificar o esquema das Figura 12, os PFOA e PFOS foram destacados como substâncias separadas, mas são classificados como PFAS.

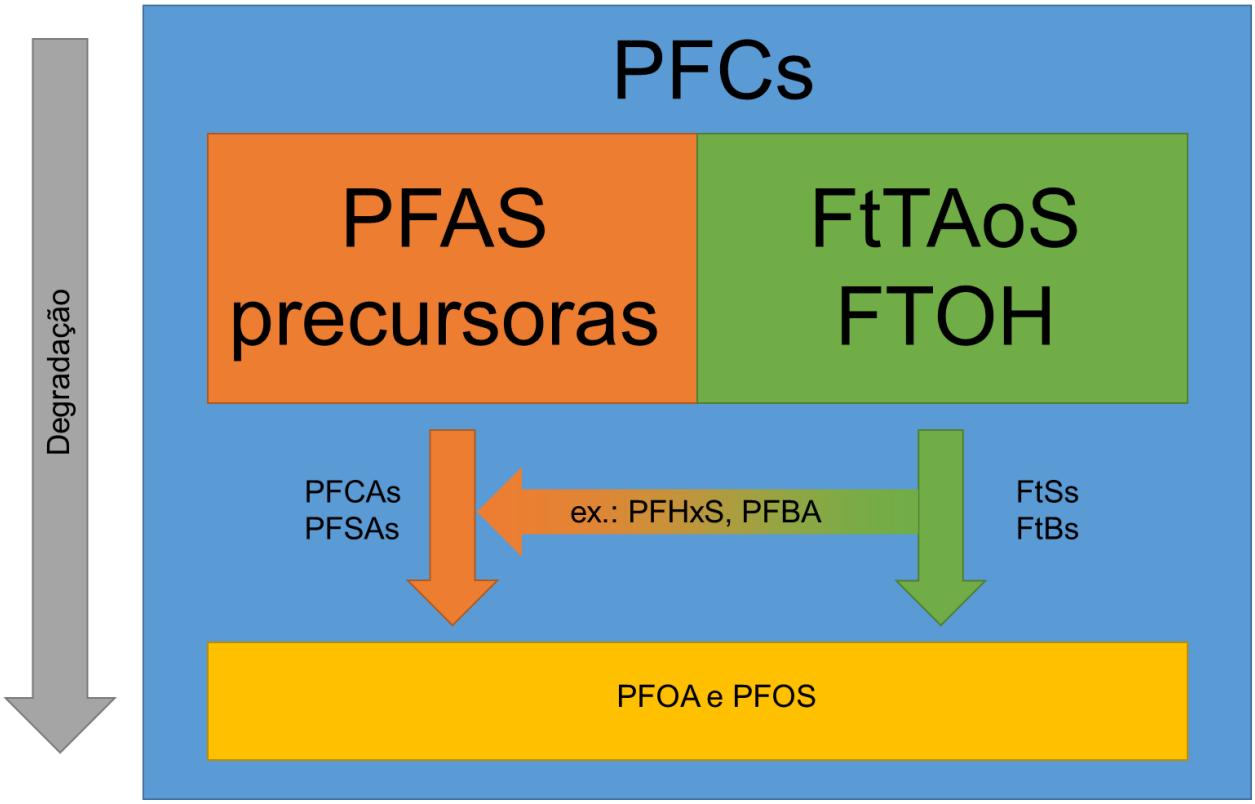


Figura 12 – Resumo da nomenclatura usual para fluorcarbonados e suas rotas de degradação. Fonte: Elaborada pelo autor.

A nomenclatura dos PFCs encontrados nas AFFFs ainda está em constante evolução conforme novas substâncias são encontradas. A descoberta de novas substâncias só está sendo possível agora que as metodologias analíticas permitem a descrição precisa de moléculas antes desconhecidas. Por ser uma área relativamente nova, ainda há grande discussão sobre a padronização e tendências oficiais de nomenclatura. Um exemplo disso é o uso do termo PFAS, em que a letra S da sigla pode incorretamente levar a pensar que se trata de um composto sulfonado, afinal todos as outras siglas contendo a letra S corresponde a um PFC sulfonado (por exemplo a letra S em PFSA, FtS ou FtTAoS). Entretanto, apenas no caso de PFAS, a letra S faz referência a palavra “substância”, pois a sigla completa, do inglês *poly- and per-fluoroalkyl substance* significa “substância poli- e per- fluoralquiladas”. Preferiu-se utilizar as siglas em inglês nessa tese para ser compatível com a nomenclatura usualmente utilizada na literatura.

1.7. Produção de AFFF

Os dois processos principais utilizados na fabricação de surfactantes fluorados são a fluoração eletroquímica (também chamada de eletrofluoração) e a fluortelomeração (MOODY; FIELD, 2000), comparados na Tabela 4. Os produtos provenientes do primeiro processo contêm um grupo sulfonil. Os produtos do segundo processo de produção (telômeros) contêm um grupo etileno. Perfluorooctano sulfonilfluorido (POSF) é o mais importante intermediário de produção para fluoração eletroquímica. FTOH, por sua vez, é uma substância mais importante da produção de telômeros.

Tabela 4 – Comparação entre os tipos de AFFF baseados no modo de produção

Fluoração eletroquímica	**Fluortelomeração**
$C_8H_{17}SO_2X \overset{HF}{\rightarrow} C_8F_{17}SO_2 - X$ onde X = F, Cl	$xCF_2 = CF_2 \overset{IF_5}{\rightarrow} F(CF_2 - CF_2)xI$ onde x = 3, 4, 5, 6 ou 7
30% de cadeias ramificadas	Cadeias lineares
PFAS em geral (ex.: PFOA, PFOS, PFCA)	Fluortelômeros em geral (ex.: FtS, FtTAoS)
Cadeias de 4, 5, 6, 7, 8 e 9 carbonos	Cadeias de 6, 8, 10, 12 e 14 carbonos
Fabricantes: 3M, Bayer, Miteni	Fabricantes: Ansul, Dupont, Chemguard

(Adaptado de Parsons et al., 2008)

Com fluoração eletroquímica (Tabela 4), a substância a ser fluorada é dissolvida em ácido fluorídrico e uma corrente elétrica passa através dos meios de reação (HUDLICKY; PAVLATH, 1995). Todas as moléculas de hidrogênio são substituídas por flúor resultando em moléculas perfluorados. Apesar de baixo rendimento dos compostos perfluorados e muitos produtos secundários, a fluoração eletroquímica é economicamente atraente pelos custos relativamente baixos da eletricidade e do reagente de fluoreto de hidrogênio (HUDLICKY; PAVLATH, 1995).

No processo de fluortelomeração (Tabela 4) ocorre uma reação com uma molécula chamada telogen, com duas ou mais insaturações que criam um telômero que contém apenas números pares de átomos de carbono (KISSA, 1994). Devido ao fato de PFCs com números pares e ímpares de carbono resultarem de fluoração eletroquímica, os surfactantes de carbono perfluorados no ambiente podem, potencialmente, serem rastreados para os fabricantes que usam o processo de fluoração eletroquímica ou fluortelomeração (MOODY; FIELD, 1999).

As propriedades de hidrocarbonetos e, portanto, os surfactantes, são significativamente alteradas quando os átomos de flúor são substituídos por átomos de hidrogênio (KISSA, 1994). Quando flúor é um substituinte em compostos orgânicos, propriedades químicas únicas são observadas, devido à eletronegatividade do flúor, bem como a sobreposição entre os orbitais 2p e 2s de flúor e os correspondentes orbitais de carbono (HUDLICKY; PAVLATH, 1995). A presença de átomos de flúor contribui para a rigidez de cadeias dos hidrocarbonetos perfluorados (KEY et al., 1997) em relação a cadeias de hidrocarbonetos. A ligação flúor-carbono é altamente polarizada e a mais forte de ligações covalentes conhecidas com a energia de ligação média C-F em cerca de 25 $kcal.mol^{-1}$ mais forte do que a correspondente ligação C-Cl em monocloroalcanos. Além disso, fluoração normalmente reforça as ligações C-C adjacentes (HUDLICKY; PAVLATH, 1995).

Os surfactantes perfluorados são mais estáveis termicamente do que os seus análogos hidrocarbonetos correspondentes. Em particular, PFCAs e PFASs são considerados os grupos de PFCs mais estáveis termicamente. Além da estabilidade térmica, os surfactantes perfluorados são estáveis a ácidos, bases, oxidantes e redutores. Esta estabilidade permite aos compostos fluorados permanecerem intactos em ambientes onde surfactantes de hidrocarbonetos são degradados (KISSA, 1994).

O custo de surfactantes fluorados é maior do que os de hidrocarbonetos. Por causa dos altos preços dos surfactantes fluorados, aplicações de PFCs estão limitados a problemas que surfactantes convencionais, de menor preço, não poderiam resolver (CROSS, 1998). Dentro de uma aplicação específica, surfactantes fluorados apresentam tipicamente a melhor relação entre custo e benefício, pois seu preço relativamente elevado é compensado pelas baixas concentrações necessárias para alcançar a diminuição da tensão interfacial ou para formar soluções micelas. Em algumas aplicações, tais como AFFF, uma mistura de um agente surfactante fluorado e um surfactante à base de hidrocarbonetos é mais eficaz em termos de custos e com

melhor desempenho do que qualquer outro agente tensoativo separadamente (MOODY; FIELD, 2000).

1.7.1. Principais fabricantes

Desde o desenvolvimento inicial da AFFF em 1966, sete fabricantes diferentes desenvolveram AFFFs que correspondiam às especificações militares, e um subconjunto delas foi comprado em contrato em grandes quantidades pelos militares (Figura 13). Existem muitos fabricantes de AFFF, cada um deles com uma formulação diferente. Os compostos exatos são protegidos por patentes e não são divulgados com precisão pelos fabricantes, o que é um empecilho para o estudo quantitativo desses compostos. A composição das AFFF comerciais varia entre fabricantes. A AFFF produzido e exportado pela 3M e Ansul são os mais comumente encontrados no mercado, sendo o último exportado para muitos países, incluindo o Brasil.

De fato, as patentes norte-americanas relacionadas com formulações AFFF contém informações muito limitada sobre os grupos funcionais e os possíveis comprimentos da cadeia perfluoralquil de componentes químicos fluorados. Apenas um banco de dados foi compilado, que continha as massas e fórmulas elementares de apenas alguns dos compostos químicos fluorados AFFF que poderiam ser potencialmente identificados nas patentes.

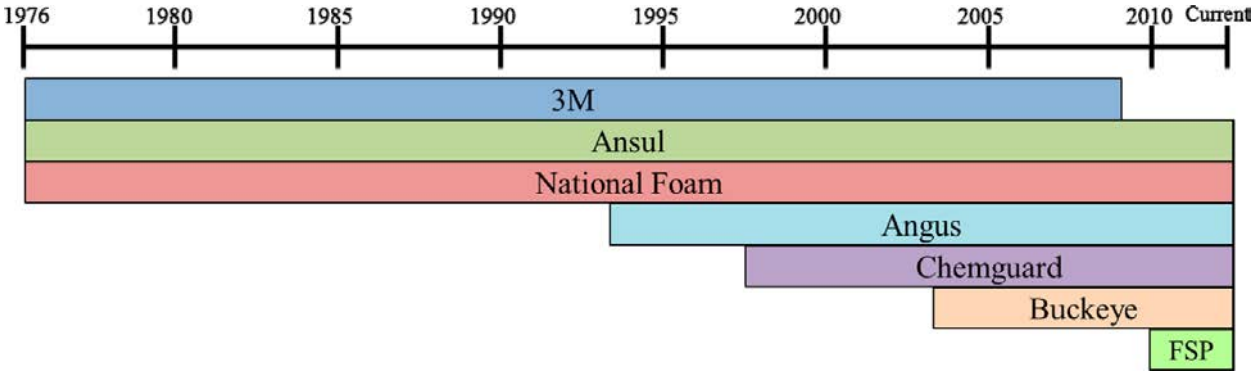


Figura 13 - Fabricantes de espumas de incêndio e seu histórico de produção para os militares nos EUA. Fonte: Reproduzido de Place e Field (2012).

Place e Field (2012) utilizaram extensivamente a espectrometria de massa associada ao bombardeamento de átomos em alta velocidade (da sigle em inglês *fast atom bombardment – mass spectrometry*, FAB-MS, que ao contrário da maioria dos

métodos de cromatografia associada à espectrometria de massa (da sigla em inglês *liquid chromatography – mass spectrometry / mass spectrometry*, LC-MS / MS) não necessita de conhecimento prévio dos analitos de interesse, para analisar amostras de AFFF por diferentes fabricantes. O FAB-MS utiliza dados como intervalos de massa, acidez / basicidade, composição de misturas e concentração para descobrir quais são as substâncias testadas. Utilizaram também a espectrometria de massa de alta resolução (da sigla em inglês *high resolution mass spectrometry*, HRMS) com separação cromatográfica para permitir a determinação precisa da massa de íons e, assim, determinar as composições de elementos específicos (GROSS, 2004). No entanto, o maior obstáculo é que a verificação completa por HRMS fornece uma grande quantidade de dados que tem de ser reduzidos, a fim de identificar compostos de interesse (KELLMANN et al., 2009). Finalmente, a informação sobre a estrutura química de cada formulação de cada fabricante foi comparada às patentes públicas. Os resultados da análise das principais formulações de AFFF disponível comercialmente pelo uso do FAB-MS desse grupo de pesquisa estão resumidas nos itens a seguir:

- 3M AFFF: o espectro de FAB-MS da AFFF 3M obtido em modo de ionização negativa continha relação massa / carga (m / z) 50, o que é uma característica dos compostos sintetizados a partir de fluoração eletroquímica (FIELD et al., 2003). Na AFFF 3M, PFSA com C6-C8 foram identificadas em todos os componentes testados, e isto é consistente com a detecção de PFOS frequentemente encontrado em águas subterrâneas impactadas por AFFF. Existem pesquisas atuais na Universidade da Califórnia em Berkeley que buscam determinar por LC-MS / MS os componentes vestigiais PFCAs na AFFF (HOUTZ et al., 2015 - trabalho não publicado). Além disso, AFFF 3M apresentou compostos de PFAS de C4-C6 contendo funcionalidades ácido carboxílico e amina terciária (PLACE; FIELD, 2012);
- National Foam AFFF: os produtos químicos fluorados principais foram detectados na razão m / z 100 em ambos modo positivo e negativo do FAB-MS, os quais correspondem a unidades que são características de produtos químicos fluorados telomerados. Os íons alvejados foram identificados como a 4:2, 6:2, 8:2, e 10:2 FtS com dimetil amina quaternária e grupos funcionais de ácido carboxílico. Em menor abundância foram identificados com os íons com razão m / z -58 similares ao 4:2 FtS, que estão relacionadas com a mesma

estrutura mas sem a funcionalidade ácido acético terminal. Resultados sugerem que estes compostos podem resultar como produto secundário da síntese do composto principal betaína (PLACE; FIELD, 2012);

- Ansul AFFF: modo de ionização negativa das análises FAB-MS para Ansul AFFF revelou dois íons abundantes com característicos de fluorotelômeros em ± m / z 100. Os principais componentes identificados na Ansul AFFF foram a 6:2 e 8:2 FtTAoS em m / z 586 e 686, respectivamente. Esta estrutura aparece em patente (CLARK; KLEINER, 1997) e um número limitado de outros relatórios sobre a composição da AFFF (SCHULTZ et al., 2004). Ambos são conhecidos por fazer parte da mistura disponível comercialmente como Lodyne. Um íon de menor abundância foi identificado a m / z 602, o que corresponde a uma diferença de massa de m / z de 15,9940 a 6:2 FtTAoS e é, provavelmente, pela a adição de um átomo de oxigénio à molécula. A identidade desta classe PFC não foi determinada a partir dos dados espectrais de massa nem de patentes e pode ser uma impureza. O 6:2 FtS também foi relatado como sendo detectado por LC / MS / MS em Ansul AFFF, mas o método de FAB-MS foi incapaz de detectar FtS. A falta de identificação do FtS em formulações AFFF ocorreu, provavelmente, devido aos limites de detecção da técnica, e foi um dos fatores que motivou o trabalho desta tese para um método quantitativo por LC-MS / MS capaz de determinar esses componentes vestigiais (PLACE; FIELD, 2012);
- Chemguard AFFF: o espectro de FAB-MS dos anos de fabricação mais recentes mostrou nenhum padrão característico de produtos químicos fluorados detectados através de ionização positiva e negativa FAB-MS, mas houve um único pico forte detectada a m / z 586, que foi previamente identificado como o 6:2 FtTAoS. Os outros homólogos do FtTAoS (4:2, 8:2, 10:2) podem estar presentes em concentrações inferiores ao limite de detecção especificado (PLACE; FIELD, 2012).

Recentemente, a 3M anunciou que, com base em dados coletados internamente, iria interromper a produção de PFOS porque o composto foi detectado em níveis de parte por bilhão (ppb) em amostras de sangue obtidas a partir de bancos de sangue nos Estados Unidos, Japão, Europa e China, além de ser persistente no ambiente (BROWN; MAYER, 2000). A 3M planejou interromper a produção de PFOA

em quase todos os produtos, no entanto, a 3M aponta que alguns níveis de produção de PFOS, supostamente mais baixos devem continuar para utilização em espumas de combate a incêndios (TULLO, 2000).

1.8. Liberação da AFFF no ambiente

Toneladas de AFFF são liberadas no ambiente, pois sua aplicação é fundamental no controle de diversos incêndios na indústria do petróleo. De fato, em situações de incêndio, o uso racionado, visando menor liberação e consequente menor impacto ambiental de AFFF, não é uma opção, pois situações de incêndio em hidrocarbonetos representam sério risco à vida e aos patrimônios locais. As AFFFs são imprescindíveis pela à sua efetividade na prevenção de danos colaterais e re-ignição de incêndios nesses locais.

Surfactantes compostos por PFCs são persistentes, bioacumuláveis, tóxicos e contaminantes. Por isso, a preocupação com a sua ocorrência no ambiente tem aumentado nos últimos anos (KISSA, 1994). Eles foram detectados em muitas amostras ambientais (GIESY; KANNAN, 2002), incluindo ar, águas superficiais (MURAKAMI et al., 2008; PLUMLEE et al., 2008), água potável (SKUTLAREK et al., 2006), águas residuais (SINCLAIR; KANNAN, 2006), águas de chuva (KIM; KANNAN, 2007), águas subterrâneas (SCHULTZ et al., 2004) e solo (HIGGINS et al., 2005). PFCs também foram encontrados acumulando-se na biota, incluindo mamíferos (GIESY; KANNAN, 2002) e seres humanos (KANNAN et al., 2004; HÖLZER et al., 2008).

Os PFCAs, PFSAs e seus precursores potenciais têm atraído a atenção como contaminantes globais (BUCK et al., 2011). PFCAs e PFSAs de cadeia longa são descritos como muito problemáticos pois são altamente persistentes (PARSONS et al., 2008; FRÖMEL; KNEPPER, 2010), bioacumuláveis e foram detectados espalhados quase que universalmente em ambientes abióticos (RAYNE; FOREST, 2009), na biota (GIESY; KANNAN, 2001), nos alimentos (CLARKE; SMITH, 2011) e nos seres humanos (VESTERGREN; COUSINS, 2009). Como resultado os PFOS e substâncias relacionadas à base de fluoreto de perfluorooctano sulfonil (POSF) foram restritos quanto à produção e utilização pela da Convenção de Estocolmo, em 2009. Cadeias de PFCAs contendo de C11-C14 foram identificados como produtos químicos muito persistentes e muito bioacumuláveis, e foram incluídos na lista de substâncias

candidatas que suscitam elevada preocupação no âmbito da regulamentação europeia de produtos químicos, REACH (ECHA, 2013). Em 2013, os PFOAs e perfluorooctanoate de amônia (APFO) foram listados como substâncias candidatas que suscitam elevada preocupação ECHA (2013).

As AFFFs são predominantemente liberadas sob a forma de espuma líquida em incêndios (Figura 14), o que aumenta o potencial dos PFAS para penetrar nos ambientes aquáticos. Vários estudos têm apontado o uso de AFFF como origem exclusiva de PFAS para as águas subterrâneas (MOODY; FIELD, 1999; MOODY et al., 2003; SCHULTZ et al., 2004; HOUTZ et al., 2013.), água potável (WEISS et al., 2012), águas superficiais (DE SOLLA et al., 2012; AHRENS et al., 2015) e biota (OAKES et al., 2010; GEWURTZ et al., 2014). Um dos primeiros estudos para resolver os problemas com vazamento de AFFFs e contaminação por PFAS das águas subterrâneas em um aeródromo militar foi feito pela MOODY; FIELD (1999). PFOS é a PFAS mais predominante em locais contaminados por AFFF e foi detectado em concentrações >600 $ng.L^{-1}$ nas águas de superfície e em centenas de $ng.g^{-1}$ em peixes (AWAD et al., 2011). No entanto; há uma falta de conhecimento sobre a distribuição e raio de difusão dos PFAS dos locais contaminados para o ambiente circundante.

Figura 14 – Liberação de grandes volumes de AFFF durante incêndio do avião da China Airlines em Okinawa (Japão) em 2007. Fonte: Reproduzido de Reuters (2007).

O influxo ao meio ainda pode ocorrer através de quatro vias: (i) a liberação de PFCs voláteis para a atmosfera (DINGLASAN-PANLILIO; MABURY, 2006), onde são fotoquimicamente oxidados (ELLIS et al., 2004) e de volta para o ciclo da água por precipitação atmosférica; (ii) descarregados por estações de tratamento de águas residuais (YU et al., 2009); (iii) descarga por escoamento urbano contaminada por fontes difusas (ZUSHI; MASUNAGA, 2009; HOUTZ; SEDLAK, 2012), e (iv) a infiltração de locais de eliminação e de derrames em águas subterrâneas (MOODY; FIELD, 1999; MOODY et al., 2003).

Fontes ambientais de PFC são geralmente de difícil caracterização, pois compostos perfluorados são usados em uma ampla variedade de produtos e aplicações, e não apenas espumas de incêndio. Os compostos estão dispersos por todo o mundo e passam por vias de transformação complexas pouco conhecidos ainda (GIESY; KANNAN, 2002; PREVEDOUROS et al., 2006), mas geralmente resultam como última forma PFOA e PFOS correspondentes ao comprimento dos seus precursores.

Portanto, a identificação da fonte é uma tarefa desafiadora. Em alguns casos, isto pode ser abordado pelo conhecimento das atividades locais específicas e comparados à composição esperada das amostras (MOODY et al., 2003; SCHULTZ et al., 2004). Em outros casos, a fonte de PFCs pode ser traçada através do estudo da distribuição espacial das concentrações e a proporção de componentes diferentes, por exemplo, o PFOA / PFOS (KIM; KANNAN, 2007) e razão entre PFHpA / PFOA (SIMCIK; DORWEILER, 2005). Em água contaminada por AFFF, os valores de PFOA / PFOS e PFOA / 6:2 FtS podem indicar até mesmo o tempo que as amostras estão no ambiente (SCHULTZ et al., 2004). Outros estudos com razão PFOA / PFOS incluem detecção em lagos (Kim; KANNAN, 2007), água de escoamento tempestade (LIEN et al., 2008), água do rio urbano (SAITO et al., 2004) e para águas residuais (YU et al., 2009).

Detecção de PFOA e PFOS no ambiente, humanos e da biota em geral tem sido amplamente documentada (GIESY; KANNAN, 2001; YAMASHITA et al., 2005; HIGGINS et al., 2005; DAVIS et al., 2007; HOUDE et al., 2008; AHRENS, 2011). Contudo, os precursores PFAS e FtTAoS também foram encontrados em diferentes compartimentos ambientais, embora com menos frequência, simplesmente porque eles são menos incluídos nas análises ambientais. Muitos produtos químicos PFAS são detectados no ar ou associada com a matéria em partículas no ar, assim como telomerados, incluindo os FTOHs e FtS (variando entre 4:2 a 10:2 FTOHs ou FtS), diésteres de fosfato fluorotelomerados, N-etil perfluorooctano sulfonamida (N-EtFOSA), N-metil sulfonamidoetanol perfluorooctano (MeFOSE) entre outros (BARBER et al., 2007; DREYER et al., 2009; HAUG et al., 2011; WEINBERG et al., 2011). Os PFCs precursores (PFAS precursores e FtTAoS) foram detectados na água da chuva, na água do rio, nos efluentes de tratamento de esgoto, e do solo tratado com lodo de origem industrial (MAHMOUD et al., 2009; YOO et al., 2010).

1.8.1. Caso do incêndio no Brasil (Paulínia-SP, 1993 e Santos-SP, 2015)

A comercialização de AFFF ocorre em grande escala para municípios brasileiros para ser utilizado por bombeiros, aeroportos, militares e setores da indústria do petróleo. No Brasil, não existem dados oficiais quanto à liberação ambiental desse produto, mas acredita-se que seja um volume alto, dado o seu amplo uso em casos recentes, como o incêndio da plataforma de Petróleo Cherne II, na bacia

de Campos, no norte fluminense em janeiro de 2011 (FOLHA DE SÃO PAULO, 2011) e na unidade de produção de gasolina e GLP da Refinaria de Duque de Caxias (REDUC) da Petrobras, no Rio de Janeiro em setembro de 2010 (O GLOBO, 2010). Aeroportos e campos de treinamento militar são também consumidores e potenciais liberadores dessa substância.

No Brasil, um exemplo de uso da AFFF em maior escala foi no incêndio ocorrido na Refinaria do Planalto Paulista (Replan), localizada em Paulínia / SP, em 8 de janeiro de 1993, sendo este o maior incêndio já ocorrido em refinarias de petróleo no Brasil (Figura 15). Um tanque cheio com capacidade máxima de 15 milhões de litros de óleo diesel foi atingido por um raio, que provocou a ignição da mistura de gases inflamáveis contida nele e, imediatamente, uma explosão seguida de incêndio. A eficiência do combate de um incêndio de grandes proporções foi de extrema importância. As chamas atingiram uma área de 4300 m^2, com labaredas de mais de 40 m de altura, produzindo uma fumaça que se estendia por mais de 50 km de extensão (FIGUEREDO et al., 1999).

Figura 15 - Combate ao incêndio ocorrido na Replan usando espumas extintoras do tipo AFFF. Fonte: Capturado de vídeo por Gifel Engenharia de Incêndio (1998).

O maior risco era de que o fogo se alastrasse e atingisse os tanques vizinhos, provocando prejuízos altos e representando uma ameaça ao ambiente. Bombeiros da Replan iniciaram, então, a extinção do fogo que atingia as bacias de contenção com aplicação de jatos da AFFF e o resfriamento do tanque atingido e dos adjacentes utilizando jatos de água, enquanto estratégias de combate eram definidas pelos técnicos da Replan, em colaboração com o Corpo de Bombeiros de Campinas e o Plano de Auxílio Mútuo Municipal. Foram necessárias 12 horas para o controle e a

extinção do fogo, sendo consumidos 4 milhões de litros de óleo diesel e liberados 37 mil litros de AFFF, num prejuízo total de cerca de R$ 7.780.000,00, entre diesel consumido, combate ao fogo e reparo dos equipamentos (valor considerando a inflação entre 1993 a 2015, de acordo com WolframAlpha, 2015). Todo o processo envolveu a mobilização de 100 bombeiros, civis e militares, para conter o incêndio (FIGUEREDO et al., 1999).

Recentemente, todo o estoque disponível no Brasil de espumas utilizadas no combate a incêndios foi utilizado para extinguir as chamas do acidente ocorrido nos tanques da refinaria de Santos (FOLHA DE SÃO PAULO, 2015). O incêndio, que se iniciou no segundo dia de abril só foi eliminado após 8 dias de trabalho intenso de centenas de profissionais do Corpo de Bombeiros do Estado de São Paulo. Cerca de 40 milhões de litros de combustível foram queimados no incêndio. O fogo foi tão intenso que foi necessária até mesmo a importação de mais dessas espumas para controlar a situação.

1.8.2. Bioacumulação e Toxicidade da AFFF

Foi apresentado que devido à forte ligação entre flúor e carbono, PFOS e PFOA não são facilmente degradados por mecanismos físicos ou químicos, uma vez que foram liberados no ambiente. Uma longa série de estudos têm documentado que eles são presentes quase que universalmente no meio ambiente e na vida selvagem (BAO et al., 2009; HOUDE et al., 2011; LOOS et al., 2010). PFCs também foram encontrados em minks suecos (PERSSON et al., 2013), peixes (OAKES et al., 2010) e tartarugas marinhas canadenses (SOLLA et al., 2012).

A toxicologia de PFOS é, principalmente, associada ao aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol no fígado, diminuição do colesterol no soro, hipolipidemia, e redução no consumo de alimentos em macacos-cinomolgo (BUTENHOFF et al., 2002 e SEACAT et al., 2002). Além disso, existe também a toxicidade de PFOS no desenvolvimento hepatotoxicidade, imunotoxicidade e neurotoxicidade em mamíferos, tais como ratos (FUENTES et al., 2007, JOHANSSON et al., 2009, PEDEN -ADAMS et al., 2008 e THIBODEAUX et al., 2003) e peixes como *zebra-fish* (HUANG et al., 2010), carpa comum (HAGENAARS et al., 2008) e vairão (ANKLEY et al., 2005). Alguns dos processos comprometidos por esses PFAS são a transferência e o metabolismo de ácidos graxos, a integridade da membrana celular, a função

mitocondrial, a atividade da glutationa peroxidase do fígado, atividade da superóxido dismutase e redução dos níveis hormonais da tiróide (LAU et al., 2009).

As propriedades físicas da AFFF também têm potencial de causar danos à biota. AFFF lançada em um rio da Florida, em 1993, foi objeto de investigação como uma possível causa de doenças em aves marinhas e mortes na região (KINNER, 1998). Por analogia com surfactantes de hidrocarbonetos, surfactantes perfluorados em AFFF vindos de águas residuais podem potencialmente fazer com que as aves percam seus óleos naturais e morram por hipotermia (STICKLEY et al., 1986).

Além disso, PFOA e PFOS não são facilmente removidos por processos de tratamento de água potável convencionais (ESCHAUZIER et al., 2012; XIAO et al., 2013; RAHMAN et al., 2014). Por se tratar de um novo tipo de contaminante, não estão incluídos na rotina do controle de qualidade da água potável. Estes dois produtos químicos foram detectados em dezenas de $mg.L^{-1}$ para mais de 95% das amostras recolhidas em diversas amostragens de sangue humano nos EUA em concentrações elevadas. A frequência de detecção de concentrações foi geralmente muito mais elevada do que outros produtos químicos ambientais presentes no sangue humano. Vários outros PFASs também foram detectados em amostras de sangue humano (LOI et al., 2013), mas a níveis muito mais baixos do que os PFOS e PFOA (Figura 16).

Figura 16 – Exposição inadequada à AFFF após incêndio em hangar no aeroporto de Long Beach, EUA em 1998 pode ser uma das fontes de contaminação. Fonte: Reproduzido de AP Photo / Press-Telegram (1998).

Riscos potenciais para a saúde decorrente à exposição a estes dois compostos incluem baixo peso ao nascer (FEI et al., 2007), menopausa precoce em mulheres (KNOX et al., 2011), a baixa fertilidade do sêmen em homens jovens (JOENSEN et al., 2009) e doença da tiróide na população geral adulta dos EUA (MELZER et al., 2010). Outros estudos ainda ligam vagamente os PFCs ao transtorno de déficit de atenção / hiperatividade infantil (HOFFMAN et al., 2010) e baixa a resposta imune à vacinação (GRANDJEAN et al., 2012). Estudos também têm sugerido uma associação entre a exposição ao PFOA e insuficiência renal e câncer testicular em comunidades do entorno uma fábrica de PFAS (BARRY et al., 2013). Existem várias rotas através do qual PFOS e PFOA podem entrar no corpo humano, sendo que a ingestão de águas subterrâneas contaminadas tem se mostrado uma importante via de exposição (EMMETT et al., 2006; WEISS et al., 2012), especialmente para as comunidades em proximidade de uma grande fonte de contaminação, tais como unidades de fabricação de fluorpolímeros ou próximos aos corpos de bombeiros locais (HOFFMAN et al., 2010).

O potencial de bioacumulação tem sido bem estudado em termos de meia vida de eliminação sérica do PFBA, PFBS, PFHxA, PFHxS, PFOA e PFOS em seres humanos e mamíferos. PFHxS tem meias-vidas semelhantes ou mesmo mais longa do que PFOS em todos os animais testados (com exceção de ratas fêmeas) e em seres humanos, o que torna o PFHxS inadequado como uma alternativa aos PFOS. Em relação aos níveis de exposição absolutos, um estudo recente sobre as tendências sazonais de PFCAs e PFSAs no soro de mulheres na primeira gravidez na Suécia entre 1996 e 2010 observou aumento acentuado de PFBS e PFHxS ao longo do tempo (GLYNN et al., 2012). Observações semelhantes de uma tendência crescente de exposição ao PFHxS desde 2006 nos EUA também têm sido relatados por Kato et al. (2011).

Vários estudos encontraram diferenças significativas entre as concentrações séricas em humanos do sexo feminino e masculino, de ambos os PFOS e PFOA (CALAFAT et al., 2007; TOMS et al., 2009), com os homens apresentando concentrações mais elevadas do que as mulheres. Por exemplo, em dados de *South East Queensland*, na Austrália, onde o estudo foi realizado, foram reunidas amostras classificadas por idade (30 indivíduos). A concentração de PFOS média masculina foi de 23,3 $ng.mL^{-1}$, em comparação com 18,4 $ng.mL^{-1}$ nas mulheres. Toms et al. (2014) olhou para as tendências nas concentrações séricas PFAS de australianos entre 2002

e 2011. Eles descobriram que os homens apresentaram maiores concentrações de PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS dos 15 anos aos 60 anos de idade, e depois de 60 anos de idade, homens e mulheres tiveram concentrações semelhantes. A diferença foi associada à perda de PFCs junto com o sangue durante a menstruação.

Não apenas os PFCs são tóxicos. Vários agentes presentes na AFFF foram considerados ligeiramente tóxico para a vida marinha em concentrações próximas de 6,0 $g.L^{-1}$ (SALAZAR, 1985). Os componentes adicionais encontrados em formulações de AFFF concentrado são os inibidores de corrosão, tais como toliltriazol. Recentes estudos toxicológicos sobre toliltriazol têm mostrado que estes compostos têm toxicidade moderada a alta (CANCILLA et al., 1998). No entanto, as avaliações de toxicidade reais sobre misturas de AFFF em águas residuais no meio ambiente são difíceis porque efluentes contendo AFFF são misturas complexas com muitos componentes misturados a outros poluentes primários, bem como sub-produtos do incêndio em que foram aplicados, que poderiam ser tóxicos. Além disso, a degradação ocorrida durante o transporte de componentes da AFFF podem mudar a composição da mistura e toxicidade em função da distância e tempo. A toxicidade dessas misturas complexas é difícil de avaliar por causa dos possíveis efeitos sinérgicos entre os componentes da mistura, o que torna difícil prever, *a priori*, a toxicidade no ambiente.

A liberação de surfactantes fluorados em águas de superfície não é recomendada pelos fabricantes AFFF como rota de escoamento em águas residuais (3M, 1999). Felizmente, os relatos de descargas de grande volume de AFFF nas águas residuais são limitados.

1.9. Regulamentação do uso de AFFF

A legislação brasileira atesta erroneamente a AFFF 3% e 6% como um Líquido Gerador de Espuma (LGE), não tóxico e biodegradável. Os fabricantes comercializam esses produtos para aeroportos, bases militares e Petrobrás sem atestar, de fato, os fatores de biodegradabilidade e toxicidade desses produtos. A Norma ABNT NBR 12615 e ABNT NBR 11830, em vigor desde 25/03/92, superam os requisitos da norma Petrobrás N-1886 (1983) e torna tais substâncias aprovadas para a comercialização, sem a preocupação com contaminações ambientais subsequentes. Atende também ao Método de Simulação de Incêndio – eficiência nível B - do Manual de serviços de aeroportos – Doc 9137 – NA / 898 Parte 1 da ICAO – Organização de Aviação Civil,

embora estudos tenham sugerido a problemática ambiental causada por tais substâncias. Não há menção específica sobre limites aos PFCs na formulação das AFFFs.

Nos Estados Unidos, o governo federal estabelece desde 2009 valores recomendados de liberação de 0,4 e 0,2 $\mu g.L^{-1}$ de PFOA e PFOS, respectivamente. Foi exigido no congresso americano que 8 companhias fabricantes de compostos fluorados lançassem um programa de 5 anos, começando em 2010, com a meta de eliminar o PFOS e PFOA do processo produtivo (USEPA, 2009a).

Os governos estaduais dos EUA têm regras específicas e variam em cada estado. O departamento de saúde de Minnesota estabelece o limite de 0,3 $\mu g.L^{-1}$ de PFOA e PFOS em água potável. Os limites para PFBS e PFBA são mais altos, e podem atingir 7 $\mu g.L^{-1}$. Em New Jersey, o departamento de proteção ambiental, define limites mais rígidos que o departamento de saúde, considerando seguro níveis inferiores a 0,04 $\mu g.L^{-1}$ em água potável. O estado de Virgínia proíbe o consumo e água em aquíferos contendo mais que 0,5 $\mu g.L^{-1}$ de PFOA. O estado de Carolina do Norte é o mais permissivo e abrangente, pois estabelece o consume seguro de no máximo 1,5 $\mu g.L^{-1}$ de qualquer PFC (USEPA, 2009b).

Na Europa, o EU REACH (como é chamado o acordo de regulamentação em questões de segurança ambiental) defende o uso limitado de PFOA e PFOS. O governo federal da Alemanha recomenda cuidado quanto a concentrações de 0,1 $\mu g.L^{-1}$ e define o limite máximo em 0,3 $\mu g.L^{-1}$.

1.10. Biodegradabilidade de AFFF

Antes da crescente preocupação com a pesquisa dos PFCs das AFFFs, havia uma quantidade considerável de literatura sobre como ocorre a quebra biológica e química da ligação entre flúor e carbono no ambiente. A maior parte dos trabalhos no passado, contudo, referiam-se a compostos químicos orgânicos com um átomo de flúor apenas ou compostos aromáticos contendo flúor (KEY et al., 1997; NATARAJAN et al., 2005; NEILSON; ALLARD, 2002). Somente recentemente, Parsons et al. (2008) e Frömel e Knepper (2010) apresentaram revisões abrangentes em sobre a biodegradação de PFASs, sendo que a termodinâmica da defluoração microbiana foi especialmente bem discutida por Parsons et al. (2008).

Em geral, a degradação por microrganismos (biodegradação) é um dos mecanismos mais importantes no qual os contaminantes orgânicos são removidos do ambiente. No entanto, todas as vias de biodegradação e destino final de PFCs são ainda desconhecidos. A força da ligação entre carbono e flúor é geralmente o principal fator de limitação da biodegradabilidade dos PFCs. Embora os microrganismos sejam capazes de remover grupos funcionais não fluorados, a questão central é saber se eles são capazes de atacar e remover PFC substituintes de flúor para alcançar a mineralização de moléculas perfluoradas com sucesso (PARSONS et al., 2008).

Compostos orgânicos halogenados são caracterizados pela sua elevada estabilidade no ambiente. No entanto, tornou-se evidente durante as últimas duas décadas que muitos destes compostos são suscetíveis a degradação microbiana. Reconhece-se, portanto, que a degradação microbiana de tais compostos, apesar de ser relativamente lenta, pode contribuir de forma significativa para minimizar o seu impacto ambiental em longo prazo (FETZNER, 1998; DOLFING, 2000; WHITACRE, 2008). Todos os compostos orgânicos halogenados são caracterizados por fortes laços de halogênio ao carbono, levando a estabilidade cinética. É importante, no entanto, reconhecer que uma reação de desalogenação é termodinamicamente favorável (DOLFING, 2000). Em condições aeróbias, compostos orgânicos halogenados são degradados por vias catabólicas semelhantes àqueles para os análogos não halogenados (ALEXANDER, 1999). Halogenação tende a dificultar essas reações, possivelmente levando ao acúmulo de metabólitos parcialmente degradadas. Como resultado, a degradação aeróbia é frequentemente um processo co-metabólico, aparentemente sem ceder energia útil.

De um ponto de vista termodinâmico, não há nenhuma razão para que os compostos halogenados (tais como o di-cloroeteno ou mesmo os PFCs) devam ser degradados co-metabolicamente em vez de servir como fonte de energia diretamente. Uma mudança na energia livre de Gibbs indica que a mineralização aeróbia de compostos halogenados é capaz de produzir energia suficiente para sustentar o crescimento do organismo envolvido (DOLFING; JANSSEN, 1994). Se organismos aproveitam essa energia já é outra questão. No entanto, os cálculos termodinâmicos suportam a hipótese de que os organismos devam ser capazes de crescer em compostos halogenados. A bactéria isolada por Coleman et al. (2002) suporta essa hipótese de crescer em um meio que tem como substrato apenas tri-cloroetano.

Apesar da sua elevada estabilidade, os compostos per e polifluorados podem sofrer degradação no ambiente. Degradação atmosférica de FTOH por radicais OH produz PFCAs e tem sido proposta como uma fonte dos ácidos presentes no Ártico. Os ácidos reagem ainda com radicais OH, mas este é considerado de menor importância (ELLIS et al., 2004). O radical hidroxila também reage com 8:2 FTOH em sistemas aquosos, incluindo no Lago Ontário no Canadá, com amostras de fluorcarbonados encontradas em água irradiada com luz solar (GAUTHIER; MABURY 2005). Não havia nenhuma evidência para a fotólise direta do FTOH. Os principais produtos formados foram o 8:2 fluorotelomero aldeído e PFOA.

As informações publicadas sobre a biodegradação de PFCs ainda são muito limitadas. O estudo de Remde; Debus (1996) é relativamente recente, considerando o tempo de circulação desses compostos no ambiente. No estudo foi relatada a investigação sobre a biodegradabilidade do produto de três surfactantes fluorados em condições aeróbias e anaeróbias. Dois dos surfactantes (de composição não especificada) foram degradados em condições aeróbias e um também foi degradado por via anaeróbia. A extensão da degradação do primeiro surfactante, expressa pelo consumo de O_2 ou CO_2 ou CH_4 produzido, era suficiente para classificar o surfactante como facilmente biodegradável. No entanto, nesse estudo foi verficado não existir nenhuma evidência de libertação de fluoreto a partir do composto. Foi observado para o terceiro surfactante, PFOS que não há biodegradabilidade tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias.

Um estudo extenso da biodegradação dos PFCs foi relatado por Schröder (2003). Em seu estudo, amostras de águas residuais foram misturadas com uma variedade de PFCs, incluindo PFOS, PFOA e surfactantes não iônicos incluindo, alquil etoxilatos parcialmente fluorados e perfluorooctanosulfonil-amidopolietoxilato. Os ensaios foram incubados sob condições aeróbias e anaeróbias. Foi observada biodegradação rápida em águas residuais contendo metabolismo aeróbio dos compostos fluorados, em parte, para formar ácidos carboxílicos (identificados por LC-MS / MS). Para os compostos perfluorados, em contraste, houve uma rápida remoção de PFOS (dentro de 2 dias), sob condições anaeróbias, seguido de uma remoção mais lenta do PFOA. Dos surfactantes não iônicos, apenas os compostos contendo sulfonil foram removidos. Metabólitos não foram detectadas nas incubações anaeróbias nem houve qualquer aumento na concentração de flúor observada (Schröder, 2003).

Um outro estudo da biodegradação de PFOS e PFOA foi realizado em bioreatores aeróbios e anaeróbios contendo lodo provenientes de estações alemãs de tratamento de esgoto (ETE) (MEESTERS; SCHRÖDER 2004). Nenhuma biodegradação primária foi observada em condições anaeróbias, mas a remoção de PFAS e, subsequentemente, de PFOS de PFOA, foi observada em condições aeróbias, até que, nenhum dos compostos podia ser ainda detectada. Estranhamente após 26 dias não foram detectados metabolitos ou aumentos na concentração de íons de flúor.

O primeiro estudo em escala reduzida com evidência de biodegradação de fluortelomerados foi um estudo de biodegradação de 8:2 FTOH por um consórcio microbiano misto enriquecido a partir do sedimento e do solo, utilizando-se de 1,2-dicloroetano e o etanol como fontes de carbono (DINGLASAN et al., 2004). Acreditou-se que a adição de outros organohalogenados poderiam conduzir as rotas metabólicas.

A partir disso, a biodegradação aeróbia de fluortelômeros, especialmente os de 8:2 e 6:2 FTOHs, foram bem estudados (DINGLASAN et al., 2004; LIU et al., 2010; WANG et al., 2009). Um estudo de biodegradação extenso com 8:2 de FTOH foi realizado por Wang et al. (2005a) em lodo ativado. Liu et al. (2010), por sua vez, estudaram em solo uma nova proposta de via metabólico de biodegradação aeróbia de 6:2 FTOH. As vias de biodegradação encontradas pelos dois autores foram combinadas na Figura 17. Em geral, o comportamento de 6:2 FTOH foi semelhante ao de 8:2 FTOH, mas diferiram no tipo e rendimentos dos produtos de terminais. 6:2 FTOH mostrou maior potencial de defluoração que 8:2 FTOH no solo em condição aeróbia (LIU et al., 2010). Os microrganismos presentes no lodo de esgoto diluído obtidos a partir de uma ETE degradaram FTOH em PFOA, de acordo com os dados reportados por Dinglasan et al. (2004). Os autores identificaram também um novo produto de transformação ácido-perfluordodecanóico (PFDoA), que é um substrato potencial para oxidação na via de degradação. Propôs-se que este composto tenha sido formado a partir do ácido saturado por defluoração redutiva. Vários produtos menores foram identificados, incluindo: 7:2 FTOH e 7:3 fluortelômero sulfonamida (FtSAm) insaturada.

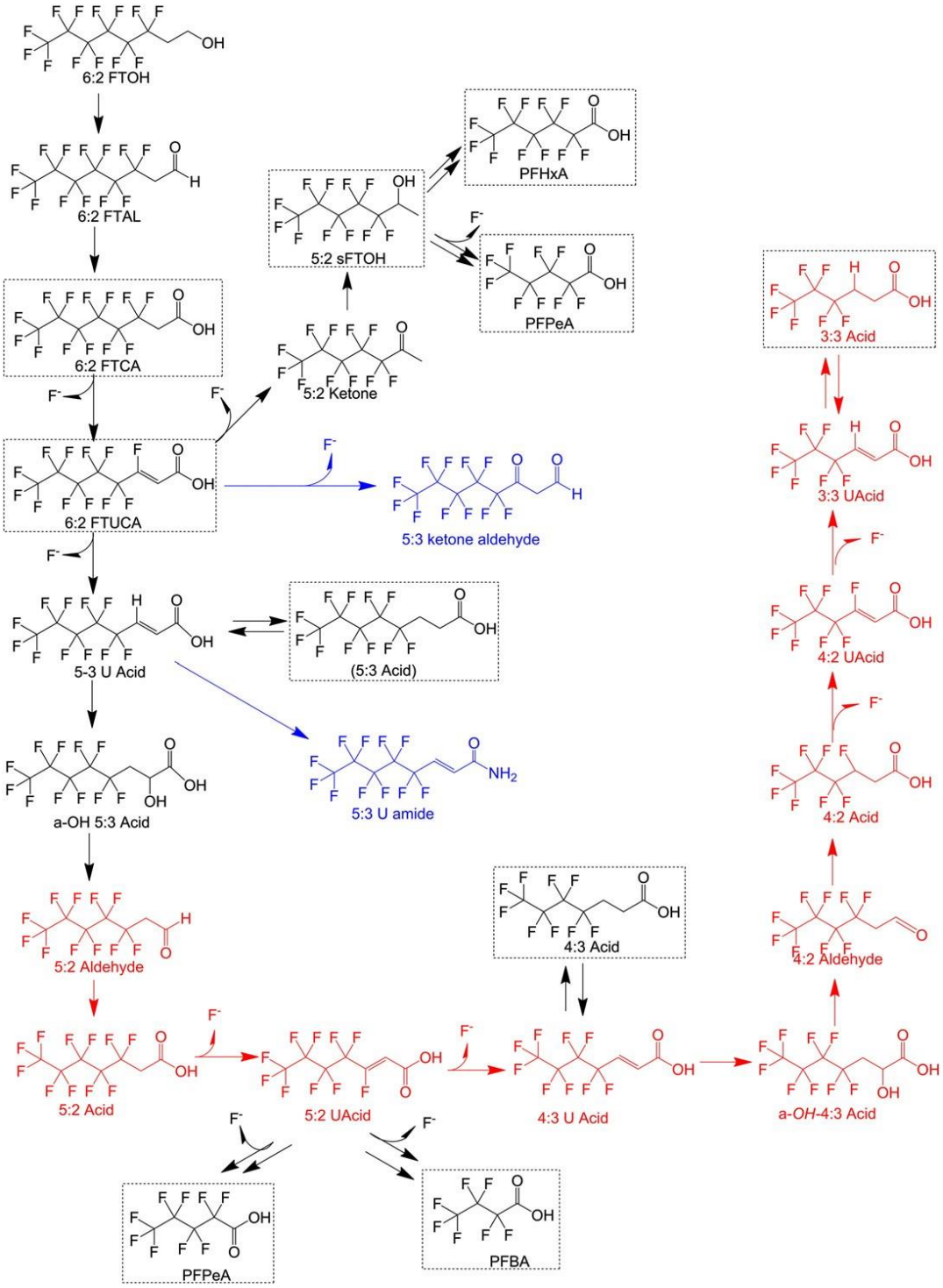


Figura 17 - Vias de degradação aeróbia de 6:2 FTOH em lodo ativado e solo. As setas duplas indicam múltiplos passos de biotransformação. As reações de defluoração são indicados por liberação de íons de flúor (F^-). Vias em azul foram apenas observadas em solo (Liu et al., 2010), enquanto vias em vermelho foram apenas observadas no lodo (Wang et al., 2011). Compostos estáveis e semi-estáveis são mostrados dentro de retângulos tracejados. Fonte: Adaptado de Wang et al. (2011) e Liu et al. (2010) por Liu; Avendaño (2013).

Em outro trabalho, Wang et al. (2011) também demonstraram a biotransformação aeróbia de 6:2 FtS determinada em frascos fechados por 90 dias em lodo ativado diluído de resíduos de estação de tratamento de água (ETA) para comparar o seu potencial de biotransformação com o de 6:2 FTOH. O biotransformação do 6:2 FtS foi relativamente lenta. Assim, o 6:2 FtS não é uma importante fonte de PFCAs e ácidos per e polifluorados nas condições de tratamento do experimento realizado. Não foi observada a presença de 6:2 FTOH e PFHpA durante 90 dias incubação. A biotransformação do 6:2 FtS seguiu formando 6:2 FTOH para formar 6:2 FTUA, que foi subsequentemente degradado por meio de vias semelhantes a 6:2 FTOH, levando finalmente a PFPeA e PFHxA (Figura 18). Uma fração substancial da concentração inicial de 6:2 FtS (24%) foi considerada ligada de maneira irreversível ao lodo ativado catalisado por enzimas microbianas. A biodegradação relativamente lenta de 6:2 FtS em lodo ativado pode ser devido a etapa aeróbia de-sulfonação necessária para os passos seguintes de degradação. Em um ambiente anaeróbio esse passa a ser um fator limitante da velocidade de microrganismos.

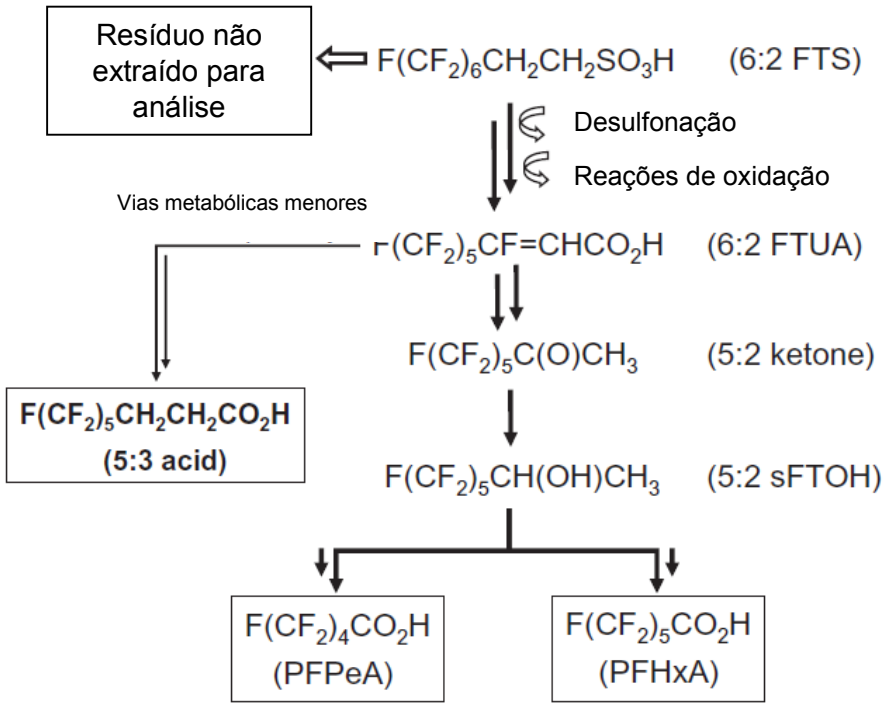


Figura 18 - Vias de biotransformação aeróbia proposta para 6:2 FtS. As setas duplas indicam vários passos de transformação. Fonte: Traduzido de Wang et al. (2011).

Um outro estudo recente sobre a degradabilidade de uma vasta gama de PFCs no sedimento aeróbio e anaeróbio e microcosmos de lodo ativado mostraram alguma evidência para a remoção de fluortelomerados sob condições aeróbias (SAEZ; LIU, 2015). Contudo, nenhuma evidência foi encontrada de que estes compostos degradam em anaerobiose, assim como qualquer outro PFC, incluindo PFCA, PFSA, ou sulfonamidas.

A literatura mostra que existe alguma evidência para a biodegradação de PFC no ambiente, mas não para a degradação ou a desalogenação completa destes compostos. O maior desafio é a remoção de substituintes com flúor. No entanto, como explicado anteriormente, esta é uma reação termodinamicamente favorável, mas que pode ser dificultada pela estabilidade cinética da ligação C-F. Uma análise mais descuidada e precipitada poderia concluir a partir destes resultados que a ligação C-F é microbiologicamente inerte. Entretanto, a desalogenação redutora é uma reação bem estabelecida para os compostos orgânicos bromados, clorados e, em menor extensão, particularmente sob condições anaeróbias. Nesse contexto, a defluoração pode ser muito difícil de acontecer – mas não é impossível.

A maioria destes novos PFASs recentemente identificados não foram incluídos na maioria dos protocolos de monitoramento ambiental, e a sua biodegradabilidade permanece largamente desconhecida. É impraticável e tecnicamente muito desafiador catalogar e conhecer o grande número de compostos per e polifluoroalquilados presentes no meio ambiente. Assim, ao estudar os processos de transformação dos precursores essenciais PFAS e fluortelômeros, incluindo a identificação específica de metabólicos e subprodutos de degradação, mais informações podem ser obtidas sobre o potencial impacto dos PFCs sobre o meio ambiente. Essa lacuna de conhecimento pode ser superada por estudos de degradação em laboratório, assim como os experimentos apresentados nos capítulos desta tese.

1.11. Desafios no estudo da AFFF e seus compostos

Incêndios de hidrocarbonetos representam uma séria ameaça à vida e à propriedade e, portanto, a questão da segurança contra incêndios deve ser medida com relação aos riscos que AFFF e seus surfactantes perfluorados representam para o ambiente. Surfactantes fluorados são uma classe única de produtos químicos que são descarregadas diretamente para os sistemas aquáticos naturais e artificiais. A

variedade de aplicações para estes tipos de surfactantes continua a aumentar, enquanto ainda existe pouca informação sobre o comportamento ambiental das substâncias.

Logo, o comportamento ambiental de PFCs é objeto de maiores investigações. As formulações comerciais de AFFF são misturas complexas, e o emprego destas misturas em incêndios introduz em longo prazo toneladas de poluentes persistentes no meio ambiente. Existem lacunas significativas no conhecimento que vão desde a etapa de separação cromatográfica aos ensaios de toxicidade. Surfactantes perfluorados persistem no ambiente e podem ser alterados somente por processos biogeoquímicos muito específicos. Sabe-se que os PFCs afetam a distribuição e biodisponibilidade de co-contaminantes, mas os efeitos que eles têm sobre os componentes da AFFF na ecologia microbiana é pouco estudado.

Atualmente, tem-se uma compreensão muito limitada sobre as propriedades físico-químicas e transformação dos PFCs. Não existem dados para todo o grande número de moléculas de PFAS e fluortelômeros ainda. Abordagens atuais de modelagem *in silico* parecem, na melhor das hipóteses, apenas modestamente estimar as propriedades de PFCs (RAYNE; FOREST, 2009), e em um número de casos, erros importantes de mais de uma ordem de grandeza são aparentes quanto ao seu comportamento ambiental. Estas dificuldades destacam as lacunas importantes em nossa compreensão de como modelar as propriedades físico-químicas e biológicas dos compostos perfluorados e seus co-contaminantes. A comunidade cientifica precisa de muito trabalho experimental e teórico adicional para investigar completamente a AFFF e seus PFCs.

Por isso, é oportuno continuar a estudar o potencial de degradação dos compostos perfluorados em experimentos cuidadosamente projetados em que populações microbianas consigam utilizar o potencial dehalogenação e a partir disso aumentar nossa compreensão sobre a complexa etapa de biotransformação de AFFF no ambiente.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Estudar a biodegradação de compostos flúor-carbonados contendo hidrocarbonetos de petróleo e espumas formadoras de filmes aquosos (AFFF) por microbiota de solo, em diferentes condições.

2.2. Objetivos Específicos

Foram definidos objetivos específicos para esse estudo:

- Obter uma microbiota capaz de crescer em área afetada por AFFF e hidrocarbonetos, a partir da contaminação controlada do solo;
- Avaliar os efeitos aditivos de hidrocarbonetos de petróleo - BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e o-xileno) - como co-contaminante na biorremediação de AFFF;
- Testar a capacidade de biodegradação de AFFF + BTEX em aerobiose e anaerobiose;
- Determinar a composição de flúor-carbonados presentes em AFFF em água e sedimentos, em diferentes tempos de biodegradação;
- Estudar a biodegradabilidade de efluentes contendo misturas de hidrocarbonetos de petróleo e AFFF, semelhantes aos presentes em áreas afetadas por incêndios;

- Verificar a fito-toxicidade dos resíduos contendo AFFF, após diferentes tempos de biodegradação;
- Determinar o efeito da aplicação de soluções com AFFF, quanto a alterações na estrutura da comunidade microbiana, por meio de técnicas de biologia molecular.

3. Capítulo 1

Biotransformação de AFFF em Meio Contendo BTEX

3.1. Introdução

Pouco se sabe sobre as condições ambientais e biológicas que facilitam as reações de transformação de PFCs (PFAS e fluortelômeros), especialmente para as formulações mais comuns de AFFF baseadas em FtTAoS. Além disso, devido à natureza das rotinas de treinamento em corpos de bombeiros ou dos incêndios da indústria petroquímica, a contaminação ambiental por PFCs é geralmente acompanhada por hidrocarbonetos. Conhecer a relação entre a degradação dos hidrocarbonetos e a transformação de PFAS é crucial para estabelecer sistemas de bioremediação que tenham como alvo tanto a defluoração quanto a mineralização de hidrocarbonetos em ambientes contaminados por AFFF.

O conhecimento fundamental das bactérias e enzimas responsáveis pela degradação de compostos presentes em AFFF não apenas seria capaz de expandir o conhecimento atual sobre mecanismos de transformação de PFAS e fluortelômeros, como também estabelecer fatores ambientais específicos que podem ser manipulados para melhorar o processo de biotransformação. Com isso, espera-se conseguir aplicar estratégias mais eficientes na bioremediação de áreas impactadas por AFFF. As estratégias de caracterização de PFCs dentro do contexto da degradação de hidrocarbonetos de petróleo propostas nesse primeiro capítulo serve como uma ponte

entre o já tão conhecido processo de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo e a emergente preocupação com os PFCs das espumas de incêndio.

Esse trabalho visa a compreensão fundamental de processos ambientais sobre o destino de PFAS, PFCA, PFSA, FtTAoS e FtS encontrados em áreas impactadas por AFFF, e pretende avaliar os possíveis resultados da atenuação natural por microrganismos em um ambiente monitorado.

Um enfoque maior deve ser dado aos compostos fluortelomerados. Três fabricantes de AFFF utilizam o FtTAoS como principal agente fluoroquímico em sua formulação: Ansul, Angus e Chemguard (BACKE et al., 2013). Por esse motivo, amostras ambientais são frequentemente associadas a esses contaminantes. O FtTAoS é presente principalmente como 6:2 FtTAoS, mas análises mais aprofundadas revelaram a presença em menor quantidade nas variações 8:2 e 4:2 FtTAoS (PLACE; FIELD, 2012).

A biorremediação eficiente em aerobiose de hidrocarbonetos de petróleo *in situ* já foi estabelecida na literatura, mas nunca como um co-contaminante da AFFF. Hidrocarbonetos aromáticos como a mistura de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX, Figura 19) podem ser efetivamente biodegradados por diversas comunidades microbianas na presença de oxigênio. Isso leva a crer no potencial uso para o estabelecimento de uma relação co-metabólica que possa auxiliar a transformação de PFCs a produtos carboxílicos menos fluorados.

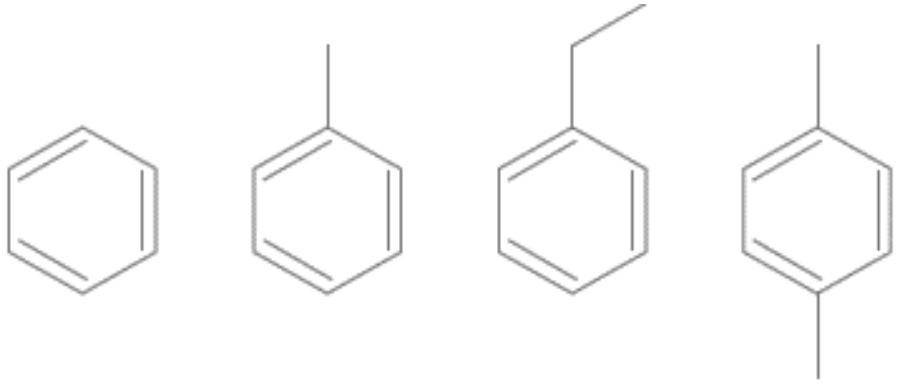


Figura 19 – Estrutura química dos compostos na mistura de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX). Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste capítulo são apresentados ensaios no contexto da biorremediação de uma região da indústria petroquímica contaminada por AFFF de modo a fornecer

dados que levem ao desenvolvimento de uma estratégia de biorremediação completa, que não apenas atinja máxima defluoração, como também influencie as interações ecológicas dentro das comunidades oxidantes de hidrocarbonetos com o objetivo de remover ambos os poluentes (AFFF e BTEX).

A habilidade de uma vasta gama de microrganismos que degradam BTEX aerobiamente é conhecida e bem estabelecida na literatura (DEEB; ALVAREZ-COHEN, 1999; MERGESIN; SCHINNER, 2001; LEAHY; OLSEN, 2006). Contudo, não se sabe se a presença de microrganismos degradadores de BTEX afeta a dinâmica de transformação de PFAS e fluortelômeros. É possível que, sob condições apropriadas, os componentes possam ser co-remediados, rendendo um máximo de defluoração e mineralização completa a CO_2 e água – desde que encontradas as condições corretas.

Assim, considerando a grande variedade de locais em que de fato ocorre a co-contaminação por BTEX e AFFF, somados as propriedades robustas de oxidação das oxigenases ativadas pelo metabolismo de BTEX, acredita-se que os hidrocarbonetos sejam substratos co-metabólicos interessantes que podem dirigir as vias de transformação do FtTAoS. Ao selecionar certas populações por BTEX, é possível produzir diferenças na transformação dos PFCs, incluindo quais e quantos produtos finais são quantificados.

A biodegradação de BTEX já foi demonstrada como dependente de muitos fatores ambientais, como pH, temperatura, aeração e disponibilidade de nutriente (DEEB; ALVAREZ-COHEN, 1999). Entretanto, a abordagem desse capítulo sobre a confluência de fatores nas vias metabólicas de biotransformação de FtTAoS era até então desconhecida.

3.1.1. Motivação

Dada uma condição ambiental específica, é possível que os PFCs possam ser seletivamente remediados de modo mais eficiente enquanto os hidrocarbonetos de petróleo são mineralizados. Admitiu-se que, além disso, os surfactantes fluorados poderiam auxiliar no processo de degradação do BTEX. Foram então definidos experimentos para promover e identificar as vias de biotransformação do FtTAoS presente no AFFF Ansul aerobiamente e anaerobiamente.

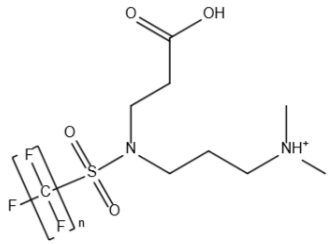
Apesar dos impactos do BTEX nas comunidades capazes de defluoração nunca foram reportados, os experimentos foram motivados pela possibilidade dos microrganismos utilizarem a energia adquirida na biodegradação do BTEX para dirigir o metabolismo da biotransformação dos compostos presentes na AFFF mais eficientemente, podendo assim evitar a produção dos compostos persistentes PFOA e PFOS.

3.2. Metodologia

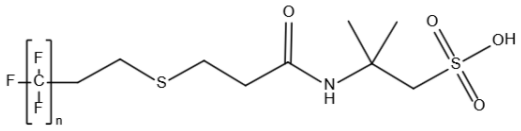
3.2.1. Materiais

Todos os padrões isotopicamente marcados, PFAS, PFCA, PFSA, 6:2 FtS, 8:2 FtS e sulfonamida perfluorada (FOSA) foram comprados de Wellington Laboratories. Os padrões para as substâncias precursoras FtTAoS estudadas estão apresentados na Figura 20.

Materiais disponíveis comercialmente contendo 6:2 fluortelômero sulfonamida betaína (PFnSAmA), 6:2 fluortelômero sulfonamida amina (PFnSAm), 6:2 fluortelômero tioamido sulfonado (FtTAoS), 6:2 fluortelômero tio hidroxi amônio (FtTHN+) e 5:1:2, 7:1:2, 9:1:2, 5:3, 7:3, e 9:3 fluorotelômero betaínas foram fornecidos por Fire Fighting Foam Coalition e adquiridos com Ansul Tyco Fire Protection. Essas moléculas foram utilizadas no escaneamento e quantificação das substâncias analisadas.



3M: (PFnSAmA). n=4,5,6.



Ansul, (n:2 FtTAoS). n=4,6,8.

Figura 20 – Estruturas de compostos precursores padrões encontrados em formulações de AFFF. Fonte: Adaptado de Place; Field (2012).

Todos os outros solventes foram comprados da Sigma Aldrich no maior grau de pureza disponivel. Foi utilizada água ultra pura para HPLC e metanol da Fisher Scientific. Amostras arquivadas de AFFF em diferentes formulações foram fabricadas por Ansul. As amostras foram obtidas na base militar americana de Ellsworth, onde foram realizados treinamentos de emergência com incêndio.

A formulação de AFFF fabricada pela 3M já foi utilizada em estudos anteriores, para identificação de outras estruturas de PFAS em AFFF (PLACE; FIELD, 2012) e, por isso, utilizada nesse estudo como comparação à AFFF formulada por Ansul.

Para produzir a mistura de BTEX, foram utilizados em partes iguais benzeno, etil-bezeno, tolueno e o-xileno da Sigma Aldrich.

3.2.2. Amostras de solo

3.2.2.1. Base da Força Aérea Americana em Ellsworth (EUA)

Amostras de solo foram coletadas na base da força aérea americana de Ellsworth em Piedmont, SD, EUA (Figura 21), localizada em 44°08'44.9"N 103°05'33.1"W.

Figura 21 – Imagem de satélite da antiga área de treinamento de incêndio na base da força aérea Ellsworth. Foram marcadas a área de coleta onde eram realizados os treinamentos de incêndio, local das plumas de benzeno e os locais de remediação ambiental, contendo barreiras para as plumas (linha amarela) e poços de aeração (pontos verdes). Fonte: Google Inc. (2014); Anotações elaboradas pelo autor.

Treinamentos de emergência com incêndio foram conduzidos entre os 1942 e 1990 nesse local. Como parte dessas atividades, óleo, solventes e combustíveis foram liberados no ambiente para induzir as chamas. Vários agentes extintores de incêndio, incluindo AFFF, foram extensivamente utilizados nessas áreas.

O ambiente contaminado passou por vários procedimentos de remediação ambiental durante a última década, como: influsão de oxigênio e aeração, extração de voláteis do solo e remoção de solo para tratamento *ex-situ*. O sedimento local fica sobre a rocha-mãe de *Pierre Shale*, contendo solo de característica argilosa de baixa permeabilidade, contendo áreas de areia média e silte.

Não existem registros exatos sobre as formulações de AFFF liberada nesse local durante os treinamentos de incêndio, contudo, é provável que as marcas manufaturadas por 3M, Ansul e National Foam foram utilizadas, pois estas eram as marcas aprovadas para uso militar entre 1976 a 1990 (MOODY; FIELD, 2000). A 3M foi a maior fornecedora de AFFF aos militares até o encerramento de sua produção em 2001. Atualmente, as espumas de incêndio são fornecidas por Ansul, responsável por 90% do estoque militar (BACKE et al., 2013).

As amostras de solo foram coletadas em outubro de 2011 em uma área de testes de 1200 m por 600 m. O solo foi removido com instrumentos livres de PFAS na profundidade de até 0,6 m abaixo do solo. As amostras foram então colocadas em recipientes livres de flúor e encaminhadas ao Departamento de Engenharia Ambiental e Civil da Universidade da Califórnia em Berkeley (EUA), onde as amostras foram estocadas e analisadas.

3.2.2.2. Refinaria de petróleo da Petrobras em Paulínia (Brasil)

Foram coletadas amostras de solo da Refinaria de petróleo da Petrobrás em Paulínia, SP, Brasil (Figura 22).

A espuma do tipo AFFF foi aplicada em grande escala no incêndio ocorrido na Refinaria do Planalto Paulista (Replan), localizada em Paulínia / SP (22°43'24.2"S 47°08'00.3"W), em 8 de janeiro de 1993, sendo este o maior incêndio já ocorrido em refinarias de petróleo no Brasil. Bombeiros fizeram a extinção do fogo que atingia as bacias de contenção com aplicação de jatos de AFFF e o resfriamento do tanque atingido e dos adjacentes utilizando jatos de água. Foram consumidos 4.000.000 L de óleo diesel e gastos 37.000 L de AFFF liberados no solo (FIGUEREDO et al., 1999).

Figura 22 – Imagem de satélite dos tanques de armazenamento da Replan. Foi marcada a área de coleta onde historicamente ocorreu o grande incêndio de 1993. Fonte: Google Inc. (2014); Anotações elaboradas pelo autor.

Assim como na base americana de Ellsworth não existem registros sobre as marcas de AFFF utilizados, contudo, sabe-se que a maior parte da AFFF produzido no mundo nessa época eram da marca Ansul e 3M, sendo estas as possíveis formulações aplicadas no local.

As amostras de solo foram coletadas em junho de 2012 em uma área próxima aos tanques de estoque de combustível da refinaria. O solo foi removido com instrumentos livres de PFAS na profundidade de até 0,2 m abaixo do solo. As amostras foram então colocadas em recipientes livres de flúor e enviadas por correio ao Departamento de Engenharia Ambiental e Civil da Universidade da Califórnia em Berkeley. As amostras ficaram 41 dias em trânsito, sob condições ambientais não especificadas.

3.2.3. Local de estudo e experimentos

Os procedimentos de química analítica e quantificação de PFCs da AFFF foram realizados sob co-orientação da Profa. Dra. Lisa Alvarez-Cohen no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Engenharia Ambiental e Civil da Universidade da Califórnia em Berkeley (UC-Berkeley), Berkeley, CA, EUA.

3.2.4. Montagem dos ensaios

Todos os experimentos, anaeróbios e aeróbios, foram conduzidos em frascos de vidro de 160 mL (Figura 23). As amostras foram periodicamente retiradas para a análise de biotransformação de AFFF e biodegradação de BTEX.

O processo de biodegradação em cada ensaio contendo AFFF e BTEX foi observado por 90 dias, com os seguintes componentes:

– 50 mL de meio salino mínimo BAV1, composto por 85 mg.L^{-1} de KH_2PO_4, 218 mg.L^{-1} de K_2HPO_4, 334 mg.L^{-1} de $Na_2HPO_4.2H_2O$, 5 mg.L^{-1} de NH_4Cl, 36,4 mg.L^{-1} de $CaCl_2.2H_2O$, 22,5 mg.L^{-1} de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,25 mg.L^{-1} de $FeCl_3.6H_2O$. Foram incluídos os elementos traço nas quantidades de 13 mg.L^{-1} de $NiSO_4.6H_2O$, 0,65 mg.L^{-1} de $(NH_4)_6Mo7O_2.4H_2O$, 105 mg.L^{-1} de $Na_2SiO_3.5H_2O$, 0,17 mg.L^{-1} de $MnSO_4$, 0,14 mg.L^{-1} de $SnCl_2.2H_2O$ e 17,3 mg.L^{-1} de Na_2SeO_3 anidro. Foi adicionado ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfônico (TES) e ajustado o pH para 7,2. O meio foi fervido durante para remoção dos gases. Rezasurina (0,2 mL.L^{-1}) e L-cisteína-sulfato (4 mL.L^{-1}) foram adicionados para as reações anaeróbias como indicador e agente redutor, respectivamente. O tampão utilizado foi $NaHCO_3$ na concentração aproximada de 2,7 g.L^{-1};

– 50 µL de AFFF da formulação Ansul. A porção contendo as substâncias perfluoradas é conhecida pelo nome comercial Lodyne, e a porção de dietilenoglicol-butil-éter é conhecida como butil carbitol. Juntas, essas substâncias compõem a maior parte da formulação concentrada da AFFF da marca Ansul. Uma diluição de 1000x a partir da fórmula original foi necessária para se adequar aos limites de detecção das técnicas utilizadas;

– 9 µL de BTEX, obtendo-se a concentração de 100 mg.L^{-1}, sendo 25 mg.L^{-1} de cada um dos compostos da mistura. Foi utilizado o-xileno dentre os isômeros, pois é o único que ocorre naturalmente. Dada a volatilidade dos compostos, a concentração final levou em consideração os cálculos pela Lei de Henry. A mistura de BTEX foi estabilizada por 24 horas antes de ser injetada nos frascos;

– 5 g de amostra de solo, utilizando solo contaminado com AFFF e BTEX do Campo de treinamento de incêndio de Ellsworth, SD, EUA e Replan, SP, Brasil, sendo estes chamados respectivamente de Solo A e B ao longo do texto. Em alguns experimentos piloto, foi também utilizado um solo sem microbiota adaptada obtido no próprio campus da Universidade da Califórnia em Berkeley, coletado próximo a

Strawberry Creek, no lado sul do campus, em frente ao Stanley Hall (37°52'25.6"N 122°15'24.3"W);

– 300 µg de B12, componente necessário para o crescimento da cultura. A concentração de B12 como co-fator no meio foi definida como efetiva no crescimento em BAV1 por estudos anteriores no mesmo laboratório, e por isso, associada aos protocolos praticados (YUJIE et al., 2013).

Figura 23 – Frascos de 160 mL utilizados nos experimentos. Fonte: Elaborado pelo autor.

As culturas dos frascos aeróbios foram preparadas em bancadas esterilizadas. Os frascos anaeróbios foram lavados e injetados com gás nitrogênio / hidrogênio (90:10) por 30 segundos e vedados após receberem o meio de cultura. A adição dos outros compostos, incluindo o solo, foi feita em câmara anaeróbia a 1,02 atm de pressão, contendo gás N_2. Os frascos anaeróbios foram preparados em duas condições: metanogênese e redução de nitrato. Os frascos em condições de redução de nitrato receberam 10 mM de NO_3^-. Os solos utilizados nos frascos anaeróbios, embora do mesmo local, eram de pontos mais profundos de coleta (0,5 m), enquanto o solo utilizado nos ensaios aeróbios eram de pontos próximos à superfície.

Os frascos foram vedados com tampa de borracha isenta de compostos fluorados e presos por tampa de borda de alumínio. O material utilizado também

impede a volatilização de BTEX e a adsorção dos compostos voláteis ao longo do prazo do experimento.

Uma série de controles foi aplicada para as diferentes condições utilizadas conforme Tabela 5. O controle autoclavado foi suplementado com solução de antibiótico para garantir a supressão de atividade microbiana.

Tabela 5 - Conteúdo dos frascos controle nos ensaios aeróbios e anaeróbios

Ensaio	**Controle do Meio**	**Controle do AFFF**	**Controle do Solo A (Ellsworth – EUA)**	**Controle do Solo B (Replan – Brasil)**	**Controle Autoclavado**	**Ensaio de Biodegradação**
Identificação*	**MC+ ou MC-**	**FC+ ou FC-**	**SCA+ ou SCA-**	**SCB+ ou SCB-**	**AC (A/B)+ ou AC (A/B)-**	**LV (A/B)+ ou LV (A/B)-**
Meio BAV1 (100 mL)	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**
Amostra de Solo (5 g)	**---**	**---**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	CONTÉM (estéril)	**CONTÉM**
AFFF (diluição 100x)	**---**	**CONTÉM**	**---**	**---**	**CONTÉM**	**CONTÉM**
Co-fator B12 (50µg.L^{-1})	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**	**CONTÉM**

*Os ensaios descritos na Tabela 5 foram construídos em variantes contendo BTEX (indicados por "+") e na ausência de BTEX (indicadas por "-") nas condições aeróbias e anaeróbias. Assim, um ensaio de biodegradação contendo solo da Replan (solo B) e BTEX (marcado com "+"), é identificado como LVB+, por exemplo. Já um controle com AFFF sem solo e sem BTEX é identificado como FC-, por exemplo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

(Elaborado pelo autor)

3.2.4.1. Manutenção das culturas aeróbias e anaeróbias

Para a manutenção do ambiente anaeróbio nos frascos com essa condição, o ar foi substituído com N_2 / H_2, além da adição de rezasurina e cisteína-sulfato. Os frascos aeróbios tiveram a concentração de O_2, monitorada periodicamente e foram injetados com mais gás O_2, quando a quantidade ficava abaixo de 10% v/v.

O enriquecimento das culturas com BTEX foi feito conforme os hidrocarbonetos eram consumidos pela cultura microbiana. Inicialmente foi adicionado BTEX em um intervalo de 20 dias na concentração de aproximadamente 1,7±0,3 mM de cada

componente e após 40 dias foi adicionado aproximadamente 0,8±0,2 mM de BTEX a cada 10 dias.

Os frascos foram armazenados sem agitação em estufa a 27,0±0,1°C e medidos ao longo processo de biodegradação com as técnicas descritas. Amostras do meio de cultura e do espaço preenchido por gás foram retiradas periodicamente e analisadas.

3.2.5. Biotransformação de AFFF

3.2.5.1. Preparo das amostras e extração de AFFF

Para a quantificação da biotransformação dos compostos fluorcarbonados foram retiradas alíquotas periódicas dos frascos descritos na seção anterior. Foram retirados 2,0 mL do meio, cerca de 1,0 cm abaixo da superfície, evitando-se partículas de solo. O procedimento foi feito em triplicata. As alíquotas foram estocadas em tubos *eppendorf* e mantidas em freezer a -4,0±0,1°C.

A extração dos PFCs ocorreu misturando 300 µL da amostra estocada a 300 µl de metanol. Foi utilizado metanol como solvente, pois aumenta a miscibilidade entre o solvente e a amostra durante a fase inicial da cromatografia. As etapas seguintes foram modificadas a partir de Higgins et al. (2005) e otimizadas para a extração dos fluorcarbonados encontrados na formulação Ansul de AFFF. A mistura 1:1 de solvente e amostra foi submetida à agitação em *vortex* por 1 hora e sonicados por 30 minutos. Todas as extrações foram feitas em triplicata. As partículas de solo foram então separadas da fase líquida por centrifugação a 15000 g por 15 minutos.

Determinou-se que apenas uma etapa de extração era suficiente para remover o PFCs de interesse para análise. Foi adicionado também 25,0 mg de Supelclean Envi-Carb (Sigma-Aldrich) aos extratos para remover o excesso de matéria orgânica que pudesse interferir na ionização dos compostos durante a espectrometria de massa e ensaios oxidativos posteriores. Ensaios controles demonstraram que o Envi-Carb não removeu os fluorcarbonados a serem analisados.

As amostras foram então submetidas à uma segunda etapa de preparação, em que os padrões internos foram adicionados para leitura em cromatografia liquida associada a espectrometria de massa com quadrupolo triplo (LC-MS / MS).

3.2.5.2. Cromatografia liquida associada a espectrometria de massa com quadrupolo triplo (LC-MS / MS)

Nesta seção serão explicados os conceitos que explicam o funcionamento interno do espectrômetro de massa com quadrupolo triplo da Série 6400 da Agilent Technologies utilizado nos experimentos. Os exemplos e figuras foram obtidos no próprio manual do equipamento (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013), mas se aplicam conceitualmente a qualquer outro tipo de espectrometria de massa com triplo quadrupolo e câmara de colisão.

A base para a compreensão do funcionamento de um espectrômetro de massa triplo quadrupolo começa pela operação de um quadrupolo único. Por isso, uma explicação do funcionamento de um espectrómetro de massa de quadrupolo único será apresentada primeiro.

3.2.5.2.1. Espectrometria de massa com quadrupolo único

A espectrometria de massa baseia-se na análise de íons que se deslocam por um vácuo.

A ionização de uma amostra ocorre na fonte de íons mostrada esquematicamente na Figura 24. Os íons são analisados por um analisador de massa (filtro de massa), que controla o movimento dos íons que viajam para o detector, para ser convertido em sinais digitais.

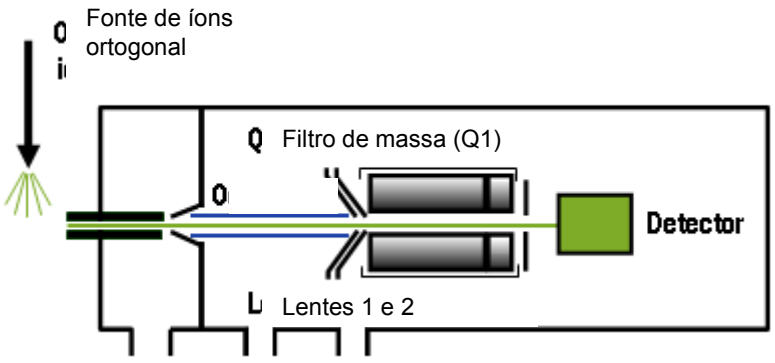


Figure 24 – Esquema de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo único (Q1). Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

O analisador de massas quadrupolar consiste em quatro hastes paralelas para as quais voltagens de corrente contínua (da sigla em inglês *direct current*, DC) e de rádio-frequência (RF) específicas são aplicadas. Estas hastes filtram todos os ions exceto os de um ou mais valores específicos na razão massa / carga (m / z) desejada, tal como determinado pelas tensões aplicadas.

O RF é aplicado a todas as quatro hastes, mas as hastes negativas (-) são 180 graus fora de fase com as hastes positivas (+). As hastes são rotuladas + e - em referência às tensões DC aplicadas. Todos os íons que compõem as amostras são gerados na fonte. No entanto, quando um conjunto específico de tensões é aplicada, íons de apenas o valor de m / z especificado podem passar através do quadrupolo para atingir o detector. À medida que as tensões são aumentadas para outros valores, os íons com outros valores de m / z são liberados a passar através das hastes. Uma varredura MS completa é obtida através do aumento das tensões de DC e RF aplicadas às quatro hastes ao longo de uma ampla gama de valores.

Um modelo em diagrama pode ser usado para ilustrar o conceito de como um único instrumento quadrupolo funciona (Figura 25).

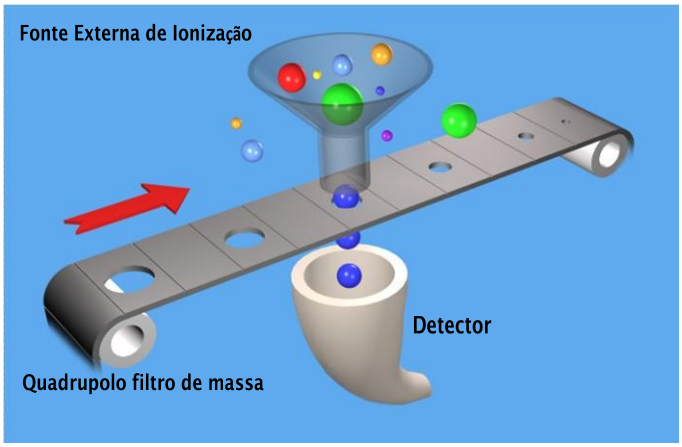


Figura 25 – Modelo conceitual de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo único (Q1). Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

No modelo:

- Todos os íons contidos numa amostra são formados na fonte de ionização externa e recolhidos em um funil. As bolas de diferentes cores e tamanhos representam diferentes íons com diferentes valores de m / z;

- O analisador de massa de quadrupolo é representado por uma correia móvel que serve para filtrar os íons que passam através de aberturas de diferentes tamanhos. Os íons passam do funil, através do filtro, para o detector. Embora neste modelo os íons que são menores poderiam caber através das aberturas maiores, um analisador de massa quadrupolo filtraria os íons de modo que somente os íons corretos passariam para o detector, ou seja, as bolas menores não passariam pelos furos maiores, mas sim, somente nos furos de tamanho correto;
- O detector é representado pelo funil de recolhimento por baixo da correia filtrante.

À medida que a correia (analisador) move-se, ou seja, as voltagens nas hastes do quadrupolo são alteradas, os íons com diferentes valores de m / z são filtradas através do espectrómetro de massa. Como o analisador se move de um pequeno valor de m / z para cada vez mais valores maiores, uma varredura MS completa é criada.

Se a correia não se move, o detector continua a monitorar o mesmo valor de m / z ao longo de todo o período de varredura. Este tipo de análise é conhecido como monitoramento de íon único (da sigla em inglês *single ion monitoring*, SIM). É o modo de funcionamento mais sensível para um espectrómetro de massa de quadrupolo único. O período de escaneamento é selecionado (fixo) pelo usuário. O usuário pode definir o tempo de espera para escanear uma faixa de massa específica (por exemplo, m / z 50 a 1000) ou permanecer em um íon selecionado (SIM) ou para se deslocar para vários íons predefinidos durante o período de análise. O filtro de massa quadrupolo não é verificado neste modo. As tensões RF / DC são muitas vezes criados para filtrar uma única massa de uma só vez.

Para obter a melhor sensibilidade ou quantificação, o quadrupolo simples é operado no modo SIM (Figura 26). No modo SIM o quadrupolo único analisa o sinal específico de um íon m / z quase todo o tempo. Isto resulta em quase 100% de aquisição durante o ciclo de trabalho.

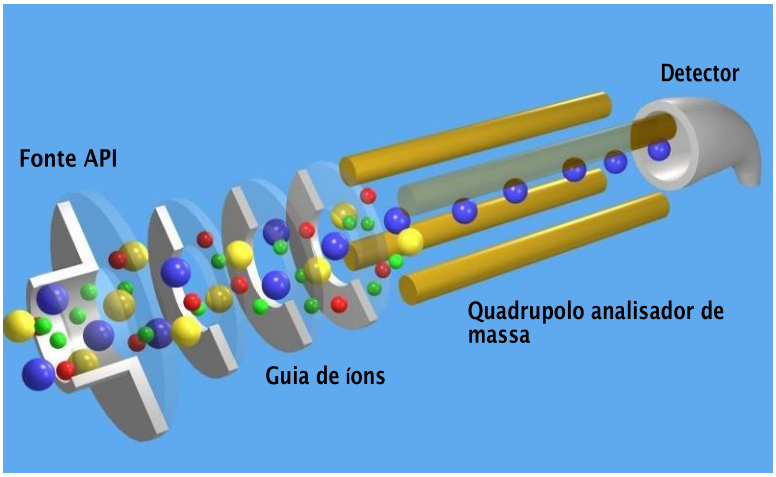


Figura 26 – Monitoramento de único íon (SIM). Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

No modelo:

- Todos os íons (+, -, e neutros) são formados na fonte de ionização à pressão atmosférica (da sigla em inglês *atmospheric pressure ionization*, API);
- Óptica orienta os íons para o analisador de massa quadrupolo utilizando um filtro octopolo de oito hastes igualmente espaçados;
- No analisador, apenas os íons com um valor de m / z específico, representado por esferas azuis, são liberados para passar através do detector;
- O detector concluir a análise. Este sistema tem várias vantagens: como oferecer a melhor sensibilidade para a quantificação, aumentar a seletividade, melhorar a especificidade cromatográfica. Contudo, esse modo de operação não fornece nenhuma informação estrutural.

Em modo de escaneamento total MS (*full scan MS*), o quadrupolo serve como um filtro de massa ao longo do tempo, e uma verificação é realizada percorrendo tensões RF e DC continuamente aumentadas. Isso proporciona a filtragem através dos correspondentes valores m / z ao longo de todo um espectro de massa (Figura 27).

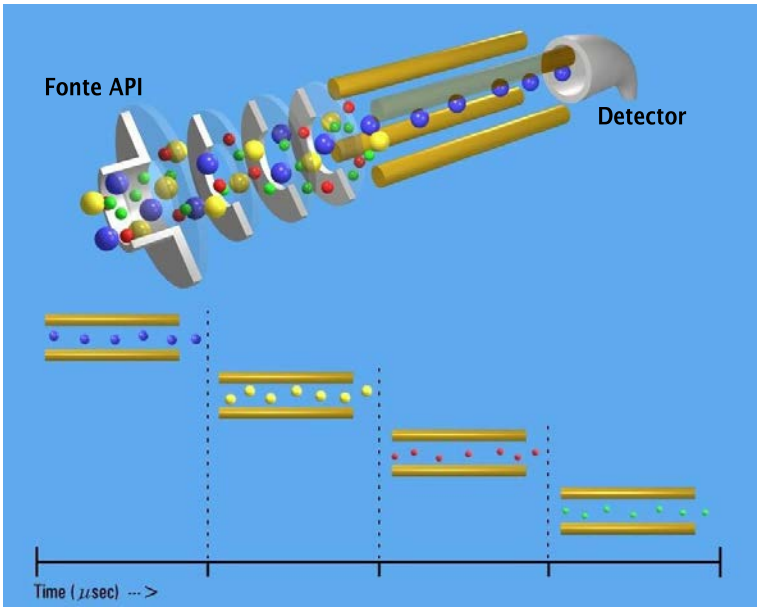


Figura 27 – Quadrupolo único funcionando em modo *full scan* MS. Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

O modo *full scan* MS é menos sensível porque o ciclo de trabalho para cada m / z é consideravelmente menor do que 100%. O analisador quadrupolar de massa faz varreduras sequencialmente, passando cada m / z da massa selecionada em um intervalo especificado para o detector. Ainda sim, esse método é um útil para operação porque mostra todos os íons que estão sendo formados na fonte de íons. Isso é útil para a aquisições de dados em SIM, pois também alerta sobre a outros compostos co-eluidos nos compostos de interesse.

Full scan MS também pode ser usado para estudar os íons fragmentados (Figura 28).

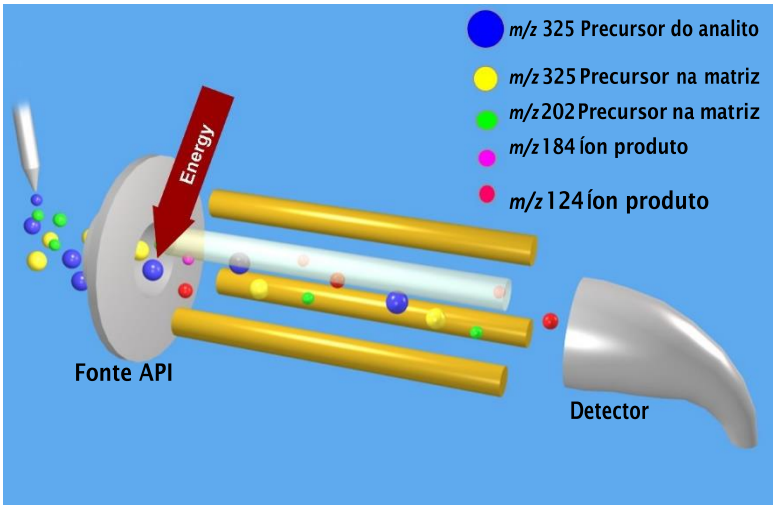


Figura 28 – Íons fragmento em um MS de quadrupolo único. Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

O diagrama mostra que os fragmentos de íons, também conhecida como íons produtos, são formados por fragmentação ao quebrar os íons precursores. Íons precursores formados na fonte de íons através do analisador de massa, sem alteração, a menos que seja aplicada energia extra ao seu movimento, numa região em que a fragmentação pode ainda ocorrer. Conforme a tensão é aumentada, os íons têm mais energia translacional. Então, se os íons de percorrem moléculas de gás, as colisões convertem a energia translacional em vibrações moleculares que podem fazer com que os íons fragmentem de forma específica.

Um espectrômetro de massa de quadrupolo único não pode ser usado para fazer MS / MS, porque todos os íons formados na fonte de íons são transferidos para o quadrupolo seja ele fragmentado ou não. No final, quando o analisador de massa filtra os íons não é possível identificar quais os íons produto vieram a partir de quais íons precursores.

Um espectrômetro de massa com triplo quadrupolo pode fazer MS / MS, com a fragmentação dentro de sua célula de colisão, conforme descrito na próxima seção.

3.2.5.2.2. Espectrometria de massa com quadrupolo triplo

O espectrómetro de massa de quadrupolo triplo é constituído por uma fonte de íons, tecnologia de dessolvatação melhorada, seguido pela óptica de íons que

transferem os íons do quadrupolo para a primeira posição a direita. Um diagrama de é mostrado na Figura 29.

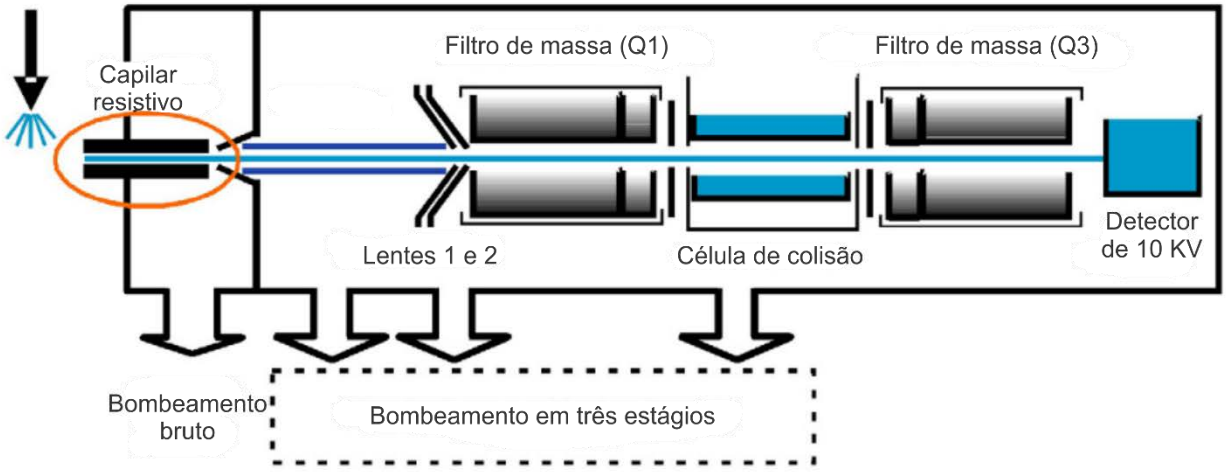


Figura 29 - Esquema de um espectrometro de massa (MS) de quadrupolo triplo (Q3). A célula de colisão é usualmente considerada um quadrupolo (Q2). Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

O quadrupolo consiste em quatro hastes hiperbólicas paralelas através das quais os íons selecionados são filtrados antes de atingir uma célula de colisão, onde são fragmentados. A célula de colisão é geralmente chamada de segundo quadrupolo, e geometricamente é realmente um hexapolo preenchida com nitrogênio, o mesmo gás utilizado na fonte de íons.

Os íons fragmentados formados na câmara de colisão são então enviados para o terceiro quadrupolo para um segundo estágio de filtragem para permitir que um utilizador isole e examine as múltiplas transições de precursores para íons produto (da sigla em inglês *multiple reaction monitoring*, MRM). Este foi o modo de análise utilizado para detectar os compostos descritos nesse capítulo da tese.

Quadrupolo triplo tem a capacidade de fazer MS / MS de várias maneiras (Figura 30).

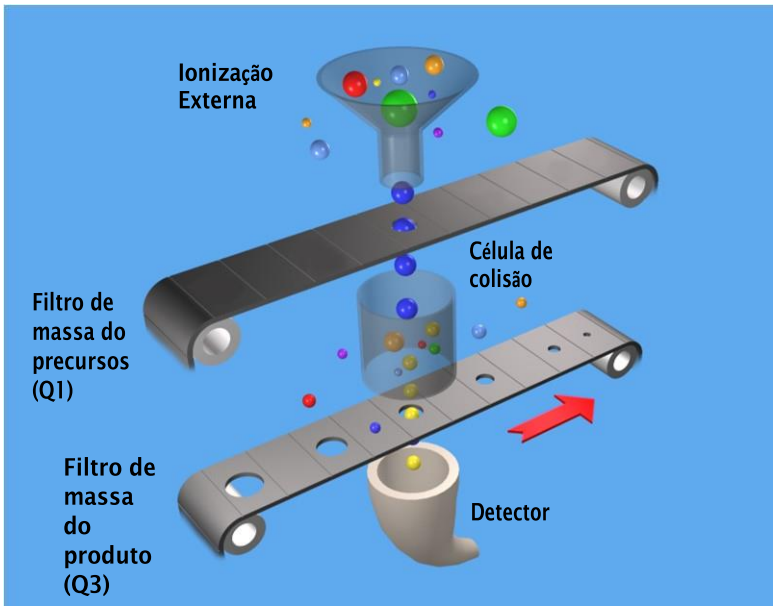


Figura 30 – Modelo conceitual de um espectrometro de massa de quadrupodo triplo. No modo SIM, Q1 e Q3 são definidos para um m / z especificado, enquanto que em *full scan* MS Q1 é mantido em um m / z especificado e Q3 escaneia completamente as amostras. Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

No modelo foram representandos os quadrupolos escaneadores de massa como correias em movimento e uma célula de colisão colocada entre as correias para fragmentar os íons. A primeira correia pode ser fixa para selecionar quais íons precursores viajam para a câmara de colisão. Diferentes tipos de células de colisão podem ser utilizadas.

Qualquer que seja a geometria usada, um gás de colisão é necessário (preferencialmente um gás inerte não-reactivo, tal como nitrogênio ou argônio). Nos experimentos dessa tese foi utilizado o nitrogênio. Além disso, as tensões aplicadas à célula de colisão devem ser diferentes da que se refere aos quadrupolos para melhorar a movimentação de todos os íons produtos em relação ao terceiro quadrupolo.

Neste exemplo, um íon precursor é selecionado utilizando o primeiro quadrupolo e é enviada para a câmara de colisão por fragmentação. Os fragmentos são escaneados através do terceiro quadrupolo resultando em um conjunto de íons-produto MS / MS. Uma vez que os íons fragmentados são peças de o precursor eles representam porções da estrutura global da molécula precursora. Um instrumento de quadrupolo triplo pode ser utilizado deste modo para identificar um composto de

impressão digital ao comparar os íons produtos a uma biblioteca previamente estabelecida com cada uma das substâncias precursoras puras (Figura 31).

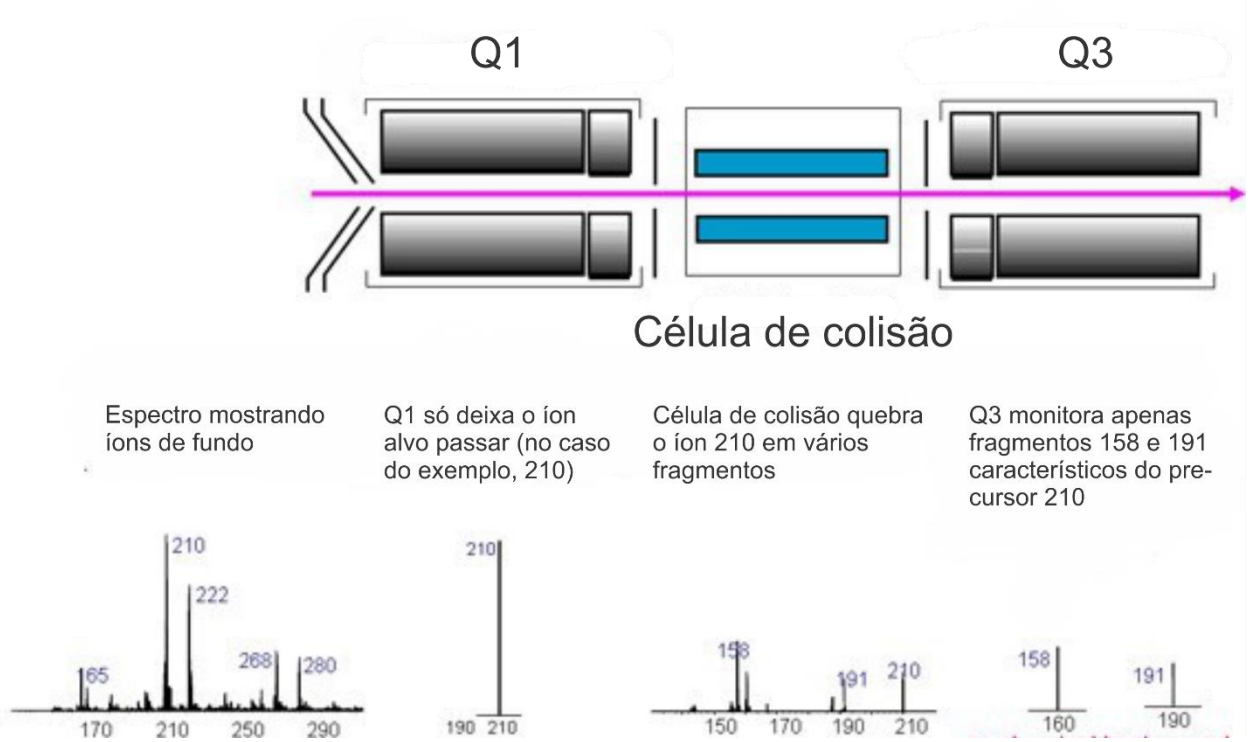


Figura 31 – Monitoramento de multiplas reações (MRM). Fonte: Traduzido de Agilent Technologies (2013).

A *full scan* MS / MS usando um triplo quadrupolo MS também não é o modo mais sensível, pela mesma razão que uma *full scan* MS usando um único quadrupolo não é o modo mais sensível de operação possível (primeira correia permanece constante; move-se a segunda correia). O modo de operação mais sensível para o instrumento de triplo quadrupolo MS é o de fixar as duas correias e monitorar apenas um íon precursor específico e um íon do produto específico. Este modo é chamado de monitoramento de reações selecionadas ou SRM (da sigla em inglês *selected reaction monitoring*).

Em operação normal (utilizada nos experimentos dessa tese), contudo, um quadrupolo triplo MS realiza a execução de múltiplas SRM para os mesmos íons precursores. Isso é chamado de monitoramento múltiplo de reações ou MRM.

3.2.5.3. Monitoramento da biotransformação de AFFF por LC-MS / MS

Todas as amostras foram analisadas em triplicata em duas diluições: alta e baixa, a partir do extrato contendo a mistura 1:1 de amostra e metanol. A alta diluição serve para monitorar a transformação dos compostos precursores presentes na formulação original. A baixa diluição teve como objetivo detectar os compostos formados a partir da biotransformação. Como a quantidade de PFCs formados é bem menor, uma menor diluição foi necessária para conseguir detectar os compostos alvo.

Além disso, 50,0 µL de padrão interno para quantificação dos PFCs foi adicionado a todos os ensaios (Tabela 5). Com isso, o conteúdo dos frascos inseridos no LC-MS / MS foi 249,0 µL de H_2O, 199,0 µL de metanol, 2,0 µL de amostra e 50,0 µL de padrão interno – para alta diluição; e 150,0 µL de H_2O, 100,0 µL de metanol, 200,0 µL de amostra e 50,0 µL de padrão interno – para baixa diluição.

Foi realizada uma curva de calibração com seis níveis a partir de uma solução contendo concentração conhecida de fluorcarbonados, denominada padrão externo (Tabela 6).

Tabela 6 – Componentes dos padrões de calibração e quantificação utilizados nos frascos de LC-MS / MS. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados pode ser consultado na Lista de Abreviações

Padrão Interno		**Padrão externo**	
		Substância	Concentração ($ug.L^{-1}$)
		N-EtFOSE	5,0
		PFCA	25,0
		8:2 Fts	25,0
Substância	Concentração ($ug.L^{-1}$)	**FOSA**	5,0
PFCA	20,0	**6:2 FAS**	25,0
EtFOSAA	20,0	**MeFOSA**	5,0
M8FOSA-mix	20,0	**EtFOSA**	5,0
N-EtFOSA	20,0	**EtFOSAA**	5,0

(Elaborado pelo autor)

A cada 9 amostras dispostas na bandeja do amostrador automático do LC-MS / MS foi colocado um frasco controle para verificar contaminação residual entre grupos de amostra contendo água e metanol.

A análise foi conduzida em um cromatógrafo líquido de alta pressão associado a um espectrômetro de massa com quadrupolo triplo (HPLC-MS / MS) da marca Agilent, modelo 6410 (Figura 32).

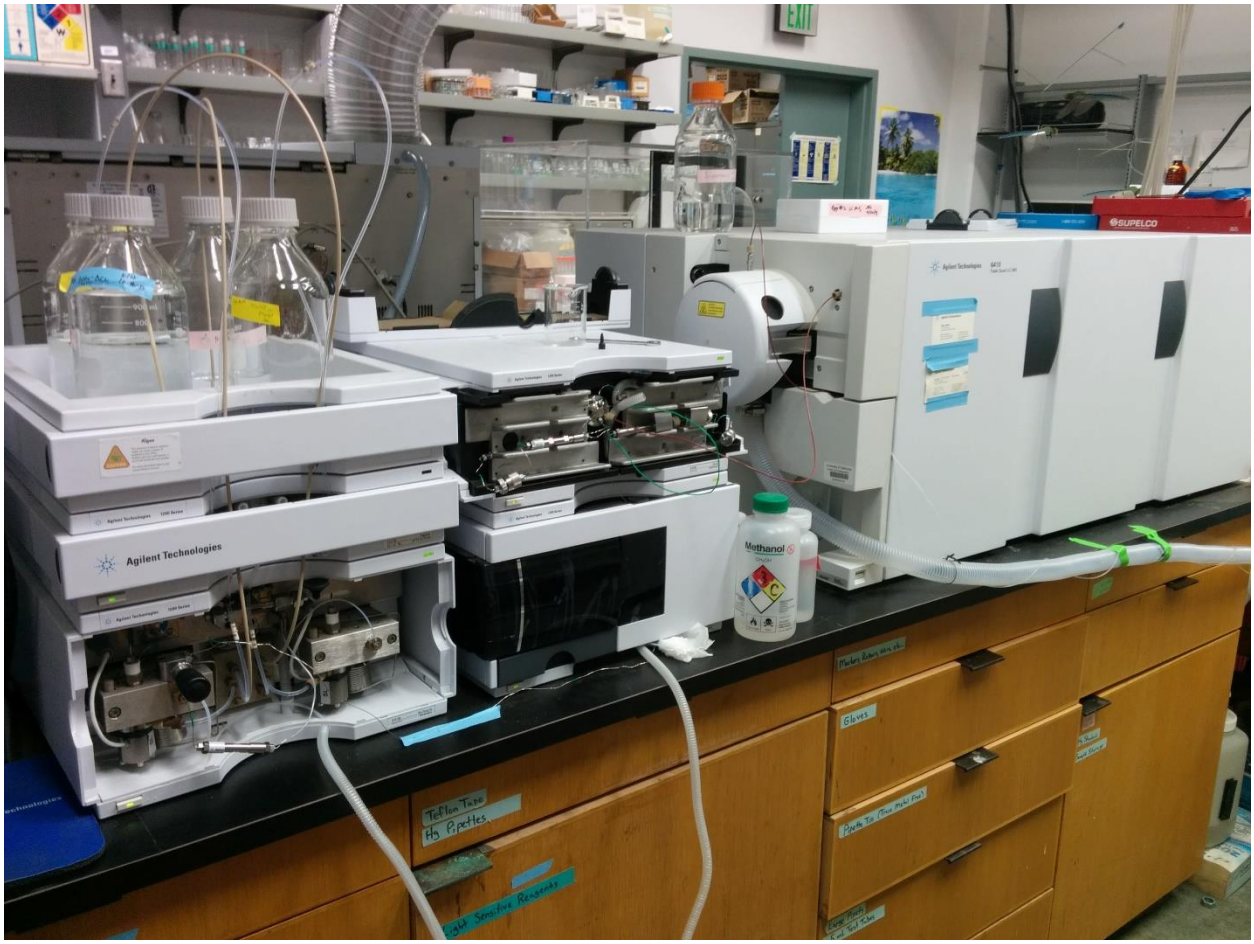


Figura 32 - Cromatógrafo líquido associado a espectrômetro de massa com quadrupolo triplo utilizado nos experimentos. Fonte: Elaborado pelo autor.

A espectrometria de massa operou no modo de ionização negativo de eletrospray. O módulo de HPLC foi modificado para diminuir o ruído de fundo e potencial contaminação por flúor, ao substituir os canos de politetrafluoretileno (PTFE) por polieteretercetona (PEEK). Outra mudança foi a retirada do de-gaseificador de solvente do equipamento, uma vez que os solventes foram de-gaseificados, manualmente, fora do sistema, utilizando uma bomba de vácuo e sonificação. Uma pré-coluna Zorbax SB C-18 foi adicionada à fase aquosa móvel e colocada antes do ponto de mistura da fase aquosa com orgânica para remover outros possíveis compostos fluorados contaminantes da água. A pré-coluna foi eluída a cada 50 amostras, aproximadamente, para prevenir a retenção excessiva de PFCs.

O programa de gradiente de solvente operou com 10 mM de acetato de amônia em metanol e 10 mM de acetato de amônia em água para HPLC. O solvente teve a vazão de 0,4 mL.minuto^{-1}. A rampa de metanol foi de 10% a 90% em 6 minutos,

mantida a 90% por 6 minutos e depois trazida de volta para 10% por 1 minuto e mantida assim por 3 minutos. A separação cromatográfica foi conseguida com o uso de uma coluna Zorbax Eclipse XCB-C18 4.6 × 50 mm, 1.8 µm acoplada a um filtro *inline* de 2-µm e outra coluna Eclipse XDB-C18 4.6 × 12.5 mm, 5 µm.

Uma ou duas transições MRM foram monitoradas no detector do triplo quadrupolo por substância analisada e a maioria delas foram quantificadas pela diluição dos isótopos. Substâncias contendo isômeros múltiplos foram quantificadas como únicas baseada no único padrão. As amostras em alta diluição foram medidas com volume de injeção de 100 µL, enquanto as amotras em baixa diluição foram injetadas a 50 µL. Os parâmetros de espectrometria de massa utilizados foram: potencial capilar de ±2800 V; extrator potencial de ±2 V; temperatura fonte e de dessolvação a 150 e 450°C respectivamente; fluxo de gas de desolvação e cone a 1100 L.hora^{-1} e 75 L.hora^{-1}, respectivamente. Os parâmetros para aquisição de dados dependentes dos compostos, como por exemplo a energia de colisão e voltagem do cone, foram otimizados com as substâncias puras e padrões.

3.2.5.4. Determinação de produtos de biotransformação

Seis formulações estoque de AFFF fluortelomerizadas e cinco formulações eletro-fluoradas foram utilizadas como padrão de detecção e diluídas em metanol para testar o limite de resolução dos equipamentos e comparar com a capacidade de extração de fluorcarbonados das amostras ambinentais. Uma alíquota de 1,5 mL de cada mistura de AFFF diluídas foram transferidas para um frasco limpo de polipropileno (para evitar contaminação por flúor) para auto-amostrador (MicroSolv, Eatontown, NJ, Parte 9502S-PP-Ambar), no qual 1,05 ng de cada padrão interno foi adicionado. Foram feitas múltiplas diluições de cada substância, até que se conseguisse ter uma resposta dos equipamentos, dentro do alcance das curvas de calibração.

Todos os compostos fluorados, PFCA, PFOS, 6:2 FtS, 8:2 FtS, e FOSA foram quantificados pela diluição de cada isótopo com padrões analíticos certificados. Com isso foi possível obter uma vasta biblioteca de substâncias fluorcarbonadas detectáveis. Uma lista de todas as transições iônicas que foram monitoradas está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Transições monitoradas por espectrometria de massa durante a biotransformação de AFFF. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados pode ser consultado na Lista de Abreviações

	Compostos formados por eletrofluoração							
Composto	Padrão Interno	Ion molecular	Voltagem Fragmen-tador (V)	Ion quantif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Ion qualif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Polari-dade
	Perfluoroalquil sulfonamida amino carboxilados (PFSAmA)							
PFBSAmA	[$^{18}O_2$] PFHxS	457	135	85	30	70	60	+
PFPeSAmA	[$^{18}O_2$] PFHxS	507	135	85	30	70	60	+
PFHxSAmA	[$^{18}O_2$] PFHxS	557	135	85	30	70	60	+
	Perfluoroalquil sulfonamido aminas (PFSAm)							
PFBSAm	[$^{18}O_2$] PFHxS	385	135	85	30	58	60	+
PFPeSAm	[$^{18}O_2$] PFHxS	435	135	85	30	58	60	+
PFHxSAm	[$^{18}O_2$] PFHxS	485	135	85	30	58	60	+
	Perfluorados sulfonados							
PFBS	[$^{18}O_2$] PFHxS	299	120	80	70	99	30	-
PFHxS	[$^{18}O_2$] PFHxS	399	160	80	80	99	50	-
PFHpS	[$^{13}C_4$] PFOS	449	160	80	80	99	50	-
PFOS	[$^{13}C_4$] PFOS	499	180	80	80	99	50	-
PFDS	[$^{13}C_4$] PFOS	599	150	80	50	99	50	-
	Perfluoralquil sulfonamidas							
FHxSA	[$^{13}C_8$] FOSA	398	180	78	40			-
FOSA	[$^{13}C_8$] FOSA	498	180	78	40			-

(Elaborado pelo autor)

Tabela 7 – (Continuação) Transições monitoradas por espectrometria de massa durante a biotransformação de AFFF. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados pode ser consultado na Lista de Abreviações

	Compostos Fluotelomerados							
Composto	Padrão Interno	Ion molecular	Voltagem Fragmen-tador (V)	Ion quantif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Ion qualif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Polari-dade
	Fluortelômero betaína (FtB)							
5:1:2 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	432	180	58	50			+
5:3 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	414	180	58	60			+
7:1:2 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	532	180	58	60			+
7:3 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	514	180	58	60			+
9:1:2 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	632	180	58	60			+
9:3 FtB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	614	180	58	60			+
	Fluortelômero tio hidroxi amonio (FtTHN+)							
6:2 FtTHN+	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	496	180	393	40	437	30	+
	Fluortelômer tioamido sulfonados (FtTAoS)							
4:2 FtTAoS	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	486	180	206	45	135	45	-
6:2 FtTAoS	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	586	190	135	45	206	40	-
8:2 FtTAoS	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	686	180	206	50	135	50	-
	Fluortelômer sulfonados (FtS)							
6:2 FtS	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	427	140	407	25	80	35	-
8:2 FtS	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	527	140	507	30	80	40	-
	Fluortelômero sulfonamido betaínes (FtSaB)							
6:2 FtSaB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	571	180	58	40	104	40	+
8:2 FtSaB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	671	180	104	40	58	60	+
10:2 FtSaB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	771	180	104	40	58	60	+
12:2 FtSaB	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	871	180	104	40	58	60	+
	Fluorotelômer sulfonamido aminas (FtSaAm)							
6:2 FtSaAm	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	513	180	58	60	86	60	+
8:2 FtSaAm	[$^{13}C_2$] 6:2 FtS	613	180	86	60	58	80	+

(Elaborado pelo autor)

Tabela 7 – (Continuação) Transições monitoradas por espectrometria de massa durante a biotransformação de AFFF. O significado das abreviaturas de cada um dos compostos listados pode ser consultado na Lista de Abreviações

	Perfluorados carboxilados – eletrofluorados ou fluortelomerados							
Composto	Padrão Interno	Ion molecular	Voltagem Fragmen-tador (V)	Ion quantif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Ion qualif. (m/z)	Energia de colisão (V)	Polari-dade
PFPeA	[$^{13}C_4$] PFBA	263	60	219	2			-
PFHxA	[$^{13}C_2$] PFHxA	313	80	269	2	119	15	-
PFHpA	[$^{13}C_2$] PFHxA	363	80	319	2	169	2	-
PFOA	[$^{13}C_4$] PFOA	413	80	369	3	169	14	-
PFNA	[$^{13}C_5$] PFNA	463	80	419	2	219	15	-
PFDA	[$^{13}C_2$] PFDA	513	80	469	5	169	10	-
PFUnA	[$^{13}C_2$] PFUnA	563	80	519	10	269	15	-
PFDoA	[$^{13}C_2$] PFDoA	613	100	569	5	169	25	-
PFTrdA	[$^{13}C_2$] PFDoA	663	100	619	10			-
PFTeDA	[$^{13}C_2$] PFDoA	713	100	669	10			-
	Padrões internos de quantificação							
[$^{13}C_8$] FOSA		506	150	77.8	50			-
[$^{18}O_2$] PFHxS		403	150	103	40			-
[$^{13}C_4$] PFOS		503	190	80	60			-
[$^{13}C_4$] PFBA		217	50	172	5			-
[$^{13}C_2$] PFHxA		315	60	270	5			-
[$^{13}C_4$] PFOA		417	70	372	2			-
[$^{13}C_5$] PFNA		468	70	423	5			-
[$^{13}C_2$] PFDA		515	70	470	10			-
[$^{13}C_2$] PFUnA		565	80	520	10			-
[$^{13}C_2$] PFDoA		615	80	570	10			-
[$^{13}C_2$] 6:2 FtS		429	140	409	25			-

(Elaborado pelo autor)

Os precursores fluortelomerados (6:2 FtS) predominantemente presentes na formulação Ansul de AFFF só puderam ser quantificados utilizando os homólogos de 6 carbonos, pois são os únicos disponíveis comercialmente. Para cadeias com 4 (4:2 FtS) ou 8 carbonos (8:2 FtS), a curva de calibração do composto com 6 carbonos foi utilizada para estimar a concentração da família inteira de homólogos. Não havia padrão certificado para FHxSA, logo foi necessário estimar a concentração também com base na curva de calibração de FOSA.

A metodologia aplicada garantiu que a contaminação residual estaria abaixo dos limites de resolução entre 0,1 e 0,5 ng.L^{-1}. A resposta de detecção variou entre 90

a 105% para todos os compostos, exceto para PFPeA, PFDoA, PFTeA, PFBS, PFDS, e FOSA, cuja detecção foi entre 60 a 80%. A resposta de 8:2 FtS foi de 133 a 146% e a de 6:2 FtS foi de 200 a 300%.

3.2.5.5. Ensaios complementares de precursores oxidativos totais (POT)

Várias ferramentas analíticas são necessárias para avaliar a transformação dos precursores na AFFF, porque os produtos de transformação não podem ser facilmente identificados. Um ensaio desenvolvido para detectar precursores PFAA em água da chuva (HOUTZ; SEDLAK, 2012) foi adaptado para as condições encontradas nas extrações de AFFF. O ensaio foi utilizado para quantificar a concentração total de precursores perfluorados nas amostras, convertendo-os em carboxilados perfluorados, facilmente mensuráveis por meio de reações com radicais hidroxil. O ensaio de precursores oxidativos foi aplicado às amostras extraídas com metanol para buscar potenciais produtos intermediários de transformação, para os quais havia padrões disponíveis. Não detectar recuperação total dos precursores, após processo oxidativo, indica a existência de compostos diferentes sendo formados, ausentes na biblioteca de fluorcarbonados disponível. Os resultados foram utilizados para avaliar a persistência dos precursores AFFF-derivados e a sua transformação *in situ* para PFAS ou outras substâncias.

A técnica POT (HOUTZ et al., 2013) consiste em degradar totalmente os compostos precursores no tempo inicial e final por meio de um processo químico. É análogo a análise de TOC (Carbono Orgânico Total), em que a molécula precursora é quebrada em partes menores, detectáveis pelo LC-MS / MS. Contudo, neste caso, os radicais agem como um processo de biodegradação total muito acelerado (Figura 33). Assim, após a geração de todos os produtos, espera-se para o tempo final, a recuperação de 100% dos compostos.

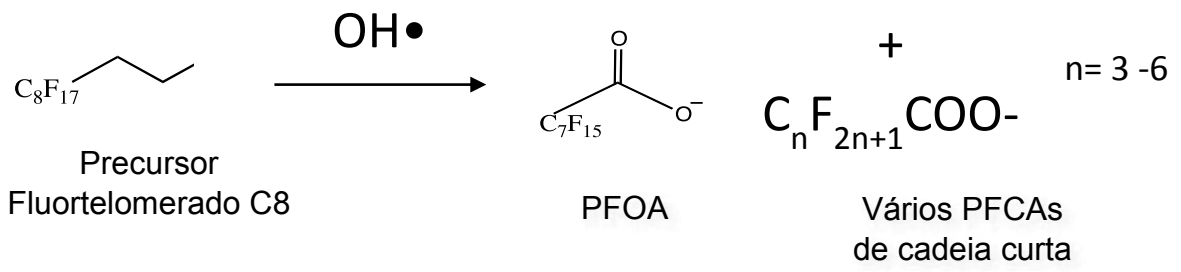


Figura 33 – Reação de Precursores Oxidativos Totais com quebra das moléculas pelo radical hidroxila. Fonte: Elaborado pelo autor.

O preparo das amostras para os ensaios POT é pouco diferente da análise comum por LC-MS / MS. Sob as condições do ensaio, os precursores para ambos os PFAO e PFAS são convertidos para PFCA. Em outras palavras, as moléculas precursoras são quebradas em compostos perfluorados menores com 60,0 mM de persulfato de potássio 0,125 M em NaOH, seguido de aquecimento, durante seis horas a 85°C. Esse procedimento garante uma quantidade de radicais hidroxilo que suficiente para converter todos os precursores em carboxilados fluorados. Depois da reação e oxidação, todas as amostras foram neutralizadas com HCl concentrado e tratado com metanol, antes de serem sub-amostradas para análise em LC-MS / MS.

Com isso, a soma da concentração molar de todos as substâncias perfluoradas detectadas, após serem submetidos à oxidação, pode ser usada para estimar a concentração total dos precursores PFAS e fluortelomerados, a partir de seus subprodutos presentes em uma amostra.

3.2.6. Biodegradação de BTEX

3.2.6.1. Cromatografia gasosa com detector de chama ionizada (GC-FID)

A concentração de BTEX e a sua biodegradação foram monitorados regularmente ao injetar em uma coluna cromatográfica GS-GasPro (30 m × 0.32 mm; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, EUA) 100 µL do espaço gasoso do frasco de 160 mL onde ocorreram os experimentos. A cromatografia foi feita em um cromatógrafo gasoso com detector de chama ionizado (da sigla em inglês *gas chromatography – flame ionization detector*, GC-FID) Agilent 7890A (Figura 34).

Figura 34 – Cromatógrafo gasoso GC-FID Agilent 7890A. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros utilizados foram modificados do método 113-4332 da Agilent Technologies para diminuir o tempo de corrida de 20 minutos para 5 minutos por amostra (MONTAGNOLLI et al., 2013). A temperatura inicial foi de 110°C por 50 segundos, seguido de um aumento gradual de 110°C para 205°C a 20°C.minuto^{-1} e depois de 205°C a 260°C a 50°C por minuto. Por fim, manteve-se a temperatura final de 260°C por 3 minutos. O gás carregador foi hélio, com fluxo de 39,7 cm.segundo^{-1} aquecido a 110°C. A temperatura do injetor do tipo *split* e do detector FID foi de 250°C.

A volatilização dos compostos foi levada em consideração quanto à Lei de Henry, a fim de se obter a concentração desejada em dissolução no volume líquido dos frascos. O volume adicionado foi corrigido, conforme o sistema de Equações (3, 4):

$$\begin{cases} M = S_{liq}\, x\, V_{liq} + S_{gas} \times V_{gas} \\ M = S_{gas} \times \dfrac{V_{liq}}{Hc + V_{gas}} \end{cases} \quad (3, 4)$$

onde:

M é a massa do composto aromático volátil adicionada;

S_{liq} é a concentração na fase líquida;

V_{liq} é o volume na fase líquida;

S_{gas} é a concentração na fase gasosa;

V_{gas} é o volume na fase gasosa;

H_c é a constante de Henry específica para o composto.

Assim, para obter-se a concentração de 25,0 mg.L^{-1} de cada um dos compostos de BTEX, foi adicionado 1,7 mM de benzeno, 1,5 mM de tolueno, 1,4 mM de etil-benzeno e 1,4 mM de o-tolueno aos frascos inicialmente.

O espectro de BTEX obtido com o método descrito apresentou resolução suficiente para quantificar o consumo de BTEX (Figura 35).

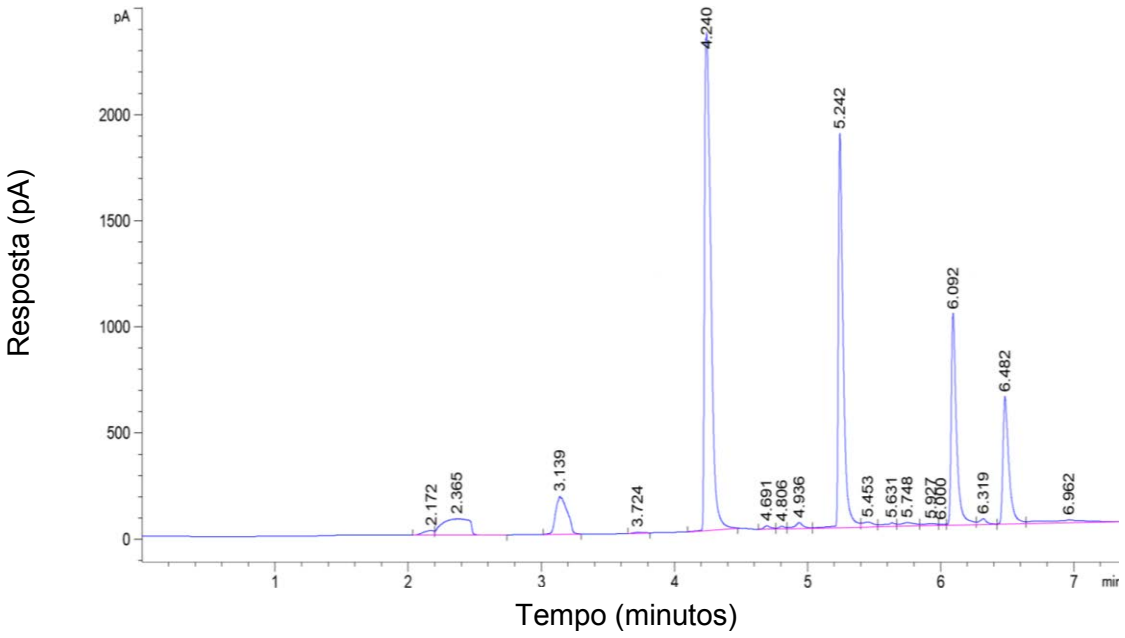


Figura 35 – Cromatografia gasosa de BTEX. Os picos de resposta indicam diferentes substâncias com base nos diferentes tempos de retenção, sendo 4,2 minuto para benzeno, 5,2 minuto para tolueno, 6,1 minuto para etil-benzeno e 6,5 minuto para o-xileno. Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram estabelecidas curvas de calibração para cada um dos componentes do BTEX entre 0,1 mM a 1,0 mM (Figura 36).

As amostras de gás não passaram por qualquer tipo de preparação e foram injetadas da mesma maneira que foram retiradas do frasco. A retirada das amostras de gás foi feita por uma seringa de vidro com válvula de gás através da tampa de borracha (por meio de uma agulha), para evitar a abertura dos frascos ao longo do processo de biodegradação.

Conforme o BTEX era consumido pelas comunidades microbianas, mais BTEX era adicionado aos fracos. Os enriquecimentos da cultura ocorriam logo após sua depleção, visando a retomada da concentração inicial de hidrocarbonetos aromáticos nos frascos.

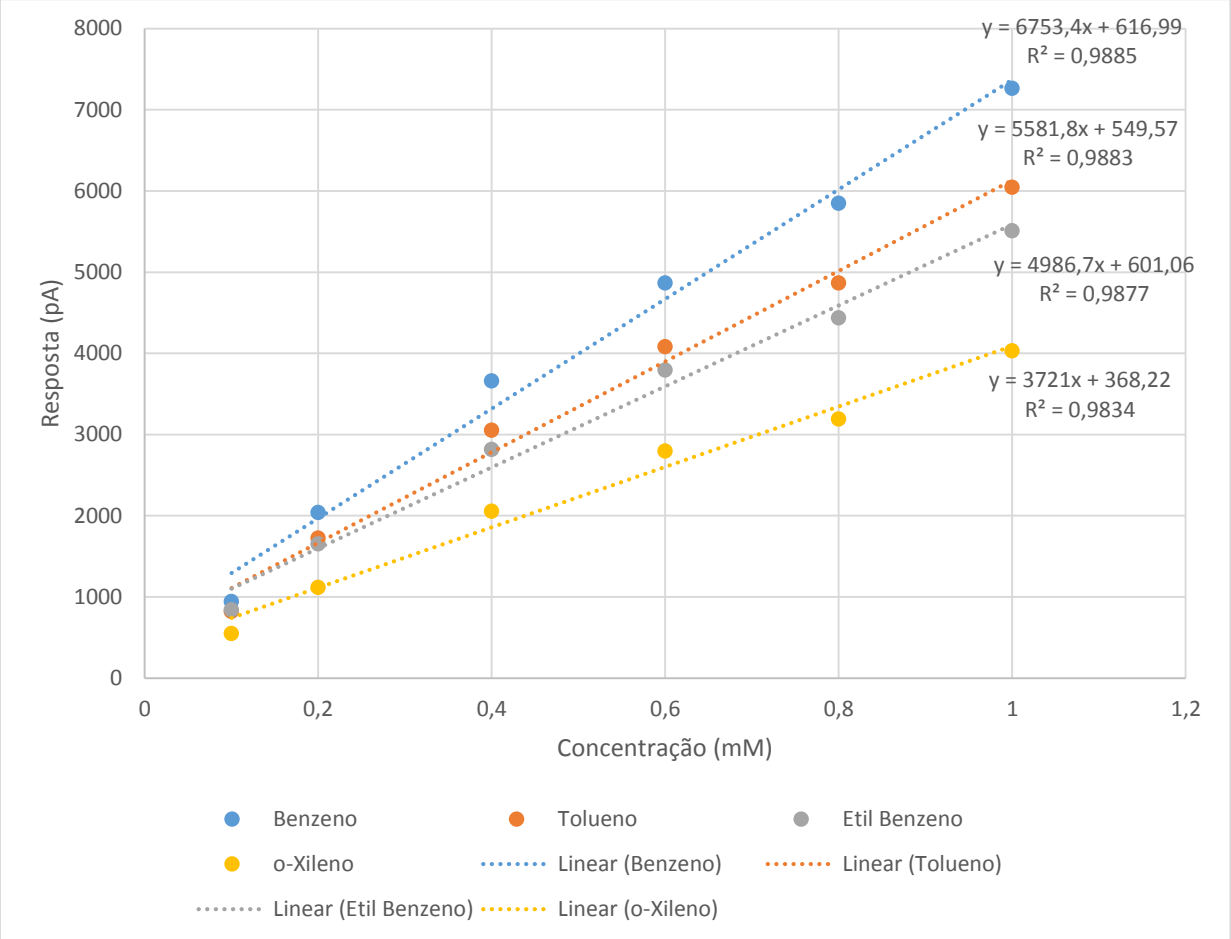


Figura 36 – Curva de calibração para componentes do BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.7. Monitoramento dos processos aeróbios e anaeróbios

3.2.7.1. Cromatografia iônica (IC)

O consumo dos doadores de elétron em um sistema anaeróbio indica atividade metabólica em uma comunidade microbiana. O conteúdo de nitrato e de nitrito dos ensaios anaeróbios foi medido, utilizando um sistema de cromatografia iónica ICS-900 (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) equipado com uma bomba de pistão duplo, um auto-amostrador modelo AS-DV, uma coluna isocrática à temperatura ambiente, um detector de condutividade e um DS5 supressor 300 SMDA (4 mm). O software CHROMELEON 6.5 CHOMATOGRAPHY MANAGEMENT foi usado para o controle do sistema e processamento de dados. Uma coluna Dionex Ion Pac-AS23 analítica (4 mm x 250 mm) e uma coluna de guarda (4 mm x 50 mm) foram usadas para a separação. O eluente consistiu em carbonato de sódio 4,5 mM e bicarbonato de sódio 0,8 mM, com um fluxo de 1 mL.minuto^{-1}. Nitrato e nitrito foram quantificados após definida uma curva de calibração. Soluções foram tomados como padrões e as curvas de calibração foram gerados com concentrações que variam de 0,4 mg.L^{-1} a 20 mg.L^{-1} e de 0,5 mg.L^{-1} a 50 mg.L^{-1}.

3.2.7.2. Produção de O_2 e metanogênese

A concentração de metano e oxigênio foi analisada por cromatografia gasosa (GC Agilent 6980A) com um detector de condutividade térmica (da sigla em inglês *termal conductivity detector*, TCD), com hélio como gás transportador com um fluxo de 46,7 mL.minuto^{-1}. A temperatura de injeção foi de 280°C, a temperatura do forno foi de 60°C e a temperatura do detector foi de 250°C. A coluna capilar HP-Plot Q 30 m × 530 mm × 40 mm coluna foi utilizado no sistema. Os volumes de metano produzidas e oxigênio foram normalizados para condição padrão de temperatura e pressão (273 K e 101,3 kPa).

Durante o teste, o metano e oxigênio foi retirado dos frascos da mesma maneira que o BTEX, contudo, o volume de injeção no GC-TCD foi de 250 µL.

A fim de calibrar o equipamento, em cada dia de medição, as duas misturas de gás padrão foram utilizados com as composições de 65, 25 e 10%; e 25, 55 e 20% de metano e oxigênio, respectivamente.

3.2.7.3. pH

Devido à impossibilidade de abrir os frascos durante o processo de biodegradação não foi possível utilizar um pHmetro. Contudo, pequenas gotas das alíquotas líquidas periódicas foram despejadas em papel indicador para monitorar mudanças bruscas no pH do meio de cultura.

3.3. Resultados e Discussões

Pelos ensaios realizados, foi possível entender como funciona a biotransformação de fluorcarbonados dos materiais de estudo. Além disso, a interação entre AFFF e BTEX durante a biotransformação dos compostos foi investigada. As metodologias foram adotadas para determinar se a AFFF poderia ser preferencialmente degradada em presença de BTEX. Mudanças no metabolismo da comunidade microbiana indicariam uma via de biodegradação compartilhada entre esses compostos. A observação de que ocorre a otimização de biotransformação de compostos perfluorados ao adicionar BTEX, ou o aumento da biodegradação de BTEX pela presença de AFFF indicaria uma interferência entre os compostos em situações de co-contaminação que ocorrem em cenários ambientais reais.

Os resultados apresentados nesta tese correspondem à última de quatro séries de experimentos piloto. As séries anteriores foram necessárias para otimização de protocolo e obtenção de dados sobre os produtos de biodegradação encontrados. Os resultados anteriores podem ser observados no Apêndice A (resultados de LC-MS / MS) e B (resultados de GC-FID).

3.3.1. Biodegradação de BTEX

A biodegradação da mistura de BTEX ocorreu em proporções aproximadas para cada um dos componentes. Em nenhum dos ensaios houve uma maior ou menor taxa de biodegradação de um dos elementos especificamente. Em outras palavras, o benzeno não foi degradado em maior taxa que o tolueno, ou o o-xileno foi degradado em maior taxa que o benzeno, por exemplo. A taxa de biodegradação de todos os componentes de BTEX foi igual. Assim, para discutir os resultados desse estudo mais objetivamente, deu-se preferência a demonstrar apenas os resultados para benzeno nessa seção. Os resultados para tolueno, etil-benzeno e o-xileno obtidos no GC-FID podem ser observados no Apêndice B.

Para a manutenção da cultura nos frascos aeróbios, a mistura de BTEX foi adicionada periodicamente a todos os frascos de 160 mL conforme as Figuras 37 e 38. Os ensaios anaeróbios não passaram por processo de biodegradação no intervalo de tempo estudado e serão discutidos posteriormente nesse capítulo. As quantidades de BTEX adicionadas aos frascos foram iguais para todos os ensaios e

estão indicadas pelas linhas em laranja (Figura 37 e 38). O enriquecimento das culturas com BTEX foi feita inicialmente em um intervalo de 20 dias na concentração de aproximadamente 1,5 mM de cada componente e após 40 dias foi adicionado aproximadamente 0,7 mM de BTEX a cada 10 dias. Tanto o controle do meio com BTEX (ensaio MC+), quanto o controle de AFFF com BTEX (ensaio FC+) não possuíam solo, logo, a microbiota local era muito reduzida - ou inexistente - para que ocorresse a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Com isso, o monitoramento desses meios permitiu verificar se as quantidades adicionadas aos ensaios estavam corretas, além de determinar possíveis vazamentos de BTEX ao longo do experimento ou a adsorção dos voláteis à tampa dos frascos.

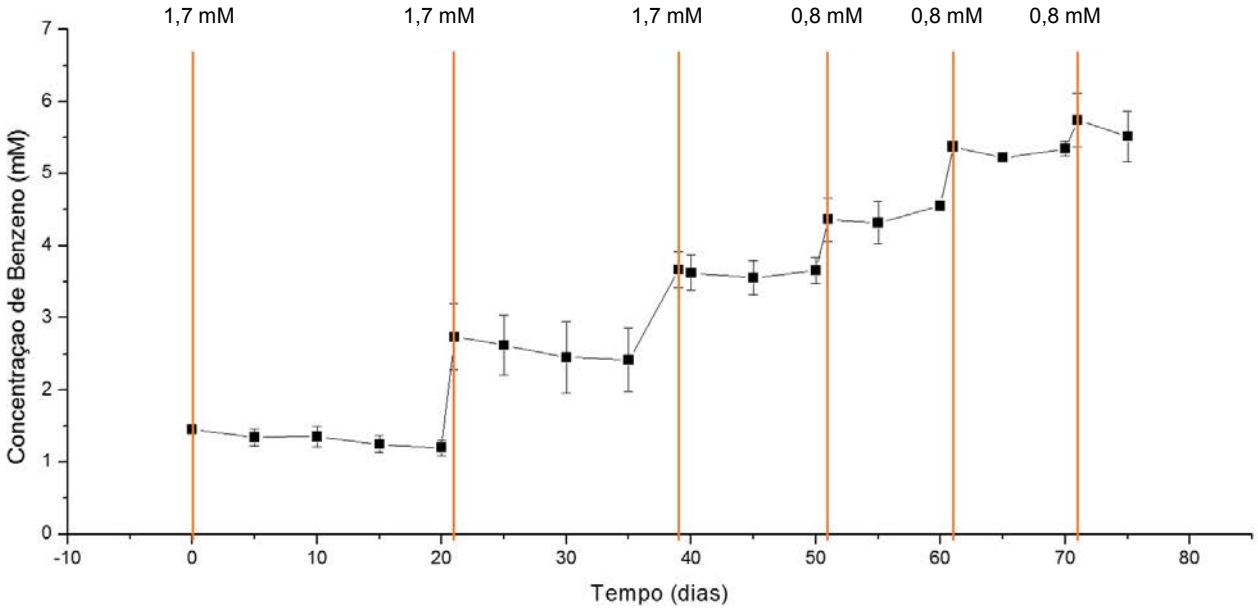


Figura 37 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco FC+ durante o monitoramento da biodegradação. As linhas laranja indicam os períodos em que benzeno foi adicionado a cada enriquecimento da cultura. A concentração adicionada ao meio é indicada pelos números acima das linhas verticais (FC+: Controle de AFFF contendo BTEX). Fonte: Elaborado pelo autor.

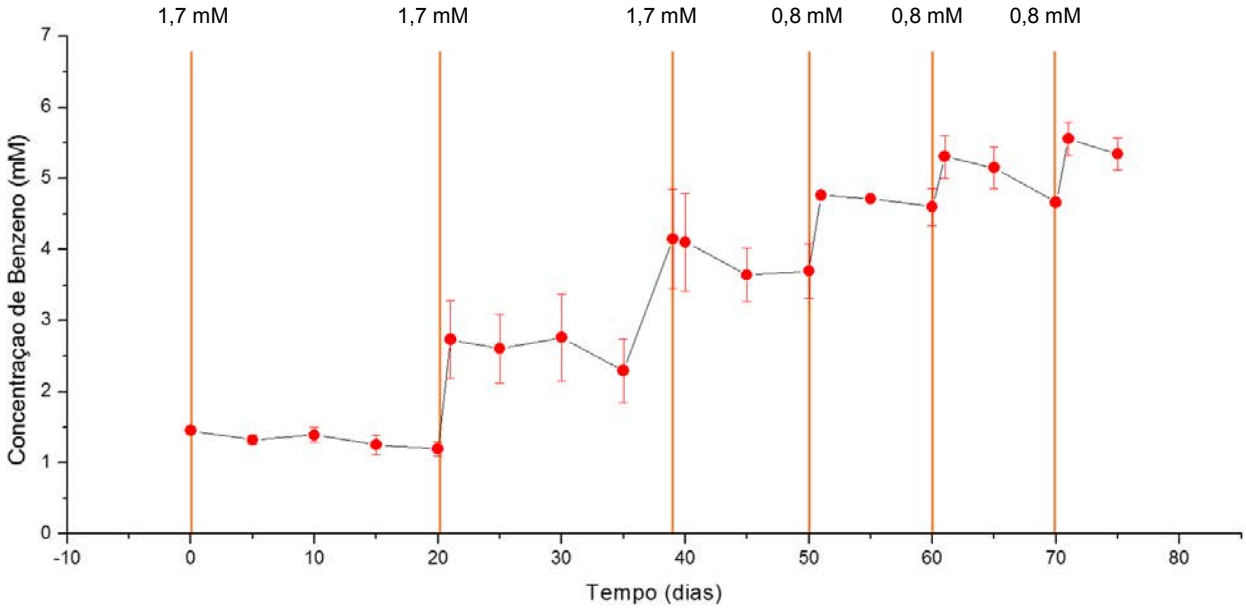


Figura 38 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco MC+ durante o monitoramento da biodegradação. As linhas laranja indicam os períodos em que benzeno foi adicionado a cada enriquecimento da cultura. A concentração adicionada ao meio é indicada pelos números acima das linhas verticais (MC+: Controle do meio contendo BTEX). Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi importante ter cuidado com a concentração de substrato de hidrocarbonetos aromáticos a serem adicionados ao meio de cultura. Se a quantidade de BTEX fosse muito alta, poderia ocorrer um efeito tóxico para as células. A inibição pelo substrato e sua concentração crítica varia bastante entre microrganismos e consórcios microbianos. A adição de 100,0 $mg.L^{-1}$ de BTEX aos ensaios foi um ajuste seguro, considerando tanto a literatura quanto os ensaios piloto. Li et al. (2006) demonstraram, por exemplo, inibição de *Planococcus* sp. em concentrações de benzeno superior a 100 $mg.L^{-1}$, assim como Hamed et al. (2003) demonstraram que *Pseudomonas putida* não consegue metabolizar completamente benzeno e tolueno em concentrações superiores a 380 $mg.L^{-1}$ e 420 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Concentrações iniciais altas de BTEX podem inibir a atividade microbiana devido a complexas interações em nível molecular com mecanismos enzimáticos e (MATHUR; MAJUMDER, 2010), por isso, devem ser bem delimitadas em um desenho experimental para biodegradação. A escolha de 25,0 $mg.L^{-1}$ por componente foi definida também levando em conta os experimentos de Dou et al. (2007), para metabolismo de BTEX em anaerobiose sob condições de redução de nitrato e sulfato.

A Figura 39 mostra a concentração de benzeno no controle autoclavado contendo BTEX (AC+).

O ensaio autoclavado permitiu verificar a esterilidade dos ensaios ao longo do tempo. Tanto o procedimento de amostragem do meio liquido quanto dos gases eram feitos com seringas e agulhas descartáveis e estéreis. Contudo, foi observado em ensaios piloto que o prolongamento do experimento para intervalos superiores a 100 dias, utilizando os mesmos protocolos de amostragem e análise, causava a pequenos indícios de contaminação, devido ao desgaste da tampa de borracha dos frascos. A contaminação inviabiliza os experimentos e as conclusões sobre biodegradação e biotransformação. Por esse motivo, a coleta de dados final de todos os experimentos seguintes foi no período de 75 a 90 dias.

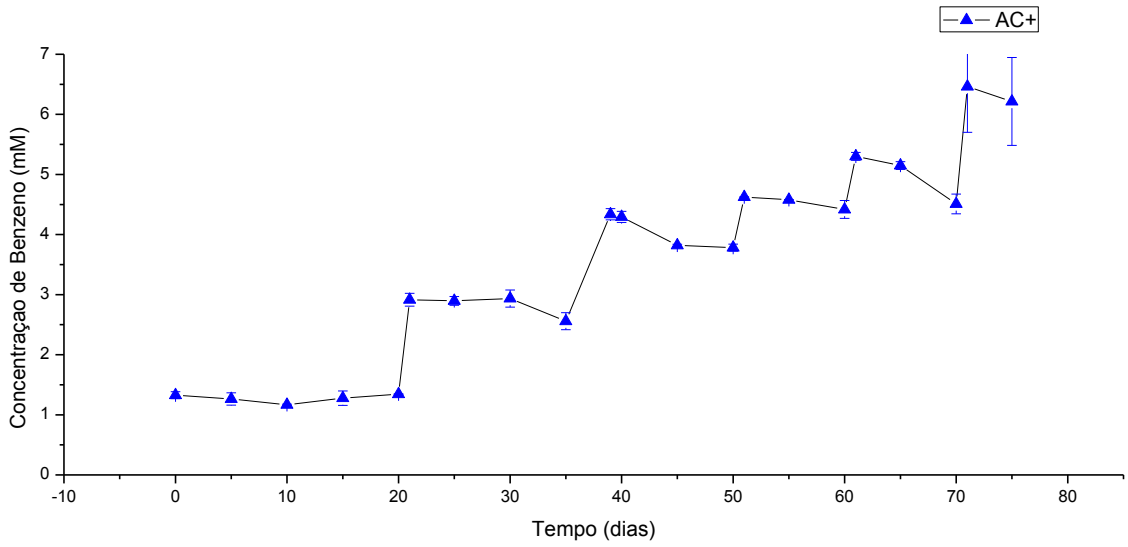


Figura 39 - Concentração de benzeno periodicamente adicionado ao frasco AC+ durante o monitoramento da biodegradação. (AC+: Controle autoclavado contendo BTEX). Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observada a biodegradação de BTEX nos ensaios aeróbios no solo A (Campo de treinamento Ellsworth da força aérea americana) e B (Refinaria de petróleo Replan), conforme as Figuras 40 e 41, respectivamente.

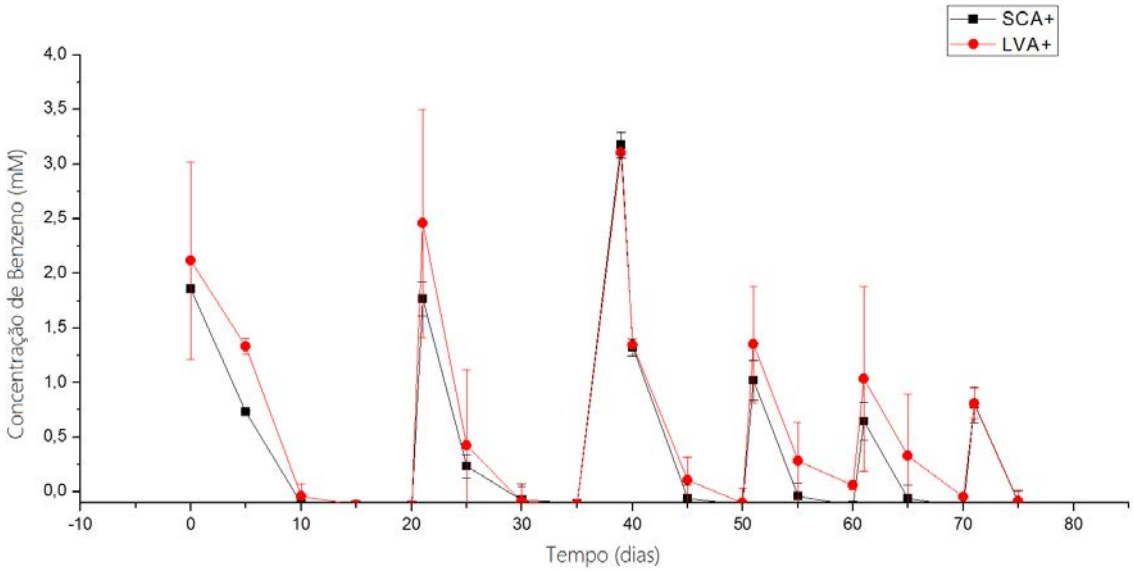


Figura 40 - Concentração de benzeno nos ensaios de biodegradação com solo A (SCA+: Controle de solo A, LVA+: Ensaio de biodegradação com solo A). Fonte: Elaborado pelo autor.

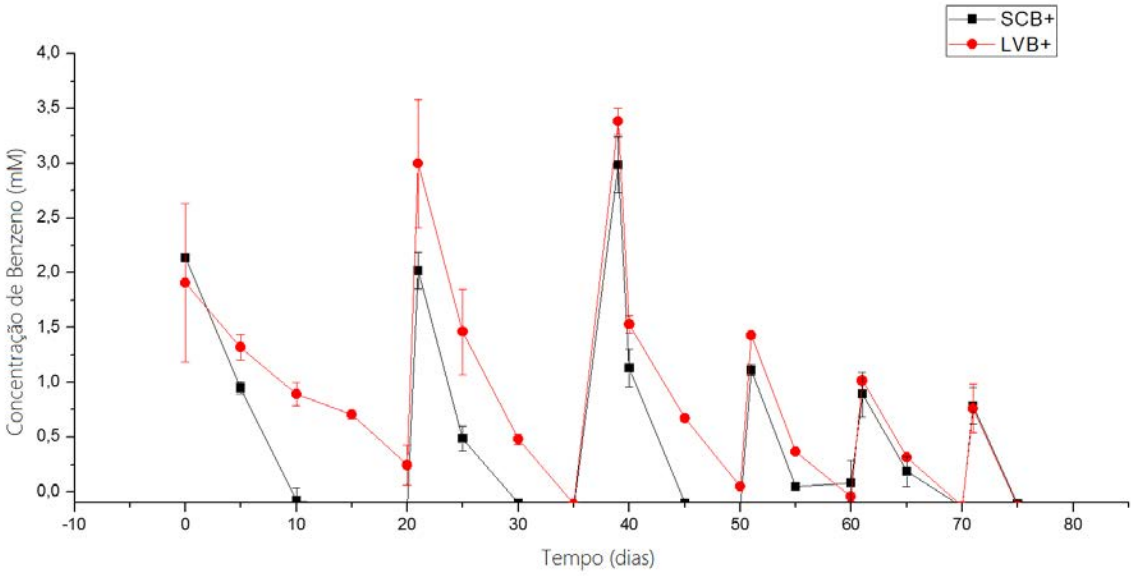


Figura 41 - Concentração de benzeno nos ensaios de biodegradação com solo B (SCB+: Controle de solo B, LVB+: Ensaio de biodegradação com Solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

O solo A, apresentou melhor desempenho na biodegradação de benzeno que o solo da B nos primeiros 40 dias nos ensaios de biodegradação LV+ (Figura 40 e 41). Isso é observado pelo menor tempo para depleção completa do benzeno a cada

intervalo de enriquecimento da cultura. Em outras palavras, enquanto nos ensaios LVA+ não existia mais concentração de benzeno detectável nos primeiros 10 dias, nos ensaios LVB+ ainda existia 0,874±0,040 mM de benzeno disponível para os microrganismos do meio.

Entretanto, após 70 dias, ambas as comunidades microbianas se adaptaram ao substrato e metabolizaram o BTEX em taxas comparáveis.

A adaptação microbiana ao BTEX foi extensivamente estudada (EL-NAAS et al., 2014). Sabe-se que o histórico adaptativo de uma comunidade microbiana afeta o padrão de biodegradação de compostos e melhora o desempenho de remoção dos compostos aromáticos do ambiente. Yeom et al. (1997) demonstrou, por exemplo, que até mesmo adaptado a apenas um dos compostos aromaticos, no caso benzeno, *Alcaligenes xylosoxidans* foi capaz de degradar tolueno, m-xileno e etil-benzeno mais rapidamente que ensaios controle.

Pseudomonas é um gênero bastante conhecido pela capacidade de degradar compostos aromáticos (MARTINO et al., 2012). Em linhas gerais, o processo de biodegradação de BTEX pode ser exemplificado baseado no estudo de Mazzeo et al. (2010). De acordo com os autores, *Pseudomonas putida* é capaz de quebrar os components de BTEX utilizando um caminho metabólico baseado na oxidação direta de anéis aromáticos por mono-oxigenases ou di-oxigenases para formar catecol. Este, por sua vez, é subsequentemente quebrado em 2,3-dioxigenase e os metabólitos gerados nesse segundo estágios são consumidos no ciclo de Krebs.

A diferença entre os controles de solo contendo BTEX sem AFFF (SCA+ e SCB+) e ensaios de biodegradação contendo solo, BTEX e AFFF (LVA+ e LVB+) mostra como funciona a dinâmica de co-metabolização de poluentes por duas comunidades de solo. Uma delas é mais adaptada (Solo A) e outra menos (Solo B) a casos de co-contaminação de BTEX e AFFF.

No caso do solo A (Ellsworth), há registros de intensa e frequente liberação de AFFF e hidrocarbonetos, incluindo BTEX. Com isso, a microbiota é capaz de metabolizar de maneira mais eficiente o BTEX junto à AFFF. No caso do solo B (Replan), a liberação de AFFF foi muito menos frequente, pois apenas raras situações de emergência necessitavam a liberação de compostos fluorcarbonados no ambiente. A co-contaminação, neste caso, causou um distúrbio na microbiota e teve influência negativa no processo de biodegradação de BTEX.

Ensaios piloto com solo Controle, livre de histórico de contaminação por BTEX e AFFF, obtidos no próprio campus da Universidade da Califórnia em Berkeley, coletado próximo a Strawberry Creek (em frente ao Stanley Hall) demonstram que, ainda sim, tanto o solo A (Ellsworth) quanto o B (Replan) apresentam maior potencial de biodegradação de BTEX (Figura 42). Isso pode ser explicado pela microbiota adaptada a hidrocarbonetos de petróleo.

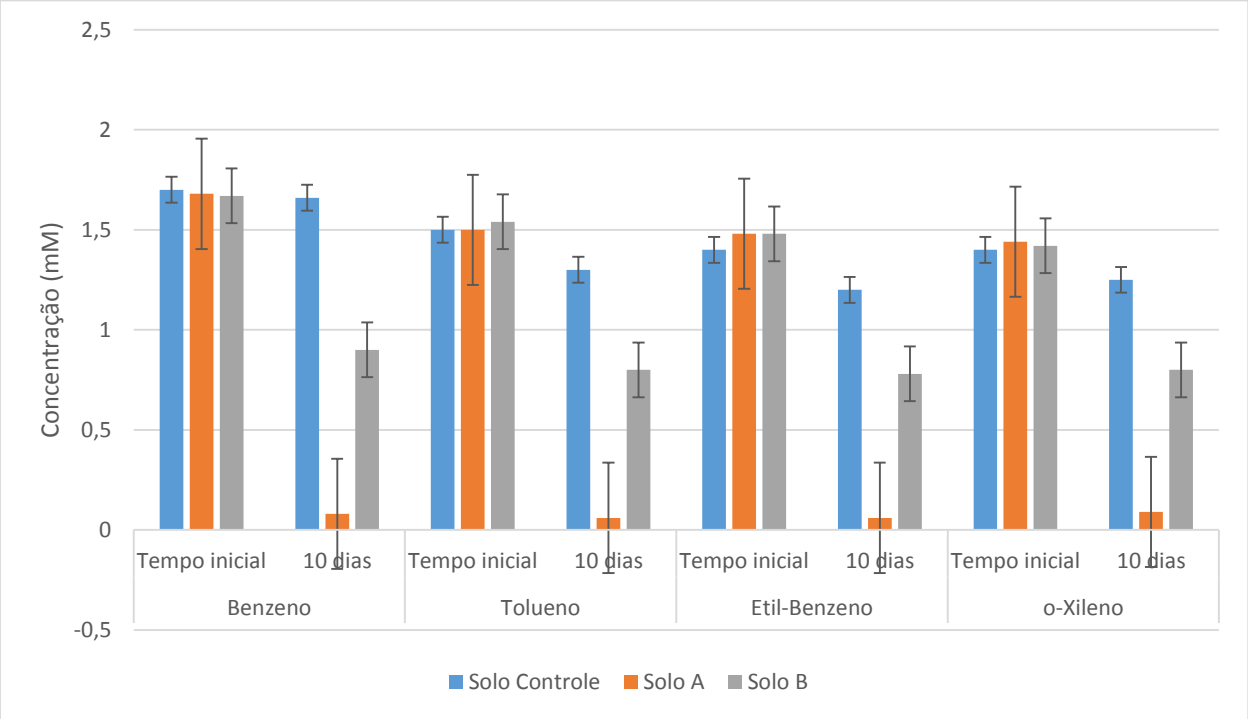


Figura 42 – Biodegradação de BTEX nos solos controle (Strawberry Creek), A (Ellsworth) e B (Replan) no tempo inicial e 10 dias. As barras de erro maiores em amostras de solo A corresponde a uma amostra discrepante da triplicata contendo maior quantidade de BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de apenas BTEX não pode indicar, no entanto, se a lentidão na biodegradação de BTEX do solo B é devido à presença da AFFF. No entanto, foi possível concluir que ambas as microbiotas eram adaptadas ao BTEX, quando comparadas a um solo livre de contaminação. Isso é confirmado por outros trabalhos que indicam um desempenho melhor de biodegradação de BTEX, a partir de solos de refinaria de petróleo ou postos de gasolina (NICHOLSON; FATHEPURE, 2004; MORLETT-CHAVÉZ et al., 2010).

Com relação aos ensaios de anaerobiose, a medidas por GC-FID não detectaram grande atividade de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo em anaerobiose, ao longo da duração do experimento. Os picos de resposta de BTEX no tempo final foram levemente menores que no início, indicando uma biodegradação muito menor, ou mesmo inexistente em alguns ensaios, quando comparado aos ensaios aeróbios, conforme Figura 43. Não foram feitos enriquecimentos periódicos nesses frascos.

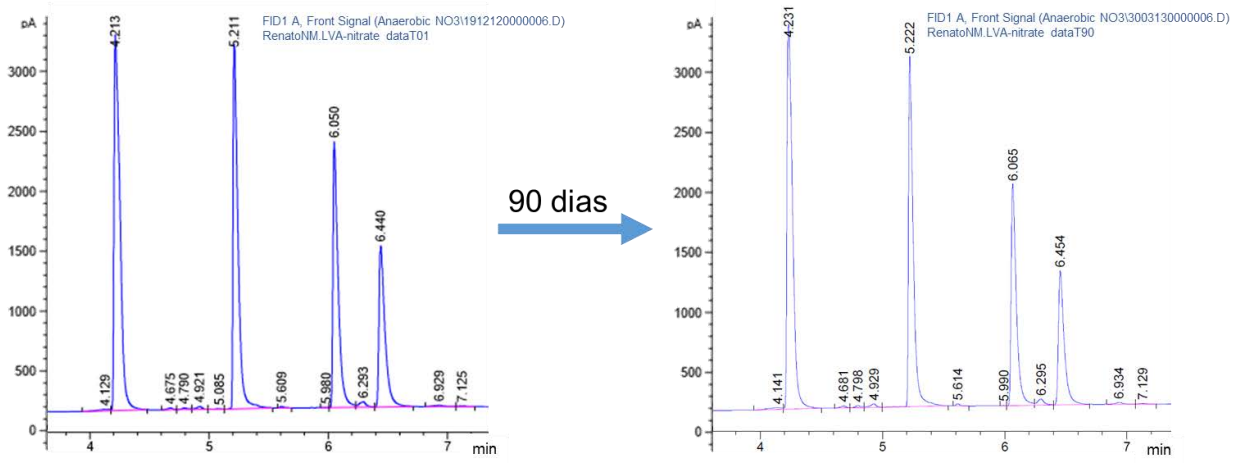


Figura 43 – Cromatografia dos ensaios anaeróbios de biodegradação contendo BTEX LVA+ em condições de redução de nitrato. Fonte: Elaborado pelo autor.

As condições metanogênicas de anaerobiose também não apresentaram atividade significativa de biodegradação ao término de 90 dias. Todos os dados sobre anaerobiose podem ser consultados no Apêndice B.

A persistência de BTEX observado nos experimentos contaminados por AFFF foi observada também por Barbaro et al. (1992) e Kao; Borden (1997), para outros ambientes, sob condições de redução de nitrato. Apesar dos ambientes não apresentarem nenhuma contaminação por AFFF, os autores demonstraram que benzeno, dentre outros metabólitos secundários de BTEX, podem ser persistentes em anaerobiose.

A biodegradação de BTEX acontece em grande parte por comunidades microbianas aeróbias (DEEB; ALVAREZ-COHEN, 2000). Os compostos aromáticos são rapidamente degradados sob condições aeróbias, mas demoram um tempo longo em condições anaeróbias (DEEB; ALVAREZ-COHEN, 1999; SCHREIBER; BAHR,

2002). A biodegradação aeróbia tem um alcance catabólico e velocidades de reação maiores (CHIANG et al., 1989, RUIZ-AGUILAR et al., 2002).

É necessário acrescentar a essa discussão, no entanto, que os processos aeróbios não são a unica maneira na qual BTEX está exposto no ambiente. Camadas inferiores de solos contaminados com hidrocarbonetos são frequentemente anaeróbios, como um resultado de microrganismos nativos consumirem o oxigênio molecular disponível rapidamente. A maioria dos contaminantes de hidrocarbonetos penetram o solo e são degradados dentro das zonas anaeróbiaas, o que implica que eles estão sendo biodegradados por bactérias anaeróbias. Portanto, nestes locais, a degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos pode ser um mecanismo dependente da atividade de bactérias capazes de metabolizar hidrocarbonetos (CUNNINGHAM et al., 2001). BTEX pode ser degradado e muitas vezes completamente oxidado em CO_2, sob condições desnitrificantes (SCHREIBER; BAHR, 2002), quando existe uma microbiota adaptada.

3.3.2. Biotransformação de AFFF

3.3.2.1. Análise qualitativa da via metabólica

A AFFF é uma mistura complexa de substâncias contendo flúor em sua estrutura e resultados sobre sua biotransformação são poucos na literatura. Os diversos tipos de compostos fluorcarbonados na formulação de AFFF comercial foram monitorados com sucesso nos experimentos. A biotransformação deles indica que algum processo biológico pode estar alterando a estrutura e metabolizando a substância.

A porção contendo os compostos perfluorados é conhecida pelo nome comercial Lodyne (mistura de 4:2, 6:2 e 8:2 FtTAoS), e a porção não fluorada de surfactante dietilenoglicol-butil-éter é conhecida como butil carbitol. Juntas, essas substâncias compõem a formulação da AFFF da marca Ansul. Em geral, os principais componentes da porção Lodyne seguem a via metabólica de biotransformação descrita por Backe et al. (2013) na Figura 43.

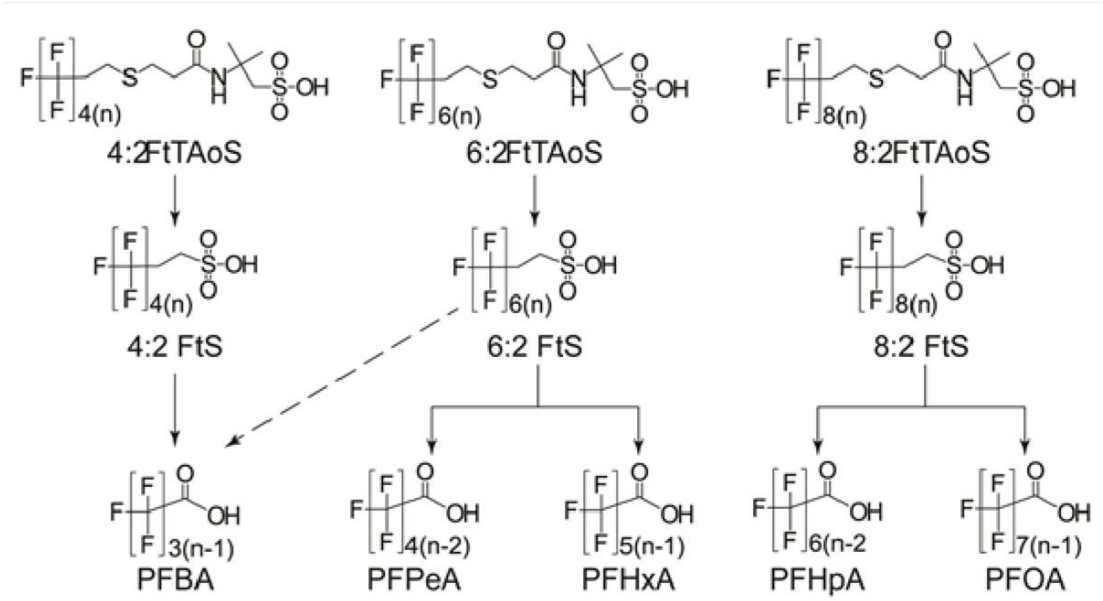


Figura 43 – Formação de PFCAs em microcosmos aeróbios a partir de Lodyne em cadeias carbônicas perfluoradas de 4 a 8 carbonos - (n) indica o número de carbonos perfluorados na cadeia. Fonte: Reproduzido de Backe et al. (2013).

De acordo com a análise por LC-MS / MS em baixa diluição, Lodyne de 6 carbonos perfluorados corresponde a 90% de todos os PFCs da AFFF estudada, contudo são detectáveis também cadeias perfluoradas de 8 e 4 carbonos (Figura 44) em concentrações de duas ordens de magnitude mais baixas. Logo, a concentração de 6:2 FtTAoS é cerca de 100x maior que 4:2 FtTAoS ou 8:2 FtTAoS.

Além disso, desconsiderando a maior proporção de 6:2 FtTAoS, houve uma preferência do metabolismo microbiano para transformar as cadeias de 6 carbonos, ao invés das cadeias de 4 e 8 carbonos. A remoção de 6:2 FtTAoS foi completa em alguns ensaios, enquanto a remoção de 4:2 e 8:2 FtTAoS foi de até 12,7±3,2% e 8,0±4,2%, respectivamente.

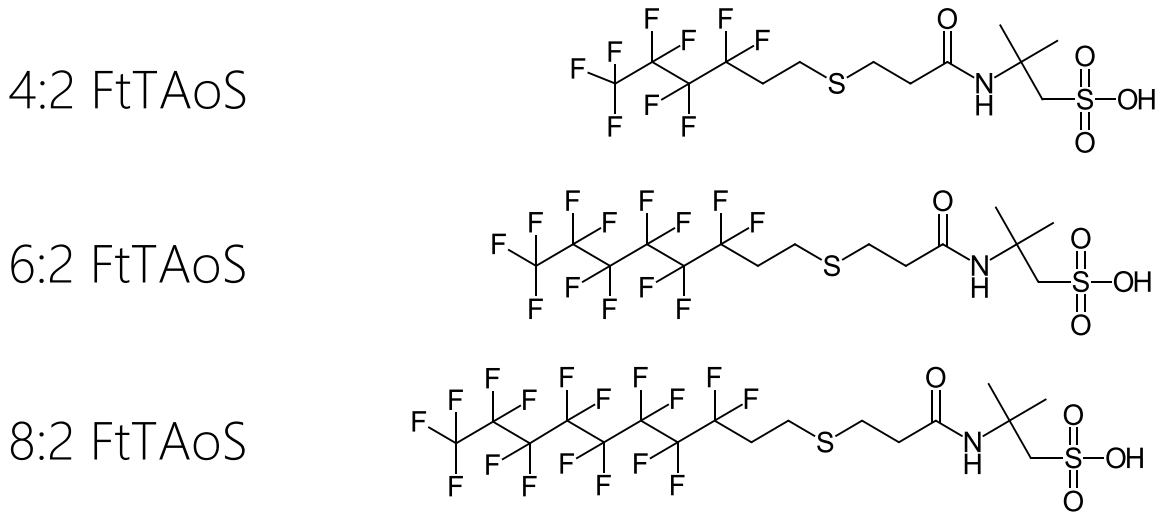


Figura 44 - Compostos perfluorados telomerados encontrados em AFFF produzida pela Ansul. Fonte: Elaborado pelo autor.

O principal componente 6:2 FtTAoS apresentou maior biodegradação. Foi observado também o aparecimento de outros 2 compostos. A hipótese foi de que esses novos compostos foram produzidos a partir do metabolismo de 6:2 FtTAoS, produzindo assim 6:2 FtS e posteriormente PFHxA. Foi estabelecido que o padrão mais importante na biotransformação da AFFF da marca Ansul utilizada na série de experimentos estudada é o descrito na Figura 45. Este padrão principal foi o foco de discussão na quantificação dos produtos de biotransformação.

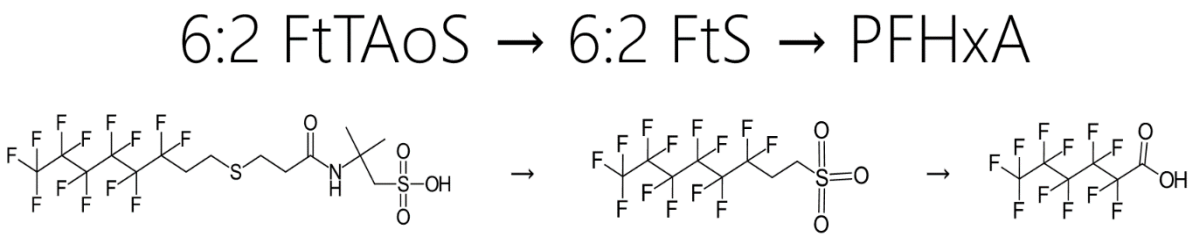


Figura 45 - Principal via metabólica de biodegradação de 6:2 FtTAoS (Lodyne). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados encontrados nesse estudo diferem da proposta de Backe et al. (2013). Em seu trabalho, acreditava-se que 6:2 FtS pode ser transformado em PFPeA em quantidades iguais a PFHxA, contudo, as concentrações detectadas dessas moléculas foram muito baixas, bem próximas ao limite de resolução do aparelho.

Schulz et al. (2004) encontraram, em um dos primeiros trabalhos de identificação dos compostos de AFFF, altas concentrações de fluortelômeros tioamido sulfonados nas formulações, embora não havia dados sobre sua ocorrência e comportamento em ambientes simulados ou reais. A detecção desses compostos em amostras ambientais, contudo é bastante difícil, mesmo para análises qualitativas, conforme ensaios anteriores com 6:2 e 8:2 FtS por Oakes et al. (2010). Por isso, a delimitação de uma via metabólica como alvo de estudo é importante na determinação dos produtos de biotransformação de AFFF.

A variedade de formulações disponíveis no mercado dificulta o entendimento do comportamento dos fluorcarbonados. Contudo, a elucidação sobre as vias metabólicas em procedimentos experimentais permiter delimitar com maior precisão o que ocorre de fato com os PFCs. Nos últimos 5 anos, o esforço conjunto de pesquisadores tem promovido avanços significativos na detecção, analise e quantificação das amostras de fluorcarbonados.

3.3.2.2. Análise quantitativa da biotransformação

A análise qualitativa das moléculas ao longo do processo de biotransformação permitiu definir o caminho metabólico a ser explorado, quantitativamente, em todos os ensaios aeróbios. Utilizando LC-MS / MS, foi possível detectar variações na molécula precursora da formulação original da AFFF (6:2 FtTAoS), ao longo do tempo de biodegradação em aerobiose (Figuras 46 e 47). O processo de biotransformação anaeróbio será discutido posteriormente nessa seção.

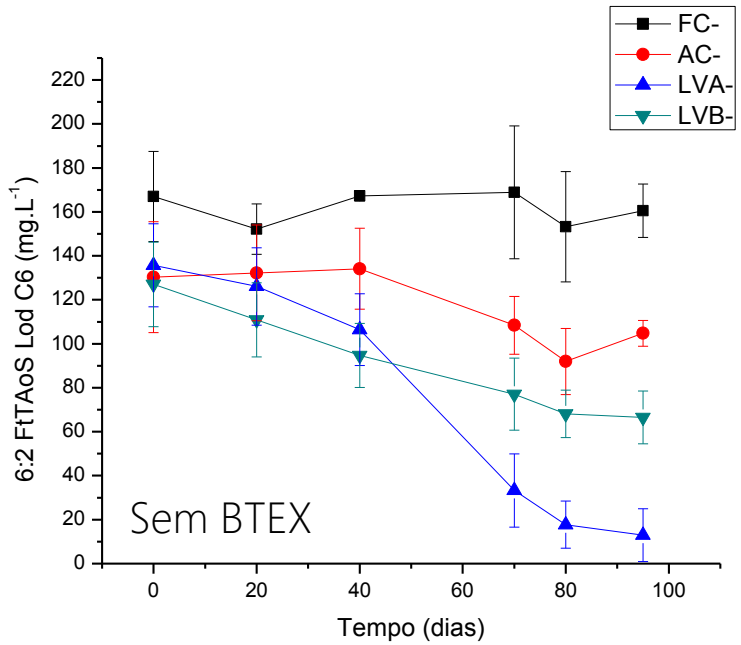


Figura 46 - Concentração de 6:2 FtTAoS (principal componente de Lodyne) nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC-: Controle de AFFF, AC-: Controle autoclavado, LVA-: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB:Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

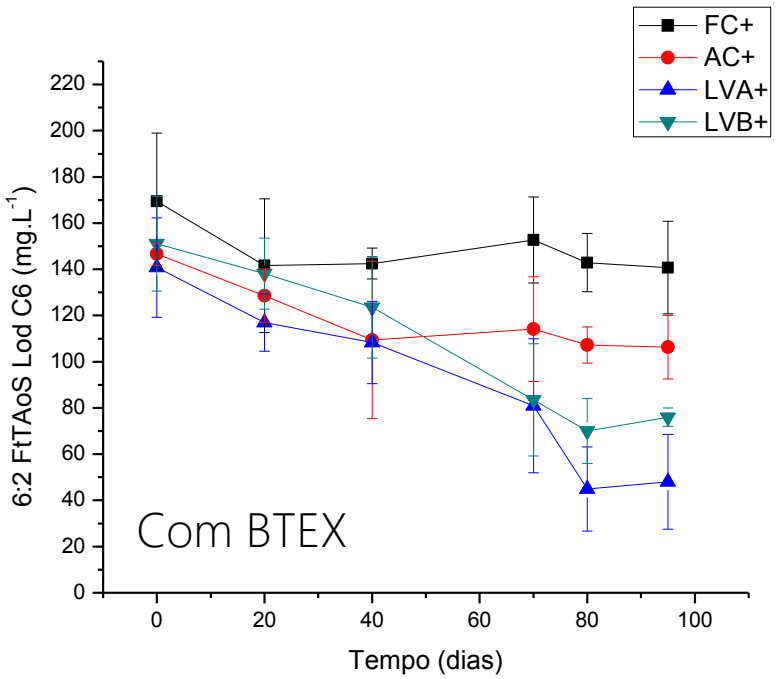


Figura 47 - Concentração de 6:2 FtTAoS (principal componente de Lodyne) nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA+: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB+: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras 46 e 47 mostraram que a presença de BTEX influenciou negativamente o metabolismo dos compostos nos ensaios de solo A. Na ausência de BTEX, o processo de biotransformação diminuiu a concentração de 135,63±18,86 $mg.L^{-1}$ para 12,92±9,90 $mg.L^{-1}$, enquanto na presença de BTEX a diminuição foi de 140,81±21,52 $mg.L^{-1}$ para 47,99±20,48 $mg.L^{-1}$.

O solo B, por sua vez, teve um menor desempenho na biotransformação de 6:2 FtTAoS comparado ao solo A, embora tenha sido afetado pela presença de BTEX.

Esperava-se idealmente que não ocorreria o desenvolvimento de uma cultura de microrganismos ao longo do experimento nos controles autoclavados. Devido ao manuseio durante os procedimentos amostragem, mesmo que seguindo os protocolos de esterilização, ocorre a inoculação em pequenas partes da microbiota local. Contudo, observou-se que a atividade microbiana nos controles autoclavados (AC+ e AC-) foi baixa e, significativamente, diferente dos ensaios SC e LV, quando comparado aos ensaios com uma microbiota ativa.

A diferença nos valores iniciais em ensaios contendo solo (AC e LC) e nos ensaios controle sem solo (FC) é explicada pela adsorção dos fluorcarbonados às partículas de solo.

Ao prosseguir com a análise quantitativa da via metabólica de Lodyne, observou-se que a concentração dos subprodutos de biotransformação aumentou conforme a molécula precursora era metabolizada. Foi observado o aumento na concentração de 6:2 FtS (Figuras 48 e 49). Vale mencionar que, diferentemente da molécula precursora, a escala de produção desses subprodutos é de µg, ao invés de mg.

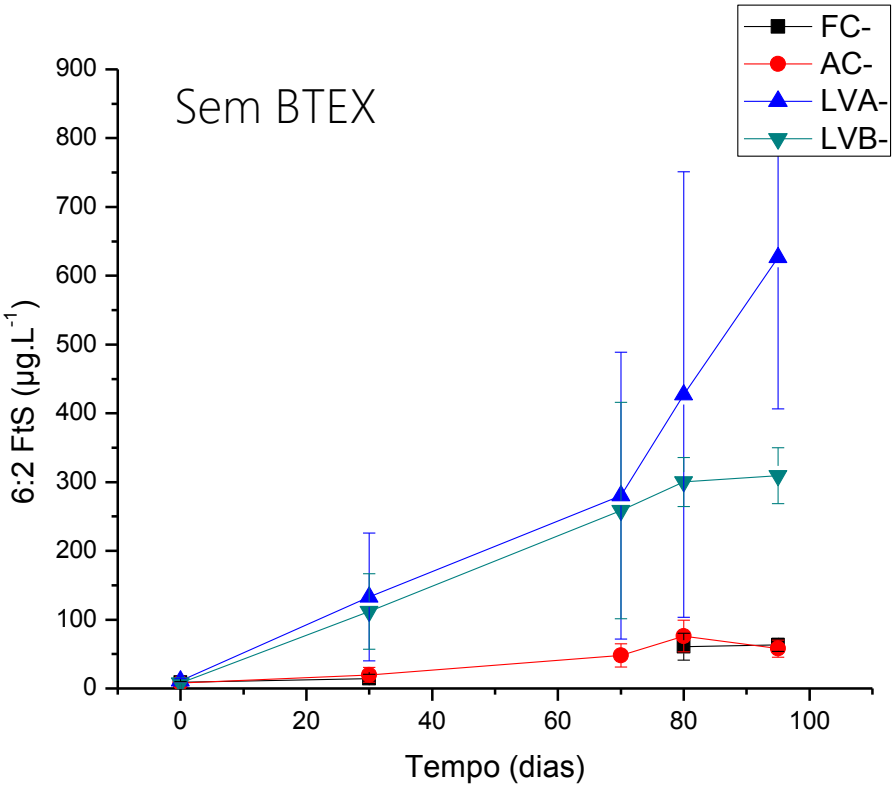


Figura 48 - Concentração de 6:2 FtS nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

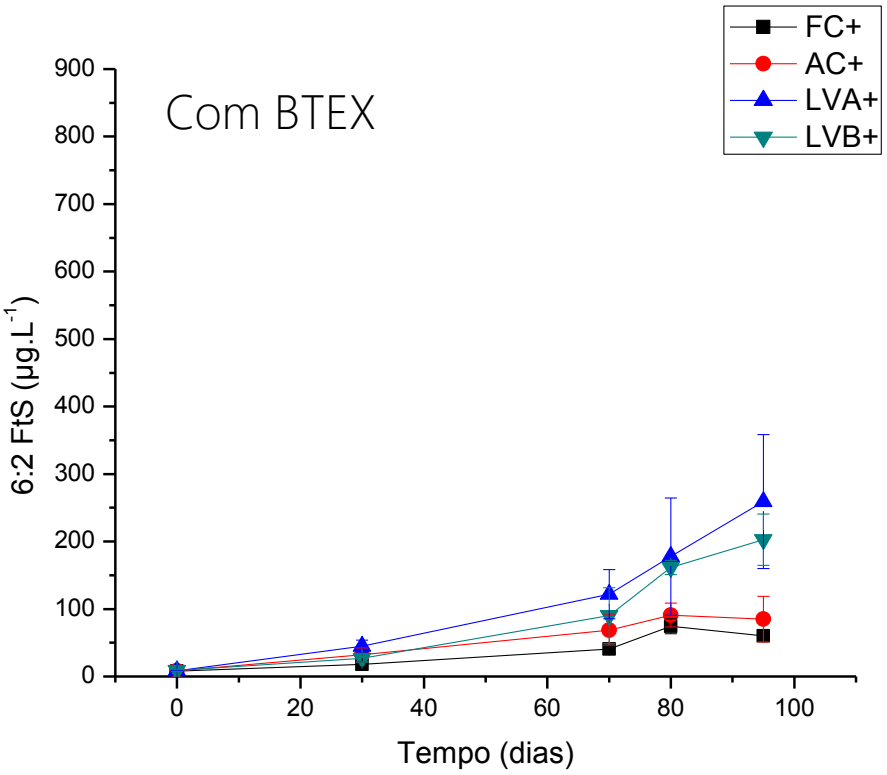


Figura 49 - Concentração de 6:2 FtS nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

Novamente, a produção de produto intermediário da transformação de Lodyne foi menor em ensaios contendo BTEX, principalmente, em ensaios contendo solo A (LVA).

O caminho metabólico proposto na Figura 45 seguiu para o último estágio e, assim, houve aumento da concentração de moléculas de PFHxA a partir de 6:2 FtS (Figuras 50 e 51).

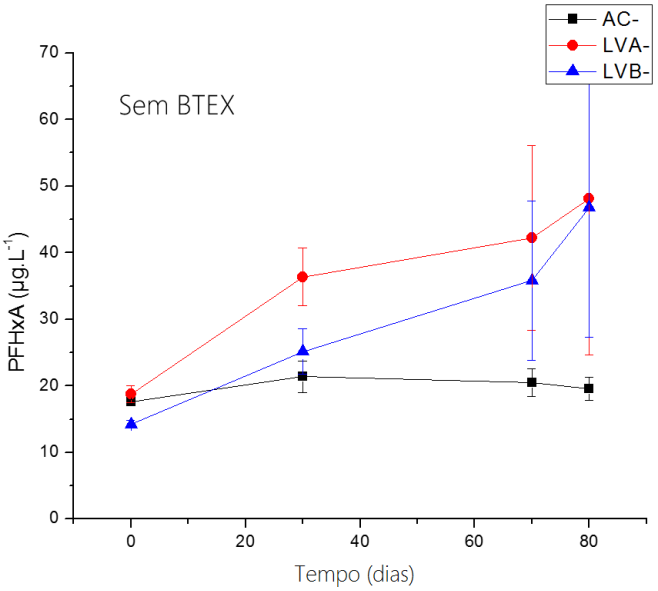


Figura 50 - Concentração de PFHxA nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação sem BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

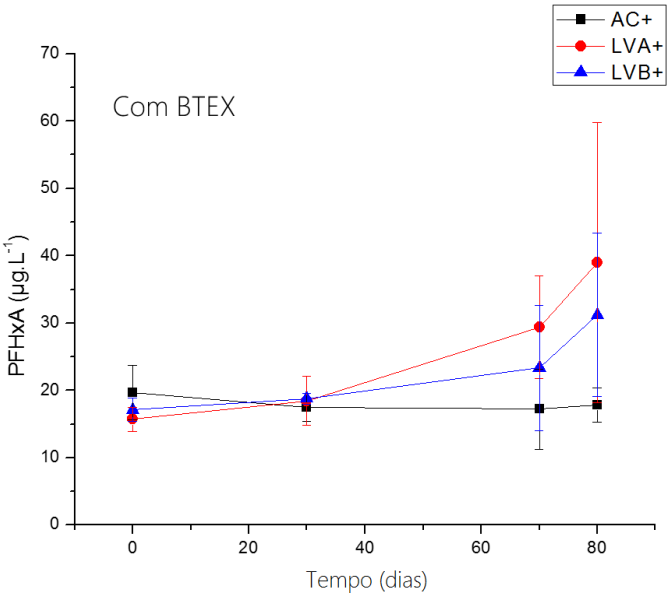


Figura 51 - Concentração de PFHxA nos ensaios aeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como nos ensaios de biodegradação de BTEX, a biotransformação de AFFF foi mais acentuada nos ensaios contendo o solo do centro de treinamento de incêndios de Ellsworth (Solo A). A concentração mais alta de 6:2 FtS como produto de biotransformação também foi encontrada no solo A (621,13±12,40 $\mu g.L^{-1}$), em comparação com o solo B (275,52±19,78 $\mu g.L^{-1}$).

Com relação aos ensaios anaeróbios, não foi detectada a biodegradação de AFFF durante o período observado (Figura 52).

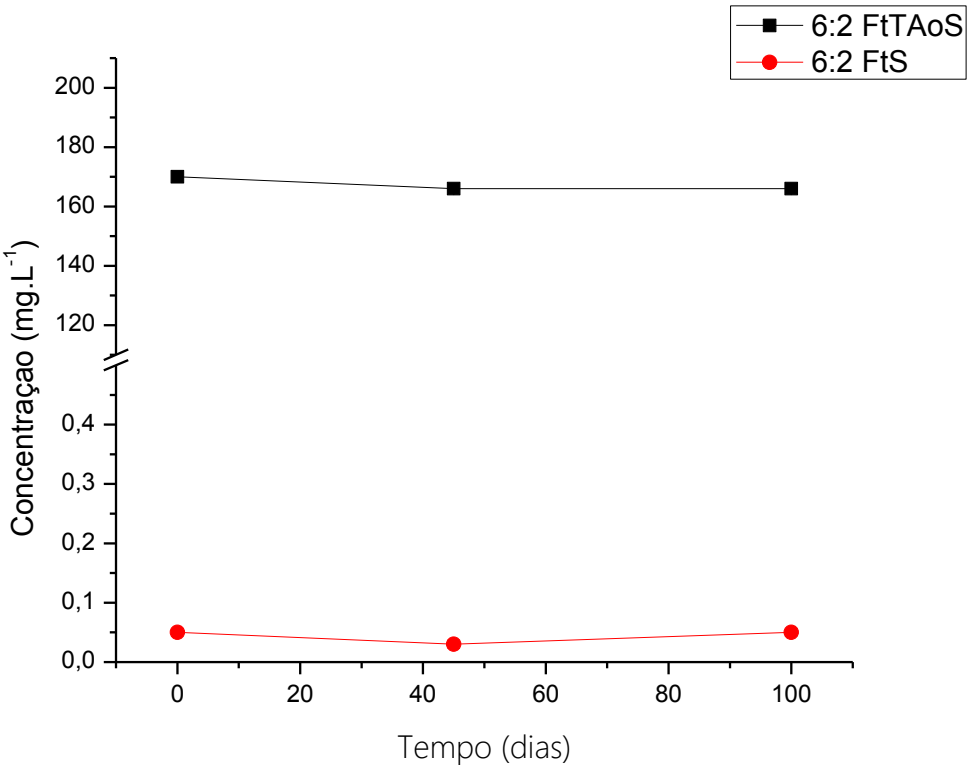


Figura 52 - Concentração de 6:2 FtTAoS e 6:2 FtS nos ensaios anaeróbios ao longo do processo de biotransformação com BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cromatografia iônica da seção 3.3.4 confirmam a ausência de processos biológicos nos ensaios anaeróbios. Apesar disso, o aumento na concentração de outro composto fluorcarbonado denominado Zonyl foi detectado. Por não existirem padrões de quantificação para o composto, e a resposta do equipamento estar inaceitavelmente baixa, não foi possível quantificar o metabolismo anaeróbio de produção desse composto. A detecção foi muito próxima ao limite operacional do LC-MS / MS. Contudo, a detecção de traços desse composto pode

indicar um outro caminho metabólico exclusivo para anaerobiose ainda não proposto e investigado.

3.3.3. Produtos de biotransformação e ensaios POT

Nos ensaios aeróbios, aconteceu a biotransformação do PFC principal da formulação de Lodyne. A Figura 53 resume a diminuição de concentração de 4:2, 6:2 e 8:2 FtTAoS somados nos ensaios de biodegradação.

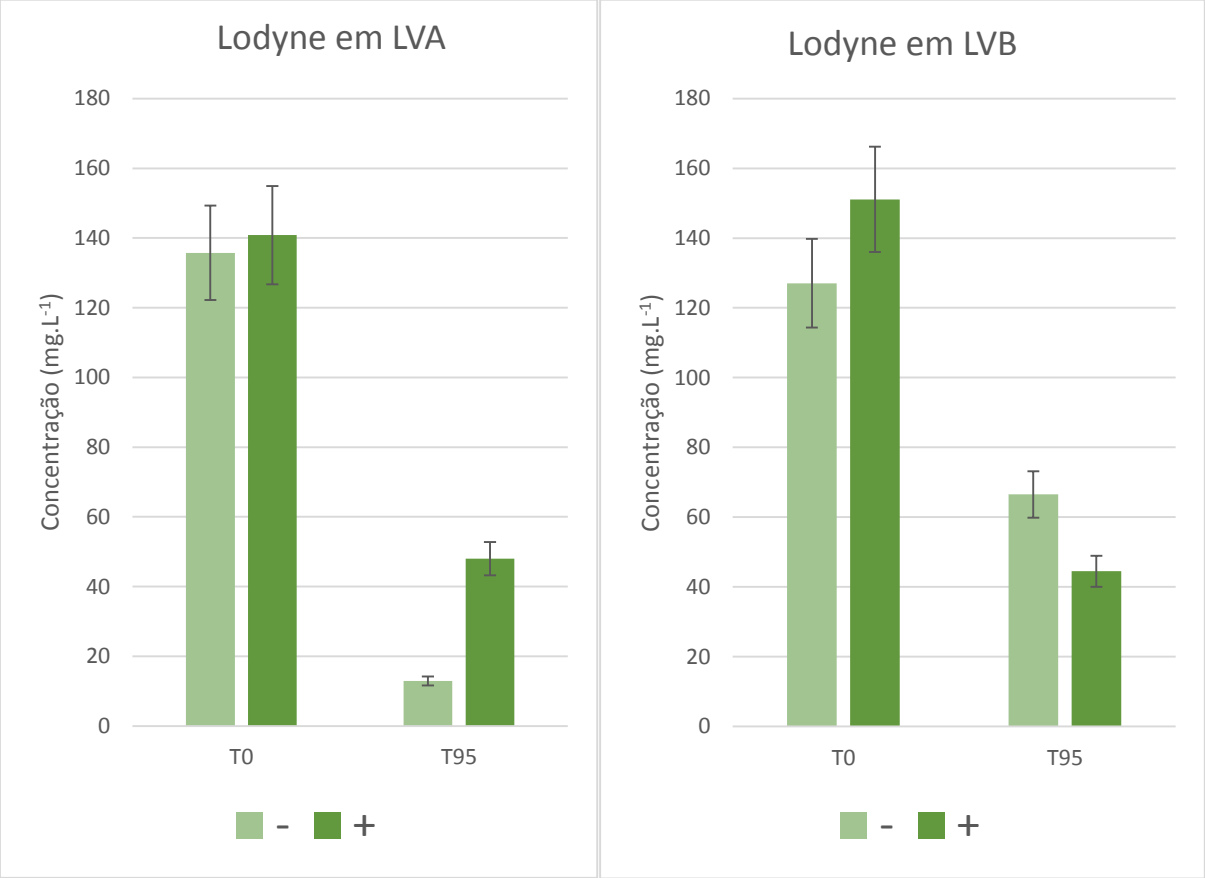


Figura 53 – Concentração de Lodyne nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) e com solo B (LVB) no tempo iniciail (T0) e final (T95) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além do caminho metabólico, apresentado na Figura 45, foi observada a produção de PFPeA em na presença ou ausência de BTEX após 95 dias. A Figura 54 resume os produtos de biodegradação detectados no solo A e no solo B. Foi observado que o composto PFBA, embora encontrado antes e depois do processo de biotransformação, manteve-se inerte ao longo do processo aeróbio de biodegradação.

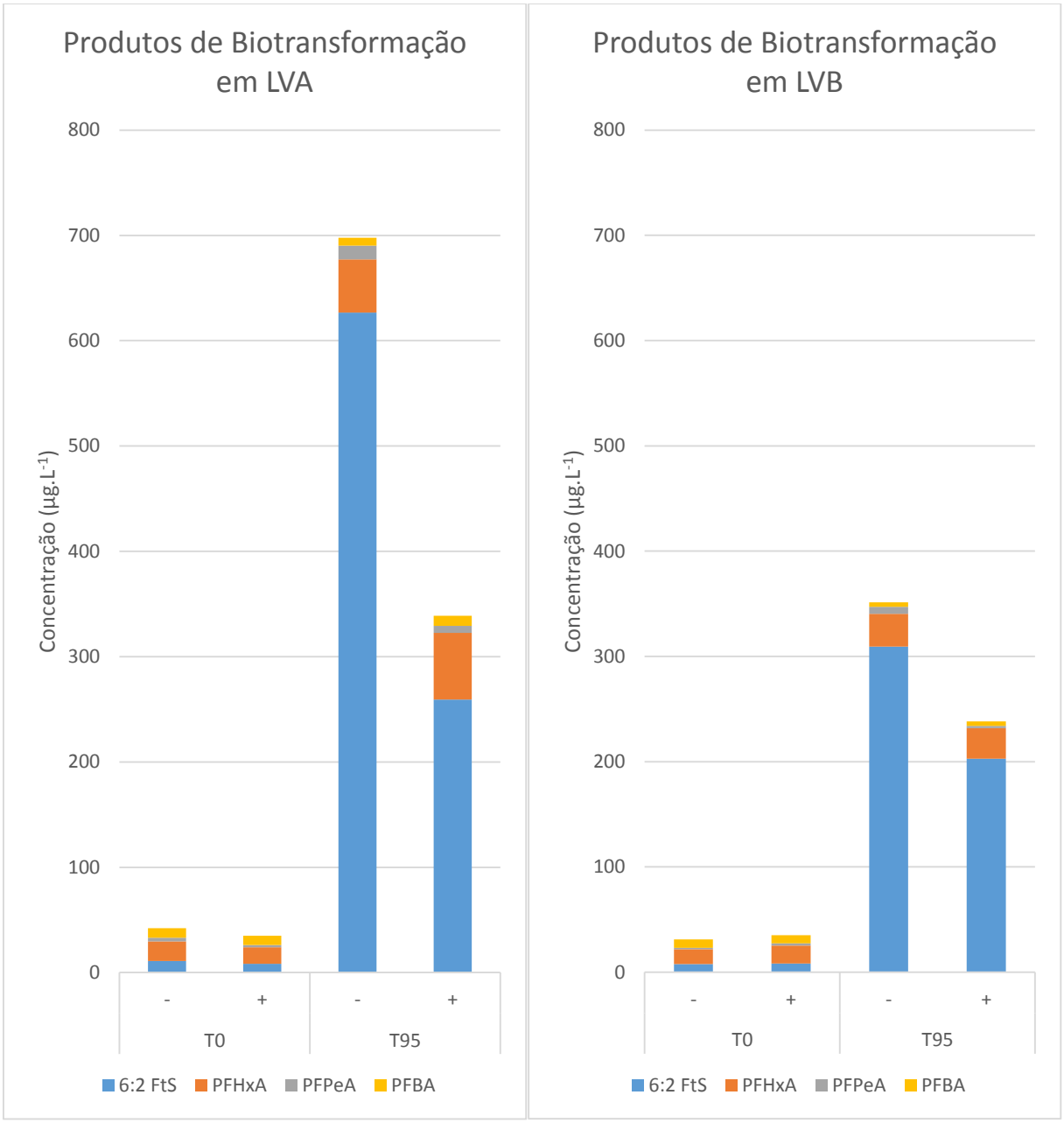


Figura 54 - Concentração dos produtos de biotransformação nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) e com solo B (LVB) no tempo iniciail (T0) e final (T95) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantificação dos produtos de biotransformação forneceram, até o momento, indícios que a presença de uma co-contaminação por BTEX é prejudicial na metabolização dos fluorcarbonados. A partir dessa afirmação foram utilizados ensaios POT (Precursores Totais por Oxidação), para determinar se o metabolismo estaria sendo, na verdade, alterado, gerando novas substâncias.

Para determinar se a presença de BTEX pode alterar o processo de biotransformação de AFFF foram conduzidos ensaios POT e, posteriormente, submetidos a análise por LC-MS / MS. A técnica POT (HOUTZ; SEDLAK, 2012) consiste em degradar totalmente os compostos precursores no tempo inicial e final, por meio de um processo químico. É análogo a análise de TOC (Carbono Orgânico Total), em que a molécula precursora é quebrada em partes menores, detectáveis pelo LC-MS/MS. Conforme a metodologia apresentada em 3.2.5.5: as amostras dos frascos são aquecidas a 85°C por 12h em uma reação com $K_2S_2O_8$ em pH>11, agindo como um processo de biodegradação total semi-instantâneo.

Assim, após todos os produtos serem gerados, espera-se a recuperação de 100% dos compostos no tempo final. Contudo, caso haja defluoração, a recuperação detectável por LC-MS / MS é menor. Isso pode indicar alterações no caminho metabólico e indicar sucesso na remoção do flúor nas moléculas orgânicas presentes (Figura 55).

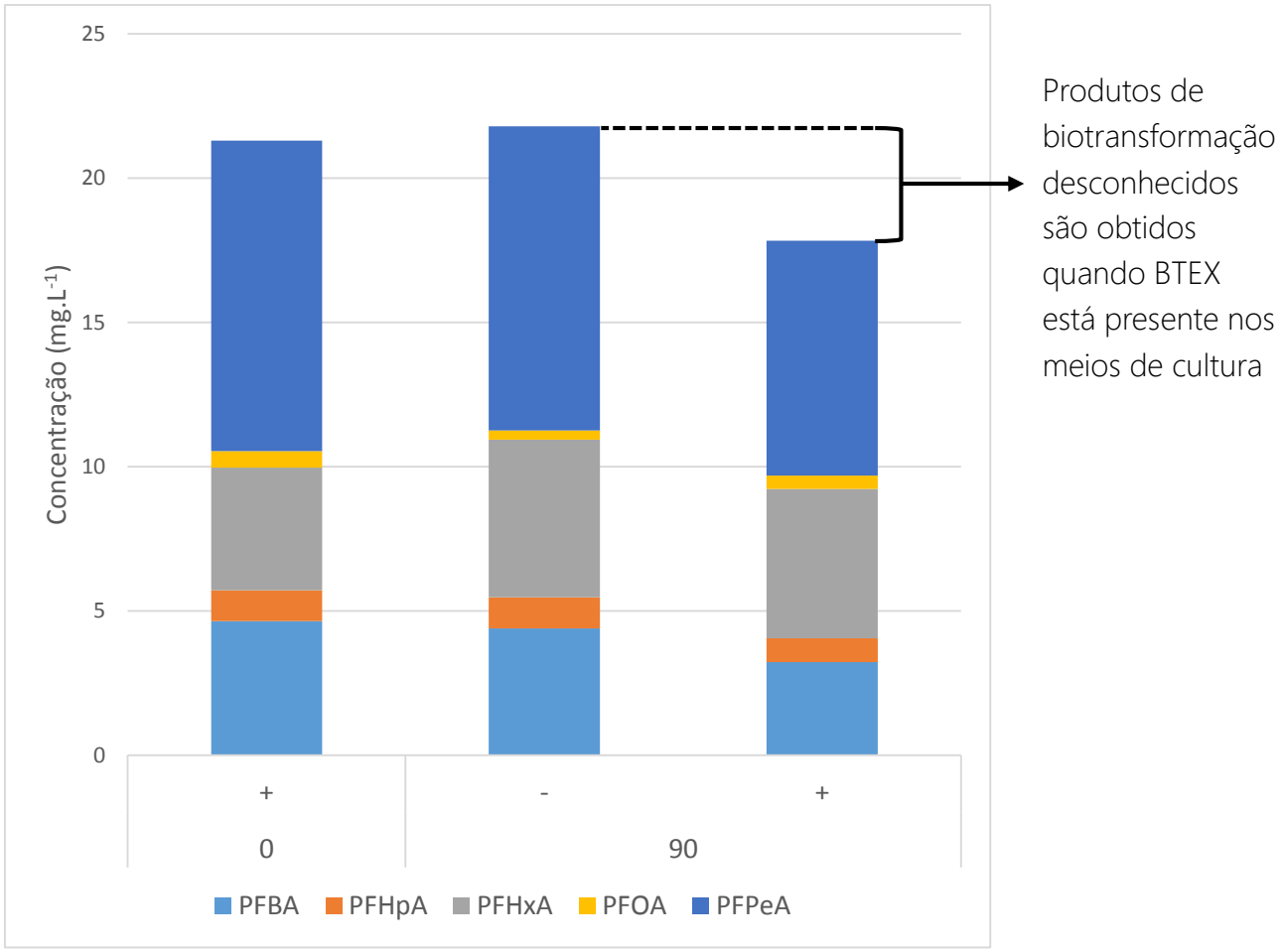


Figura 55 - Concentração de precursores totais por oxidação nos ensaios de biodegradação com solo A (LVA) no tempo inicial (0) e final (90) na presença (+) ou ausência (-) de BTEX. Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado, a adição de BTEX aos ensaios aeróbios de biodegradação de AFFF interferiu no processo de biotransformação dos compostos fluorcarbonados e pode ter alterado o caminho metabólico estabelecido na literatura recente. Entretanto, essa afirmação não implica na contaminação proposital com BTEX como solução para descontaminar áreas afetadas por AFFF, pois isso seria irresponsável do ponto de vista ambiental. Foi apenas apontado que, dependendo das condições do ambiente, a transformação da AFFF em subprodutos pode ser diferente do proposto por modelos anteriores.

O potencial para detectar novos subprodutos perfluorcarbonados é estabelecido pela formulação de AFFF, o tipo de ambiente de biotransformação (incluindo co-contaminantes) e o tempo de exposição a processos de biotransformação ou intemperismo (BACKE et al. 2013). Em um dos poucos estudos

sobre determinação de PFAS, Moe et al. (2012) aponta para o potencial de aeroportos e refinarias de petróleo dentro e fora dos Estados Unidos, como locais de estudo em potencial para descoberta de novos subprodutos.

Com base nos resultados quantitativos obtidos, observou-se que é possível remover os compostos fluortelomerados do ambiente de refinaria de petróleo e treinamento militar. Aos poucos, o conhecimento sobre o destino da AFFF no ambiente começa a ser compreendido. Wang et al. (2011) estudaram a degradação de fluortelômeros e os fluorcarboxilados correspondentes em lodo ativado de usinas de tratamento de esgoto na região de São Francisco, CA, EUA, enquanto Harding et al. (2015) estudam atualmente a co-contaminação de AFFF por TCE.

Contudo, mais pesquisas sobre o destino da AFFF por biotransformação são necessários. Ainda assim, mesmo os tratamentos físico-químicos não foram completamente estudados. Além de compreender o comportamento ambiental desses compostos fluorados, é importante compreender as implicações das estratégias de remediação aplicadas no campo. Por exemplo, bombas de remediação não são capazes de acessar todos florcarbonados com carga positiva associados aos sedimentos. Além disso, a oxidação avançada poderia potencialmente resultar no aumento de produtos finais inertes (tais como os carboxilatos perfluorados), alguns dos quais são compostos perigosos (PLACE; FIELD, 2013). Desenvolvimento de novas abordagens para a remediação fluorcarbonados pode ser importante para dar conta totalmente das diversas classes identificadas nesta pesquisa.

Os resultados dessas pesquisas podem ter decisões importantes sobre o fechamento ou leis de contenção de áreas contaminadas por tais substâncias. A formulação e fabricação das substâncias devem passar por alterações, conforme avanços na pesquisa sejam feitos.

A 3M modificou, voluntariamente, em há mais de uma década a fabricação de suas espumas AFFF, devido a uma alta preocupação sobre os PFOA e PFOS (3M, 1999). Estas formulações AFFF vendidas pela 3M, contendo os compostos químicos fluorados sintetizados por fluoração electroquimica representou 75% do total de AFFF armazenadas em bases militares e corpos de bombeiro. O restante de AFFF armazenadas contém produtos químicos fluorados pelo processo de telomerização, que são estruturalmente distintos daqueles feitos por fluoração electroquimica, um processo de dominada por 3M (PREVEDOUROS et al., 2006) e posteriormente aplicado por Ansul. O Brasil já importava esses produtos antes da data de mudança

na formulação, e ainda atualmente não existem restrições quanto ao uso de itens estocados desde aquela época. Tanto e União Europeia quanto o Canadá já exigiram a remoção e cancelamento do uso de produtos estocados contendo PFOA e PFOS (KISSA, 1994).

Os compostos persistentes PFOA e PFOS foram medidos nos experimentos por LC-MS / MS tanto para ensaios aeróbios quanto anaeróbios. Esses compostos, por sua vez, não tiveram suas concentrações alteradas durante o período monitorado nos experimentos dessa tese. Eles foram, de fato, detectados como parte da formulação da AFFF, conforme esperado. A concentração média de PFOA foi de 28,59±7,19 $mg.L^{-1}$ e a de PFOS foi 343,88±29,02 $mg.L^{-1}$. A manutenção de suas quantidades indica que o tempo de experimento não foi o suficiente para as rotas metabólicas atingirem seu último estágio de degradação. Geralmente, os PFOA e PFOS resultantes de processo de degradação aparecem no ambiente em longo prazo após ao tempo inicial de liberação. As concentrações de todos os compostos encontrados podem ser consultadas no Apêndice A.

Ainda existe a necessidade de identificar várias outras fontes de fluorcarbonados que não são rotineiramente medidos. A elucidação da estrutura de precursores e seus subprodutos desconhecidos tem implicações para predizer a mobilidade destes compostos em sistemas heterogéneos, a sua susceptibilidade à transformação biológica e abiótico, e sua toxicidade. As ferramentas tais como a espectrometria de massa de bombardeamento atómico rápido, espectrometria de massa por *time-of-flight* (QTOF / MS) e espectrometria de massa de alta resolução poderiam ser úteis em pesquisas futuras.

3.3.4. Dados complementares de IC e GC-TCD

Conforme citado anteriormente, o processo de biotransformação foi considerado irrelevante nos ensaios anaeróbios. Dentre as diferentes condições anaeróbias empregadas em séries de experimentos anteriores: metanogênese e redução de nitrato, nenhuma apresentou resultados comparáveis a aerobiose após 90 dias de experimentos. Durante o tempo de monitoramento da série de experimentos apresentada, não foi observado atividade significativa em redução de nitrato conforme a Figura 56.

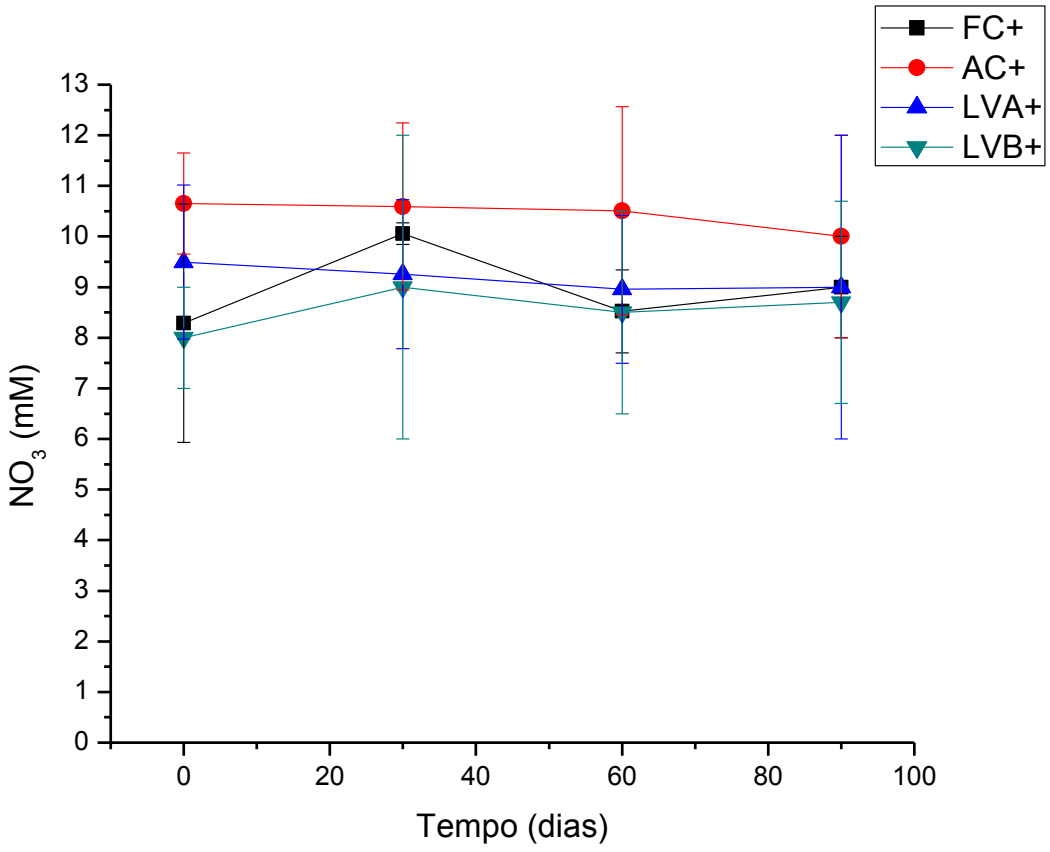


Figura 56 - Concentração constante de NO_3 nos ensaios anaeróbios em condição redutora de nitrato, indicando baixa ou nenhuma atividade metabólica nos frascos contendo BTEX (FC: Controle de AFFF, AC: Controle autoclavado e LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados apresentados da Figura 56 correspondem aos ensaios contendo BTEX. A variação observada não foi considerada significativamente diferente dos ensaios controle. Os experimentos sem BTEX apresentaram o mesmo padrão de inatividade.

Com relação aos ensaios de metanogênese, pouca atividade foi observada pelo uso do GC-TCD, conforme Figura 57.

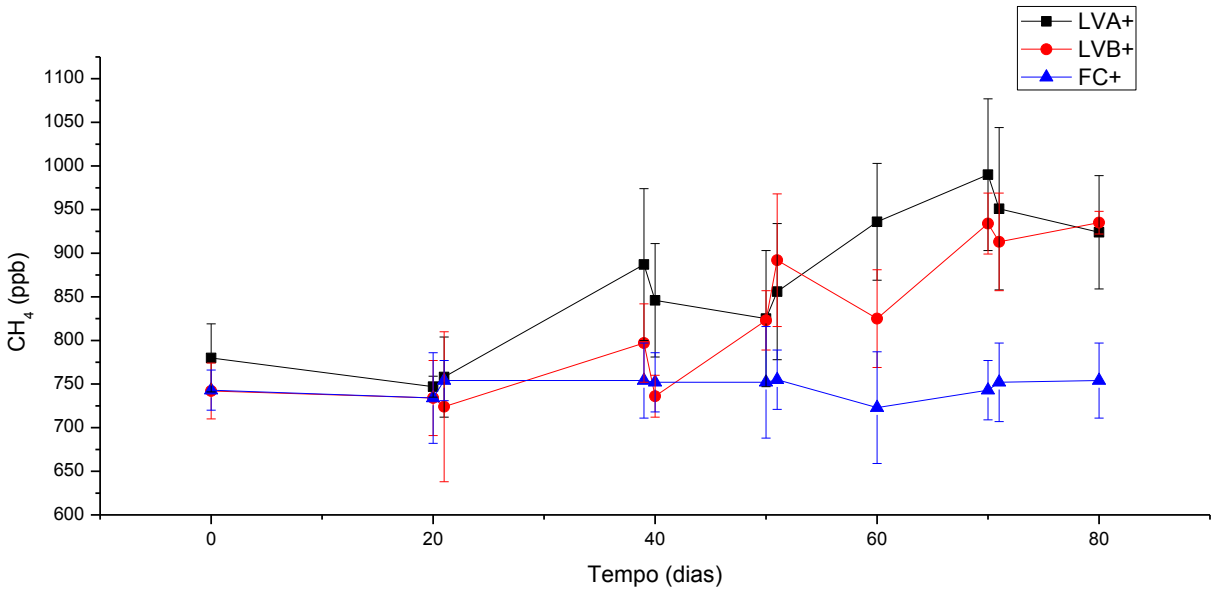


Figura 57 – Concentração de CH_4 nos ensaios anaeróbios em condição metanogênica, indicando baixa ou nenhuma atividade metabólica nos frascos contendo BTEX (FC: Controle de AFFF, LVA: Ensaio de biodegradação com solo A, LVB: Ensaio de biodegradação com solo B). Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 57, embora crescente, a produção de metano detectada é muito inferior ao encontrado em ensaios anaeróbios de biodegradação, geralmente reportados na ordem de $L.kg^{-1}$ (YANG; LI, 2014; SHAH et al., 2015). De fato, a concentração do metano encontrada foi próxima aos valores residuais encontrados na atmosfera (BASTVIKEN, 2009; DLUGOKENCKY; HOUWELING, 2003).

Uma hipótese para a baixa atividade observada nos ensaios anaeróbios é o fato das amostras de solo terem sido conservadas em ambiente com saturação de oxigênio e, por isso, inativou uma boa parte da microbiota estritamente anaeróbia capaz de metabolizar BTEX e AFFF. Outra possibilidade é a inabilidade de crescer a microbiota anaeróbia nas condições específicas do ambiente de laboratório, conforme observado em alguns dos ensaios de Yujie et al. (2013), da mesma equipe de pesquisa da Prof. Dra. Lisa Alvarez-Cohen.

O restante dos dados sobre os ensaios anaeróbios pode ser consultado no Apêndice A e B.

O GC-TCD foi utilizado também para monitorar o consumo de O_2 nos ensaios aeróbios. A concentração de O_2 foi mantida em níveis superiores a ~10% ao longo de

todo o experimento para manutenção da aerobiose (Figura 58) e pH foi monitorado conforme a produção de CO_2 nos frascos aumentava. O mesmo cuidado foi aplicado nos ensaios com solo B.

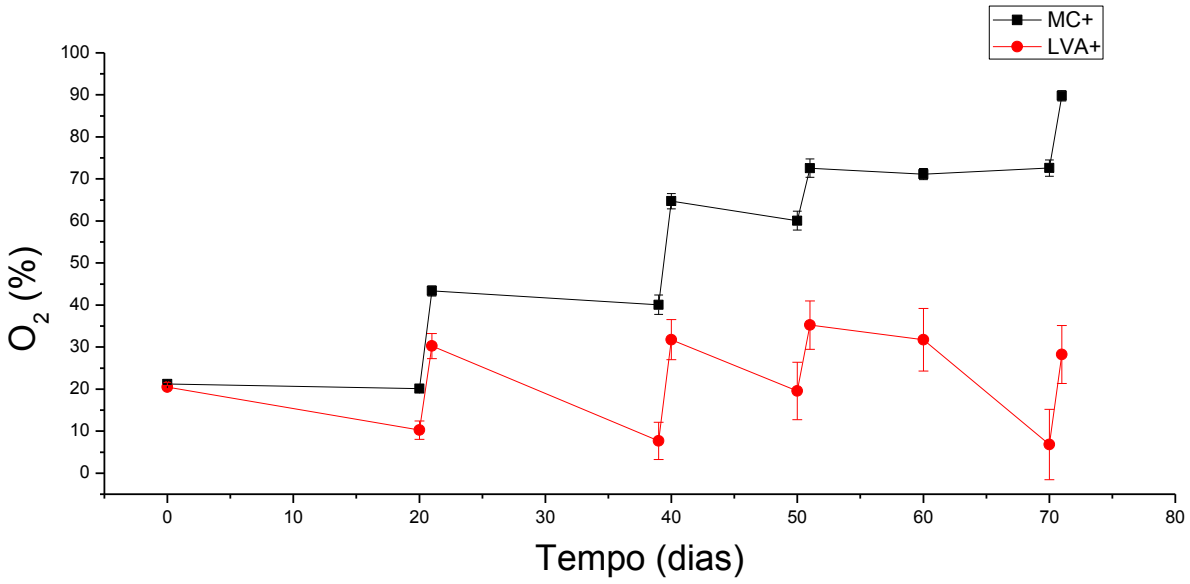


Figura 58 - Concentração de O_2 nos ensaios MC+ (controle do meio) e LV+ (biodegradação) em solo A. Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH dos ensaios manteve-se na faixa de 8,0 nos ensaios controle e 7,0 nos ensaios biológicos ao longo de todo tempo do experimento. O efeito tamponante de $NaHCO_3$ foi o suficiente para manutenção do ambiente estável da cultura de microrganismos. A maioria das bactérias são neutrófilas, logo, o pH ótimo para biodegradação de BTEX a ser conseguido estaria na faixa dos 7,5±1,0 (LESON; WINER, 1991). Isso porque o CO_2 produzido nos ensaios aeróbios tende a diminuir o pH do sistema. Assim, caso o tampão ou os intermediários metabólicos não sejam capazes de manter o pH o metabolismo poderia sofrer a influência de um fator que não era de interesse.

3.3.5. Interação entre AFFF e BTEX

A presença de hidrocarbonetos de petróleo da mistura BTEX causou menor taxa de biotransformação dos compostos fluorcarbonados comparada aos ensaios sem BTEX. A microbiota presente nos frascos metaboliza, preferencialmente, os hidrocarbonetos, ao invés dos componentes da AFFF.

Contudo, foi observado também que a adição de AFFF nos ensaios contendo biodegradação foi responsável por diminuir a velocidade de biodegradação de BTEX. Inicialmente, foi-se discutido o efeito tóxico da AFFF sobre a microbiota, entretanto, as concentrações utilizadas foram previamente testadas, quanto à toxicidade, e os limites definidos estavam abaixo de qualquer interferência no metabolismo microbiano. A toxicidade de AFFF será abordada em mais detalhes no capítulo 3.

O único estudo a mencionar a co-contaminação entre uma área contaminada por AFFF e a biodegradação de BTEX foi feito em 1997 por Levine et al. (1997). A descoberta da contaminação por AFFF em sua área de estudo foi descrita pelos autores como inesperada e completamente incidental. Assim como a base americana de Ellsworth, ali também ocorriam treinamentos de incêndio.

Ainda sobre o estudo de Levine et al. (1997), a presença de AFFF em água subterrânea e solo levantou várias questões importantes sobre os processos de biorremediação do local. Dados sobre a biotransformação desses compostos só apareceriam uma década depois, mas ainda assim foi especulado que a AFFF tinha um papel na mediação ou inibição de reações bioquímicas com BTEX, mas os detalhes não foram elucidados. A ausência de ácidos benzil-succinico e benzil-fumarico, típicos subprodutos de biodegradação de BTEX, não foram encontrados na área de estudo contaminada por AFFF, corroborando a hipótese de influência mútua da AFFF sobre BTEX. Assim como observado nos resultados dessa tese, a co-contaminação de AFFF e BTEX alterou os processos biogeoquímicos de biodegradação e biotransformação.

Um outro ponto importante para se ressaltar é que, conforme discutido, a formulação de AFFF utilizada (Ansul) também contém o surfactante butil carbitol. Para verificar se existe competição entre diferentes fontes de carbono (butil carbitol e BTEX) foram feitos ensaios contendo apenas Lodyne. Lodyne é a molécula fluorcarbonada principal encontrada em AFFF. Com isso, foi possível comparar o processo de biodegradação BTEX sem a interferência de outra fonte de carbono (Figura 59). Esses ensaios foram monitorados por 20 dias.

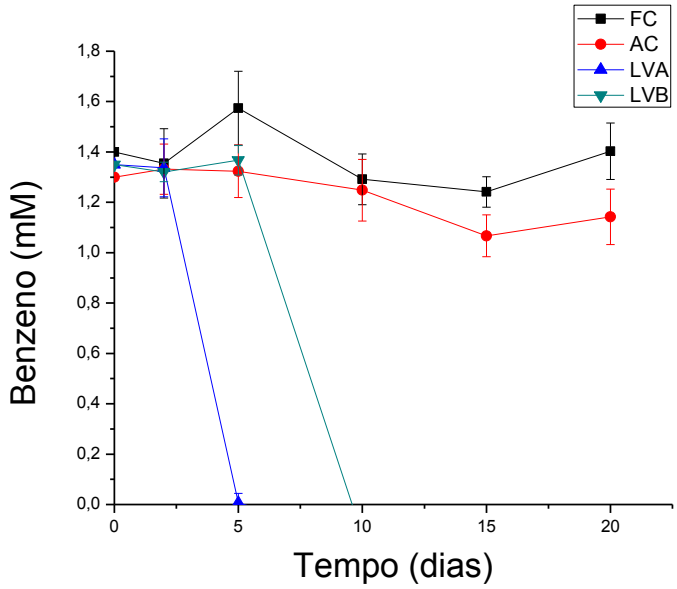


Figura 59 - Concentração de benzeno em ensaios contendo Lodyne sem butil carbitol em controle autoclavado (AC), controle de AFFF (FC) e ensaio de biodegradação em solo A (LVA) e B (LVB). Fonte: Elaborado pelo autor.

Era esperado que as propriedades surfactantes do butil carbitol acelerassem o consumo de BTEX, contudo isso não ocorreu. Foi observado que a degradação do benzeno, assim como do tolueno, etil-benzeno e o-xileno foi mais rápida na ausência de butil carbitol. Ou seja, quando a única fonte de carbono não fluorcarbonada foi o BTEX, a biodegradação foi mais rápida. Na ausência de butil carbitol, o benzeno foi consumido em 50% menos tempo. Assim, conclui-se que o butil carbitol compete como fonte de carbono, aproveitado pela microbiota, quando presente em co-contaminação com BTEX e, por isso, interfere no processo de biodegradação desses hidrocarbonetos. Isso explica a biodegradação mais lenta de BTEX na presença de AFFF. Sendo assim, não foram os compostos flúor-carbonados que influenciaram o processo de biodegradação de BTEX, mas sim, o surfactante butil carbitol também presente na formulação da AFFF Ansul.

4. Capítulo 2

Respirometria de Solo com AFFF e Gasolina

4.1. Introdução

As abordagens e técnicas para compreender a biodegradação de compostos de AFFF e hidrocarbonetos de petróleo no ambiente podem ser diversas. A partir de diferentes metodologias, o conhecimento sobre substâncias e processos envolvidos na biorremediação de espumas de incêndio passam a se complementar e fornecer pontos de vista sobre como é o comportamento ambiental das substâncias analisadas.

No capítulo 1 foi dada ênfase à biotransformação dos compostos contendo flúor em sua estrutura química. Grande parte dos esforços experimentais realizados na Universidade da Califórnia foram destinadas a demonstrar e promover a transformação de substâncias persistentes. Entretanto, a formulação da AFFF contém outras substâncias, como o dietileno glicol butil éter, também conhecido e disponível comercialmente pelo nome de butil carbiol (Figura 60). O butil carbitol serve como substrato e fonte de carbono para comunidades microbianas. Neste segundo capítulo foi investigada a influência da AFFF na biodegradação de gasolina, considerando que grande parte dos processos foram afetados pela presença de butil carbitol. Esse composto, que age como co-solvente e agente anti-congelamento das espumas de incêndio, compõe de 12% a 15% da formulação total de AFFF.

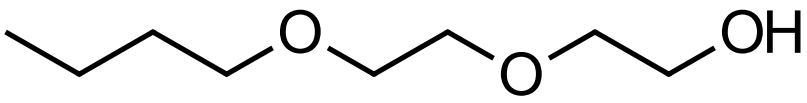


Figura 60 – Estrutura química do dietileno glicol butil éter (butil carbitol). Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como os PFCs, os éteres e acetatos de etileno glicol entram no ambiente, principalmente, em emissões de fabricantes, e após isso na liberação durante a sua utilização em produtos comerciais. As AFFF são grande parte da liberação desses compostos e, portanto, se justifica uma análise do seu destino final, biodegradação, e potencial de exposição. Foi estimada por Staples (1998) a distribuição potencial de alguns éteres de etileno glicol no ambiente, conforme modelagem de dispersão de poluentes proposta por Mackay; Paterson, 1991. Essa modelagem foi utilizada para estimar a distribuição relativa de alguns éteres de etileno glicol em diferentes compartimentos ambientais. Esta abordagem utiliza propriedades físicas fundamentais para sugerir como um produto químico pode tornar-se distribuída entre os meios e com isso um potencial contaminante ambiental.

Tabela 8 – Distribuição no ambiente de butil carbitol

Meio	**Volume (m^3)**	**Densidade média ($kg.m^{-3}$)**	**Concentração de butil carbitol (%)**
Ar	$6{,}0.10^9$	1,19	<0,1
Solo	$4{,}5.10^4$	2400	2
Água	$7{,}0.10^6$	1000	96
Sedimento	35	2400	2
Sólidos suspensos	$2{,}1.10^4$	1500	<0,1

(Adaptado de Staples, 1998)

Esta abordagem não leva em consideração a possível degradação de compostos, apenas a tendência do composto em se distribuir entre os compartimentos ambientais. Ao contrário dos PFCs, o butil carbitol não apresenta flúor em sua estrutura e, logo, não é uma porção inerte. Desse modo, é seguro assumir que mudanças nos fatores ambientais podem afetar o processo de degradação. Assim como o efeito de BTEX pode alterar a biotransformação de PFCs, o co-metabolismo

de outros hidrocarbonetos de petróleo, como a gasolina, pode modificar a distribuição ambiental e biodegradação de AFFF no ambiente.

O contrário também pode ser verdadeiro e, assim, a AFFF pode afetar a degradação da gasolina. A gasolina é um dos líquidos orgânicos mais amplamente utilizados na nossa sociedade, resultando em uma exposição grande da maioria de seres humanos, seja em casos de liberação no ambiente acidentais ou crônicos. No caso de incêndios da indústria petroquímica, existem grandes chances da gasolina estar presente como co-contaminante das áreas afetadas. Propriedades da gasolina podem afetar a infiltração, distribuição, retenção e biodegradação de compostos finais do AFFF, assim como os componentes do AFFF poderiam influenciar a biodegradação da gasolina.

4.1.1. Motivação

Esta parte do estudo procurou aumentar a escala de análise sobre biorremediação de AFFF em hidrocarbonetos de petróleo. Foi abandonada a análise química em nível molecular e adotada a respirometria para quantificar o metabolismo microbiano total do solo quanto a produção de CO_2. Um maior enfoque foi dado para a discussão sobre o butil carbitol, sendo ele a principal fonte de carbono que impulsiona o metabolismo aeróbio dos microrganismos de solo. Com isso seria possível demonstrar a biodegradação do butil carbitol em um ambiente de maior volume em que os dois compostos estejam misturados em uma matriz de solo e inferir sobre qualquer interferência mútua recorrente da co-contaminação.

Admitiu-se a possibilidade de que a biodegradação de gasolina seria melhorada pela contaminação por AFFF, devido a presença de PFCs que agem como surfactantes, aumentando a biodisponibilidade do óleo aos microrganismos com potencial de biodegradação.

4.2. Metodologia

Neste estudo foi utilizada a metodologia de respirometria descrita por Bartha; Pramer (1965), com concentrações adaptadas ao solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo e AFFF. Utilizando-se essa metodologia foi possível determinar as concentrações de CO_2 da atmosfera criada no interior do respirômetro, como evidência indireta de biodegradação.

4.2.1. Preparo dos reagentes

Água desionizada obtida a partir de purificador de água por osmose reversa Biotech foi fervida durante 30 minutos, para a redução da solubilidade dos gases no líquido que possam interferir nos dados coletados. Após este período, esperou-se o resfriamento para utilização da água na coleta de dados dos respirômetros. Para obtenção de uma solução 0,2 M de KOH (Synth PA) dissolveram-se 11,2 g de KOH em 1000 mL de água isenta de CO_2. Guardou-se a solução em recipiente plástico. Padronizou-se, utilizando 100 mL de solução 0,200 N de ftalato ácido de potássio ($KHC_8H_4O_4$), com duas gotas de indicador vermelho de metila e calculou-se a normalidade real do KOH. Para obtenção de uma solução 0,1 M de HCl (Vetec PA) transferiu-se 8,5 mL de HCl concentrado para um balão volumétrico de 1000,0 mL e completou-se o volume com água desionizada. Padronizou-se utilizando 100,0 mL de solução de carbonato de sódio 0,1 M, usando-se 2 gotas de alaranjado de metila como indicador, e calculando-se a normalidade real do HCl (Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

No preparo da solução 0,1 M de $BaCl_2$ (Synth PA) dissolveram-se 6,1 g de cloreto de bário e completou-se o volume para 500 mL com água desionizada isenta de CO_2 e guardou-se em recipiente de plástico. Para a solução indicadora de fenolftaleína, dissolveram-se 0,2 g de fenolftaleína em 60 mL de etanol e completou-se com água desionizada para 100,0 mL, sob agitação constante. A solução foi filtrada em algodão, quando houve formação de precipitado conforme Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

4.2.2. Coleta do solo

Foram adicionados aos frascos respirométricos solo obtido no Jardim Experimental – IB / UNESP, campus Rio Claro (Figura 61), localizado em 22°23'47.4"S 47°32'40.0"W. O solo foi utilizado para elaborar diferentes amostras contendo AFFF em diferentes condições de tratamento. Os procedimentos seguiram uma adaptação da Norma técnica L6.350 da CETESB.

Figura 61 – Imagem de satélite do Jardim Experimental (dentro da área do retângulo amarelo) – IB / UNESP, campus Rio Claro. Fonte: Google Inc. (2014); Anotações elaboradas pelo autor.

O canteiro utilizado para os ensaios apresenta histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. O solo dessa área tem sido utilizado exclusivamente para experimentos com gasolina, diesel, querosene e petróleo, ao longo dos últimos 8 anos.

4.2.3. Montagem dos ensaios

O experimento foi conduzido em frascos de Bartha, esquematizado na Figura 62. O respirômetro de Bartha; Pramer (1965) consiste em um sistema fechado, apresentando duas câmaras conectadas, onde ocorre a biodegradação do efluente

em análise (Figura 62, indicada por G) e outra que possui a solução alcalina capaz de identificar o CO_2 produzido pela respiração microbiana (Figura 62, indicada por D).

A respirometria aplicada à biorremediação oferece uma série de vantagens por obter dados de produção de CO_2 difíceis de serem conseguidos por outras maneiras (BARTHA; PRAMER, 1965; GRAVES et al., 1991, LOPES; BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009; MONTAGNOLLI et al., 2014). Utilizando-se essa metodologia é possível determinar informações a respeito das concentrações de CO_2 da atmosfera criada no interior do respirômetro. Com isso realiza-se a quantificação dos parâmetros sobre a biodegradação em um período de tempo, envolvendo diferentes fases de adaptação, degradação ativa e encerramento da biodegradação (WU et al., 2004). Essa informação pode então ser imediatamente relacionada à taxa de biodegradação e até mesmo a evolução da biomassa presente ao longo do tempo (FIÚZA et al., 2004).

Com os testes de respirometria, foi possível monitorar as taxas de evolução de CO_2. O CO_2 evoluído durante o processo de respiração pode ser capturado em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) localizada no braço lateral ligado ao frasco respirométrico.

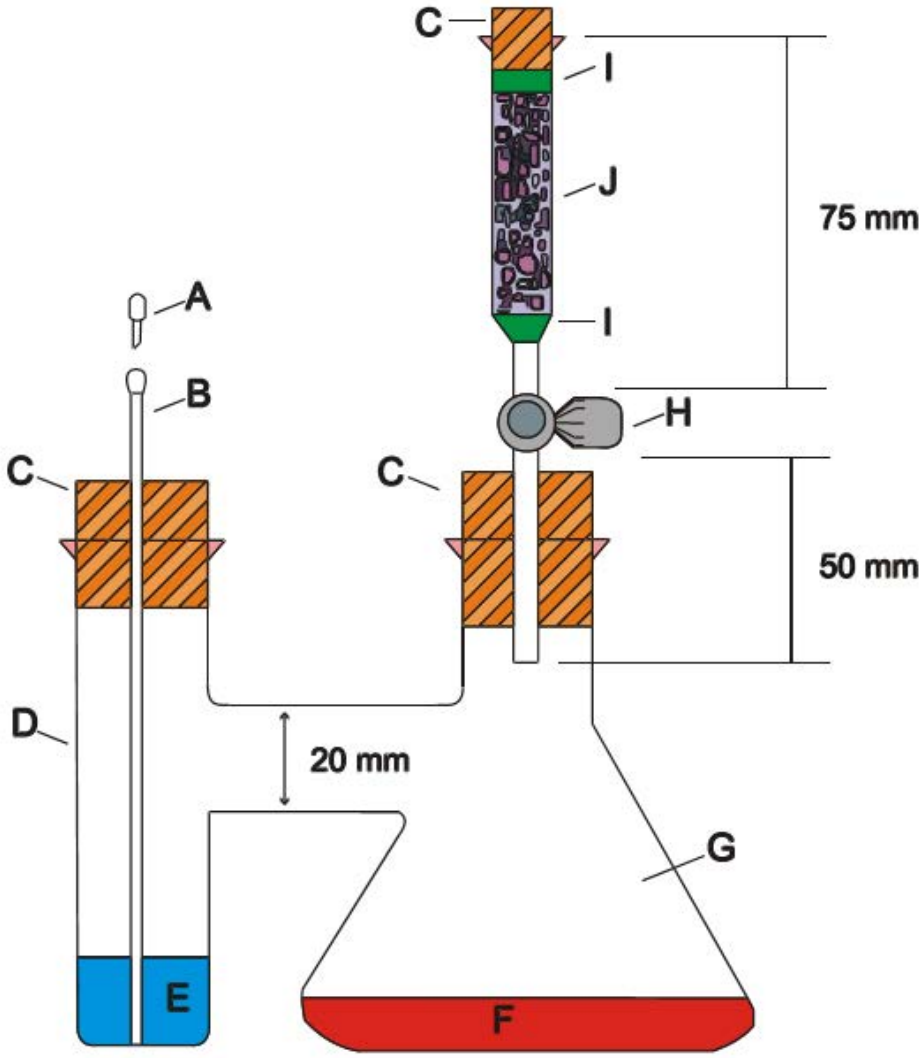


Figura 62 - Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990). A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm). Fonte: Elaborada pelo autor, publicada em Montagnolli et al. (2009).

As substâncias analisadas foram gasolina (Premium Petrobrás - sem álcool) e AFFF 6% (Sintex). O AFFF é disponível comercialmente em galões de 20 L nas concentrações de 1%, 3% e 6% (Figura 63). A formulação distribuída por Sintex é a mesma da marca Ansul analisada no Capítulo 1. A empresa responsável pela venda da AFFF marca Sintex no Brasil é a mesma que importa, envasa e distribui o AFFF da marca Ansul.

Figura 63 – Galão de AFFF contendo a solução utilizadas nos experimentos de respirometria. Fonte: Elaborado pelo autor.

O rótulo descreve o produto como “classificado como não perigoso, atóxico e biodegradável, conforme Norma NBR 15511”. O rótulo também confirma a composição similar ao AFFF Ansul, contendo compostos perfluorados, butil carbitol e água.

Gasolina foi escolhida como substância de análise devido à alta presença de BTEX em sua composição, que varia entre 18 a 20% v/v (MARTINES et al., 1996). A Figura 64 mostra a quantidade de BTEX na gasolina, além da proporção de cada componente individual da mistura de BTEX. A escolha da gasolina como substrato de hidrocarbonetos foi para manter a consistência entre os experimentos anteriormente realizados na Universidade da Califórnia em Berkeley e por ser um produto contaminante comum em refinarias e postos de combustível. A gasolina teve sua porção de álcool removida para aplicação nos ensaios.

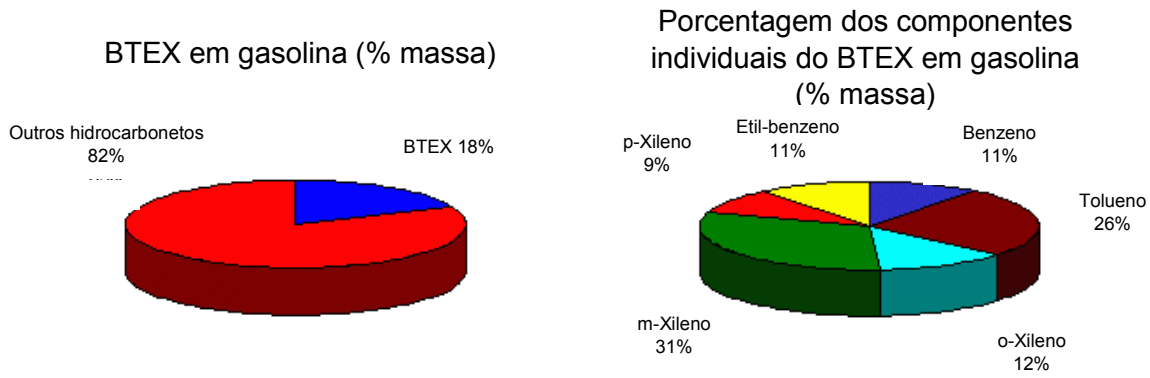


Figura 64 – Proporção de BTEX em gasolina e componentes individuais de BTEX. Fonte: Traduzido de Martines et al. (1996).

As concentrações a serem utilizadas foram extensivamente testadas ao longo de 2 meses em experimentos piloto (junho – julho/2014), para determinar a quantidade a ser utilizada nos ensaios de biodegradação. As concentrações de gasolina e AFFF deveriam corresponder a quatro critérios: (i) semelhança aos dados reais de contaminação ambiental (MARTINES et al., 1996); (ii) baixa toxicidade; (iii) resposta da comunidade microbiana com diferença, estatisticamente, significativa entre os ensaios; e (iv) dentro da janela de medição da técnica adotada, entre 100 a 1500 µmol de CO_2. Após determinadas as condições ideais para estudo, os frascos foram montados conforme a Tabela 9.

Tabela 9 – Ensaios de respirometria realizados

Ensaio	**Solo**	**Gasolina**	**AFFF**
Controle (C)	50,0 g	---	---
Controle AFFF (F)	50,0 g	---	100,0 mL
Controle gasolina (G)	50,0 g	0,5 mL	---
Biodegradação (B)	50,0 g	0,5 mL	100,0 mL

(Elaborado pelo autor)

4.2.4. Método tradicional por titulação

A quantidade de dióxido de carbono (CO_2) absorvida foi então analisada por titulação do KOH residual com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl), após a adição do cloreto de bário ($BaCl_2$) para precipitar os íons carbonato. Os níveis de dióxido de carbono evoluído podem ser calculados e representados em função do tempo de incubação (BALBA et al., 1998). O processo pode ser esquematizado pelas Equações 5 a 9:

Biodegradação da matéria orgânica (MO):

$$MO + O_2 \rightarrow H_2O + CO_2 \quad (5)$$

Absorção do CO_2 gerado:

$$2\ KOH + CO_2 \rightarrow K_2CO_3 + H_2O + KOH\ (excesso) \quad (6)$$

Cloreto de bário reage com o carbonato de potássio:

$$K_2CO_3 + BaCl_2 \rightarrow BaCO_3 + 2\ KCl \quad (7)$$

Titulação do excesso de KOH com HCl:

$$KOH\ (excesso) + HCl \rightarrow KCl + H_2O \quad (8)$$

Substâncias resultantes:

$$KCl + BaCO_3 + HCl\ (gota\ excesso) \quad (9)$$

Cada respirômetro contém um braço lateral, ao qual foi adicionado 10,0 mL de solução de KOH 0,2 M, para capturar o CO_2 liberado durante a biodegradação. Todos os respirômetros foram hermeticamente fechados e incubados em duplicata a 28,0±0,1ºC. O estudo foi constituído por 4 sistemas em triplicata, totalizando 12 respirômetros de Bartha. Todos os respirômetros continham solo.

Para cada respirômetro, a biodegradação foi estabelecida pela determinação da quantidade de CO_2 produzido semanalmente e foi feita, primeiramente, preparando-se, para cada frasco de Bartha, um erlenmeyer de 100,0 mL com duas

gotas de fenolftaleína e 1,0 mL da solução de cloreto de bário ($BaCl_2$ 0,1 M). Retirou-se a rolha de borracha abrindo-se a válvula do filtro de cal sodada (Vetec PA), para remoção de CO_2 do ar. Removeu-se a vedação da cânula do braço lateral do respirômetro e, com uma seringa de 10,0 mL, transferiu-se à solução de KOH 0,2 M do braço lateral para o erlenmeyer. Preencheu-se a seringa com 10,0 mL de água desionizada e injetou-se no braço lateral do respirômetro para a lavagem e com esta mesma seringa a água de lavagem foi transferida para o erlenmeyer. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes, completando-se até 30,0 mL. O conteúdo retirado do braço lateral do frasco de Bartha (Figura 62, indicado por E) foi titulado imediatamente com o conteúdo do erlenmeyer e HCl 0,1 M. Com a cânula do braço lateral aberta injetou-se ar comprimido com uma bomba de ar. O ar passou através do filtro de cal sodada, cuja função foi reter o CO_2 do ar introduzido, de forma a garantir a reoxigeração do sistema, sem permitir a entrada de CO_2. Por fim, adicionou-se 10,0 mL de uma solução de KOH 0,2 M no braço lateral e recolocou-se a vedação da cânula, fechando-se a válvula e recolocando-se a rolha de borracha no filtro de cal sodada. Após esses procedimentos, cada respirômetro foi colocado na estufa de incubação, até a próxima determinação do CO_2.

Como base de cálculo para a próxima determinação do CO_2 incorporado, foi preparada uma nova prova em branco contendo 10,0 mL de solução KOH 0,2 M, adicionado com seringa de 10,0 mL, e 2 gotas de fenolftaleína, 1,0 mL de solução de $BaCl_2$ 0,1 M e 30,0 mL de água desionizada. A solução foi titulada com HCl 0,1 M, anotando-se a quantidade de ácido necessária para a viragem da fenolftaleína. O cálculo do CO_2 gerado foi feito de acordo com o volume gasto de HCl na titulação do KOH na Equação 10 abaixo:

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * \theta_{HCl} * 0{,}044 \qquad (10)$$

onde:

GCO_2 é a geração de gás carbônico;

A é o volume de HCl 0,1 M gasto, em mL, na titulação do branco;

B é o volume de HCl 0,1 M gasto, em mL, na titulação da amostra;

50 é o fator para transformar equivalente em µmol de CO_2;

$\theta_{(HCl)}$ é o fator do HCl 0,1 M;

0,044 é o fator para transformar µmol em mg de CO_2.

4.2.5. Novo método por condutividade

O acompanhamento da biodegradação das substâncias dentro dos respirômetros de Bartha realizadas neste estudo, foram feitas por uma nova técnica estabelecida por Uemura et al. (2013) no Laboratório de Microbiologia da Profa. Dejanira de Franceschi Angelis da UNESP – Campus Rio Claro. Com essa nova técnica, foi possível medir a saturação de CO_2 na solução 0,2 M de KOH pelas medidas de condutividade. Assim, garantiu-se eficiência e menor risco de interferência dos resultados por variações nos protocolos experimentais.

De uma maneira prudente, contudo, decidiu-se também acompanhar os experimentos via titulação, durante os primeiros 40 dias. A análise por condutividade não exclui a possibilidade de titulação posteriormente, após a leitura pelo sensor de condutividade. Por ter sido verificado que os métodos apresentam resultados equivalentes, apenas os dados obtidos pela condutividade serão utilizados na discussão dos resultados em 4.3. Os dados da titulação, entretanto, podem ser consultados no Apêndice C dessa tese.

Igualmente aos procedimentos para titulação, retirou-se o KOH do braço lateral, porém, ai invés de titulá-los, foi inserido um sensor de condutividade previamente calibrado e seco. Com base na reta padrão da Figura 65, foi possível transformar os valores de condutividade em mS para µmol de CO_2.

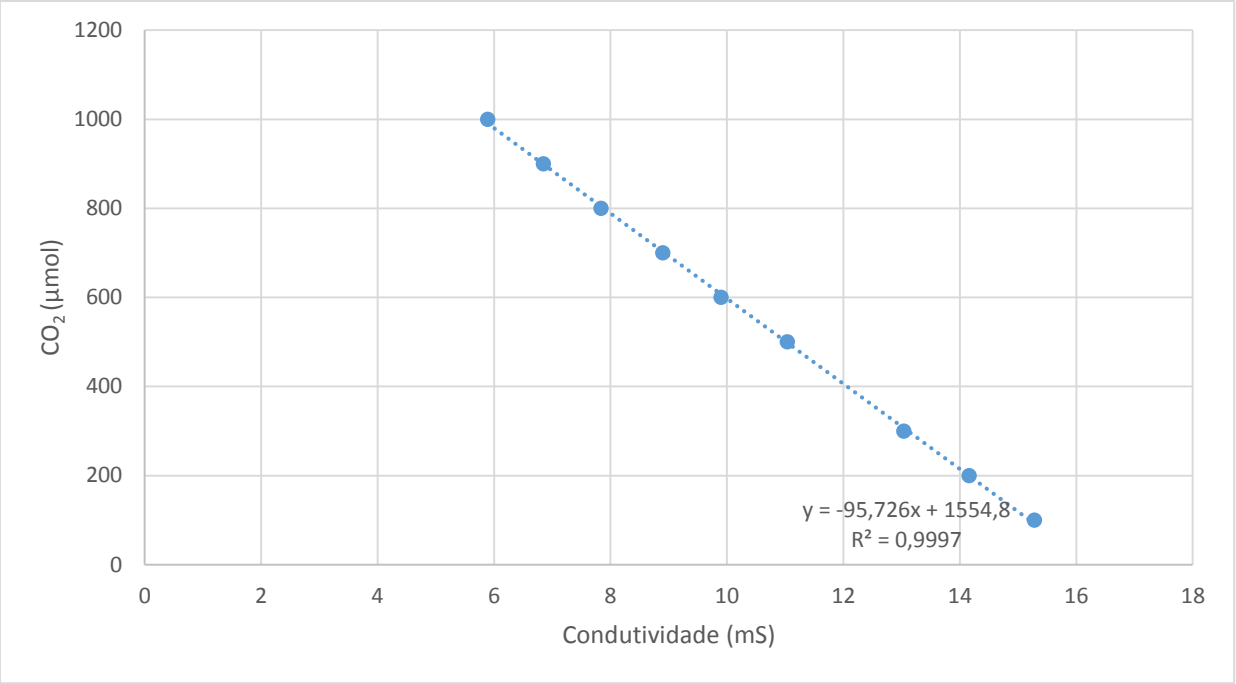


Figura 65 – Curva de calibração de CO_2 em função da condutividade em solução 0,2 M de KOH. Fonte: Adaptada de Uemura et al. (2013).

O princípio da técnica funciona a partir da reação no braço lateral do respirometro descrita na Equação 11.

$$2KOH + H_2CO_3 \rightarrow K_2CO_3 + 2H_2O \quad (11)$$

Nota-se que, de acordo com a estequiometria da reação, 0,2 M de KOH geram 0,1 M de K_2CO_3. Logo, na medida em que o sistema se enche de CO_2 proveniente do metabolismo microbiano, aumenta a quantidade de sal na solução, diminuindo assim a condutividade da solução de KOH. Foi com base nisso que se estabeleceu o princípio de correlação direta e linear entre as duas grandezas. Deste modo, quando condutividade é máxima (cerca de 15,7 mS) a concentração de CO_2 é mínima, assim como quando a condutividade é mínima (cerca de 6,0 mS) a concentração de CO_2 é máxima.

A obtenção dos pontos da curva de calibração foi obtida variando de misturas de proporção conhecida de KOH e K_2CO_3 e medindo-se a condutividade. Conhecendo-se a concentração e pureza das soluções utilizadas, bastaram cálculos estequiométricos da reação para determinar a molaridade do CO_2.

4.2.6. Modelagem matemática

Os dados de produção de CO_2 foram usados no ajuste de modelos matemáticos que descrevem o processo de biodegradação. A modelagem dos dados permite um melhor conhecimento da cinética de biodegradação, permitindo assim prever e otimizar o processo (KERNANSHANI et al., 2006). O uso de ferramentas matemáticas e estatísticas é uma maneira eficaz de descrever os parâmetros envolvidos na remoção de poluentes durante a biodegradação (PALA et al., 2006). A proposição de diferentes modelos de biodegradação para cada tipo de substância biodegradada permitiu determinar de que maneira os perfis de biodegradação variam para cada substância ao longo do processo de biodegradação.

Os dados foram analisados por ferramentas estatísticas no SYSTAT SIGMASTAT 10. A geração de gráficos foi feita pelos softwares MICROCAL ORIGIN 6.0 e SYSTAT SIGMAPLOT 10. Para a modelagem dos dados e ajuste em equações foi utilizada a plataforma WOLFRAM MATHEMATICA 6 e o SYSTAT SIGMAPLOT 10.

Sobre os modelos utilizados, devem ser feitas duas considerações. Foi utilizado para cada tipo de respirometria (acumulada e semanal) um modelo diferente, já que a forma das curvas geradas nos dois casos difere bastante (i), e, além disso, uma série de modelos foi testada para cada caso, mas o critério para seleção do melhor modelo foi baseado na maior média de R^2 obtido entre os ajustes feitos (ii). A maioria dos modelos testados para ajuste foram aqueles que correspondem à cinética de crescimento de culturas microbianas.

O primeiro modelo proposto de melhor ajuste foi uma adaptação da equação logística de Schmidt et al. (1985), que foi usado inicialmente pelo autor para descrever o crescimento de microrganismos em meios de cultura. A Equação 12 foi adaptada por Montagnolli et al. (2009) para fornecer a previsão da máxima produção de CO_2 pelos microrganismos no processo de biodegradação.

$$B = Bmax/(1 + \left[\frac{Bmax - Bo}{Bo}\right] e^{-rt}) \quad (12)$$

onde:

B é o CO_2 Produzido;

Bmax é a Produção máxima de CO_2;

Bo é a Produção inicial de CO_2;
r é a Taxa máxima de produção especifica para determinado óleo;
t é o Tempo.

Outro modelo foi ajustado para as curvas de respirometria semanal. Tais gráficos compreendem curvas mais complexas e exigiram, portanto, um modelo com maior quantidade de parâmetros. Foi utilizado o modelo proposto por Membré et al. (1996) para crescimento e morte de comunidades microbianas, adaptado por Montagnolli et al. (2009) conforme a Equação 13:

$$B = \left[\left(\left(\frac{1}{K1}\right)e^{-m1r}\right) + \left(\left(\frac{1}{K2}\right)e^{m2t}\right)\right]^{-1} \quad (13)$$

onde:
B é o CO_2 Produzido;
K1 é a Constante de Aumento de Produção;
K2 é a Constante de Diminuição de Produção;
m1 é a Taxa de Aumento na Produção de CO_2;
m2 é a Taxa de Diminuição na Produção de CO_2;
t é o Tempo.

Ambos os modelos foram criados para descrever o crescimento microbiano. Assumindo que exista uma correlação entre a dinâmica populacional de microrganismos e a produção de CO_2 semanal, esses modelos foram utilizados no conjunto de dados obtidos na respirometria.

4.3. Resultados e Discussões

A produção de CO_2 foi calculada a partir do metabolismo microbiano e representada em função do tempo de biodegradação, utilizando gasolina e AFFF como substrato para os sistemas realizados. Na Figura 66 está a produção semanal de CO_2 em cada um dos tratamentos realizados.

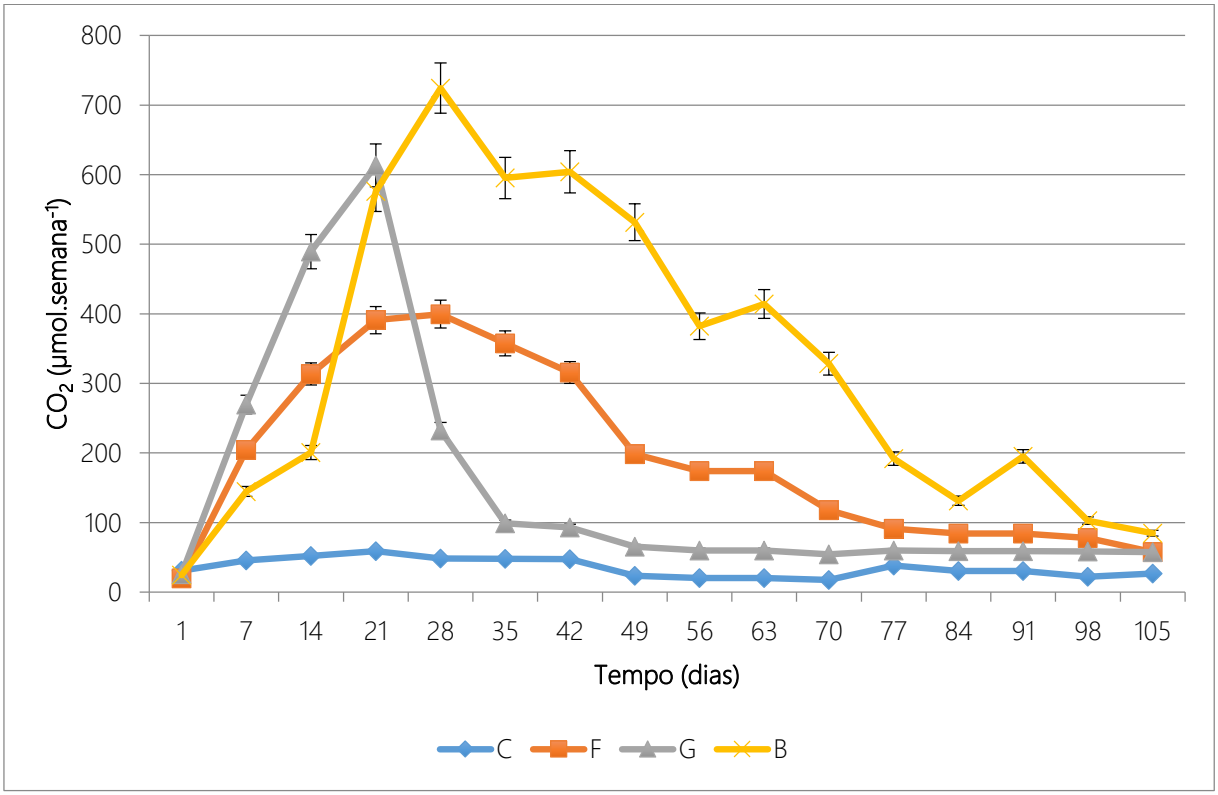


Figura 66 - Produção de CO_2 semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina). Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir desses dados é possível observar quais dos tratamentos contendo AFFF, gasolina e inóculo bacteriano apresentaram maior taxa de biodegradação, e quanto de CO_2 foi liberado dos sistemas durante e ao término do monitoramento da biodegradação.

Na Tabela 10, estão expressos os valores acumulados totais de CO_2 produzido em cada sistema, ou seja, a somatória do total de gás carbônico gerado em cada um dos sistemas em duplicatas ao longo do tempo, após 105 dias de monitoramento.

Tabela 10 - Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos, após 105 dias

Sistema	**CO_2 acumulado (µmol)**
C (controle)	558,7
F (AFFF)	3059,7
G (gasolina)	2354,5
B (gasolina+AFFF)	5930,6

(Elaborado pelo autor)

Foram observadas diferentes curvas de produção semanal de CO_2 (Figura 66). Como esperado, o ensaio C foi o que apresentou a menor produção de semanal de CO_2 (média de 39,4 ±2,7 µmol de CO_2.semana^{-1}). Tal fato deve-se à baixa quantidade de matéria orgânica presente no solo controle, revelando apenas uma respiração basal da microbiota indígena deste substrato.

Os sistemas com AFFF (F) e gasolina (G) foram também utilizados como ensaios controle para observar a influência individual desses componentes no processo de biodegradação

Todos os ensaios apresentaram e perfis de biodegradação semanal distintos. As médias de produção ficaram em 147,47±3,1 µmol de CO_2.semana^{-1} nos frascos contendo apenas AFFF e 326,91±15,3 µmol de CO_2.semana^{-1} nos frascos contendo AFFF e gasolina. O impacto da adição das soluções de AFFF no solo foi observável, visto que os resultados afetaram os ensaios F e B, de modo bastante diferente dos ensaios C. A análise de ANOVA do conjunto dos dados considerou a diferença entre os grupos de tratamento, significativa ao nível de significância $p<0,05$.

O pico de produção de 613,56±3,2 µmol de CO_2 encontrado nas primeiras semanas em G evidencia que a microbiota de solo foi capaz de rapidamente degradar o hidrocarboneto logo nos primeiros dias. Contudo, logo após o pico de produção, há uma queda a valores próximos ao controle. A queda na taxa de produção de CO_2 acontece muito antes dos outros ensaios. Em trabalhos anteriores, Montagnolli (2011) indicou que a rápida queda de produção de CO_2 em comparação a outros substratos em gasolina pode ocorrer devido ao efeito tóxico dos subprodutos de degradação da gasolina, além da volatilização dos compostos a serem utilizados como substrato, e não apenas em decorrência do consumo total de matéria orgânica presente nos

ensaios. Durante a biodegradação, são formados intermediários potencialmente tóxicos como o álcool terc-butílico (TBA), formato terc-butílico (TBF) e o éter metil terc-butílico (MARTIENSSEN et al., 2006; SCHMIDT et al., 2002; DEEB et al.; 2002). Os resultados para biodegradação de gasolina comprovam o que já foi encontrado em trabalhos anteriores, realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente na UNESP-Rio Claro por MONTAGNOLLI et al. (2009), LOPES (2014) e MONTAGNOLLI et al. (2014).

As cadeias de C_7 até C_{11} estão presentes na gasolina, na qual há uma alta concentração de alcenos comparada a outros derivados do petróleo. Em geral alcenos são facilmente biodegradados (SOLANO-SERENA et al., 1999), já que estes compostos, como propileno e eteno, ativam enzimas especificas (monooxigenases) que são carboxiladas e passam para o metabolismo do microrganismo (ENSIGN, 2001). Também já foi descrito que pequenas moléculas de lineares de hidrocarbonetos são mais facilmente biodegradadas do que os compostos BTEX, também presentes na gasolina (SASAKI et al., 1998).

No caso dos ensaios F, foram encontrados menores valores médios de produção (191,23 ±7,0 µmol de CO_2). Os níveis de biodegradação se mantiveram baixos e constantes, a partir da terceira semana até a oitava. Embora a porção de fluorcarbonados seja inerte e não tenha biodegradado, porções não fluoradas da substância introduzida na microbiota, como o butil carbitol, foram prontamente consumidas pelos microrganismos do solo testado. O butil carbitol compõe cerca de 12% a 15% da formulação da AFFF. De acordo com os testes com LC-MS / MS descritos no Capítulo 1, não existe a possibilidade do consumo de apenas Lodyne (e a biotransformação dos PFCs) ter produzido os níveis de CO_2 registrados por respirometria, sendo estes então atribuídos em grande parte ao butil carbitol.

A biodegradabilidade de butil carbitol ja é conhecida pela literatura, contudo não em cenários de co-contaminação com gasolina ou outros hidrocarbonetos derivados do petróleo. Esse composto é rapidamente biodegradado em testes utilizando tanto inóculos adaptados quanto inóculos não adaptadas. Foram relatadas por Waggy et al. (1994), a remoção de 88% de butil cabitol de uma amostra de água em 28 dias. Em geral, a maioria dos estudos com butil carbitol relataram entre 58% e 100% de biodegradação entre 15 a 28 dias. Outros trabalhos ainda relataram uma rápida biodegradação com essencialmente 100% biooxidação alcançado em menos de 10 dias (ZAHN; WELLENS, 1980). Ainda sobre o butil carbitol, é importante citar

também que os éteres de glicol são altamente móveis e não são adsorvidos às partículas de solo (CMA, 1994).

Estes resultados sugerem que butil carbitol, assim como outros ésteres etileno glicol biodegradam rapidamente e não devem persistir no ambiente. Estes dados confirmam a curva de respirometria e os valores de produção de CO_2, visto na Tabela 10, e mostram que butil carbitol é facilmente biodegradável. O maior empecilho para a remoção total de AFFF do ambiente, portanto, continua sendo os perfluorcarbonados.

Os resultados do monitoramento semanal (Figura 66) e a taxa acumulada (Tabela 10) revelaram que a aplicação de AFFF à gasolina resultou em valores ainda maiores de produção de CO_2 pela microbiota de solo do que a soma de cada um dos elementos separados. O efeito positivo na produção de CO_2 em B (5930,61 µmol) foram superiores aos valores acumulados dos ensaios individuais G e F (3059,71 e 2354,54 µmol, respectivamente). Sendo assim, houve uma interação positiva entre os dois compostos no processo de biodegradação. A adição de AFFF desempenhou uma maior eficiência de degradação em B, principalmente, no início do tratamento, promovendo maior produção média de CO_2 (326,91±15,3 µmol). Isso pode ser devido ao efeito surfactante da solução de AFFF nas moléculas hidrofóbicas presentes na gasolina (Figura 67).

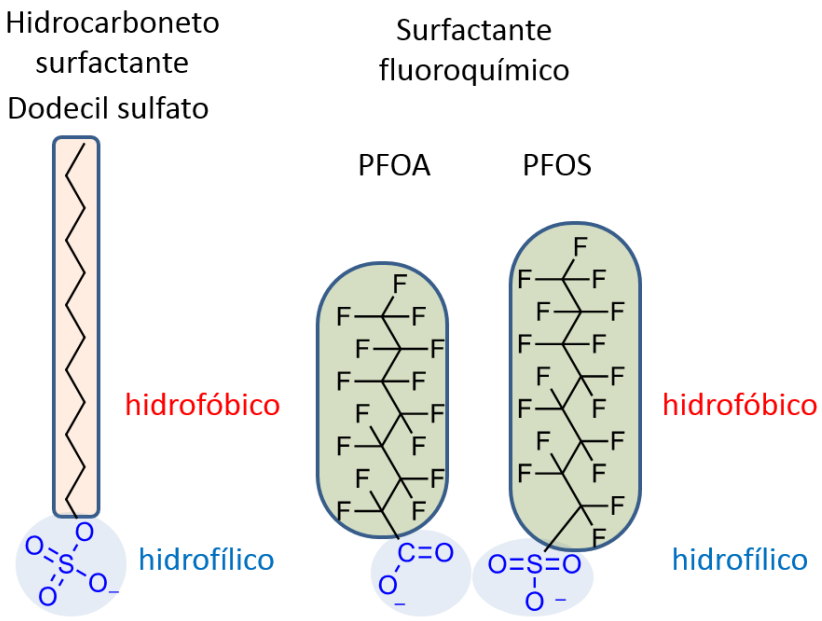


Figura 67 – Moléculas surfactantes presentes na formulação de AFFF Sintex e Ansul. Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior taxa de produção de CO_2 dentre os ensaios ocorre quando gasolina e AFFF estão combinados em uma mesma matriz de solo. A contaminação por AFFF pode levar mais etapas metabólicas durante o processo de biodegradação de hidrocarbonetos devido à capacidade emulsificante, atingindo ganhos de 28,63% na liberação de CO_2. Essas moléculas aumentam a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e, portanto, favorecem seu metabolismo (NITSCHKE et al., 2004). O aumento na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo é devido à interação óleo-surfactante-microrganismo que facilita e estimula a microbiota do solo em degradar os compostos poluentes (JAIN et al., 1992; WHANG et al., 2008).

De fato, testes complementares de emulsificação E_{24} realizados com a interface gasolina / AFFF demonstram que as características físico-químicas do ambiente em que se encontram os hidrocarbonetos são um fator decisivo na cinética de biodegradação. A atividade surfactante da AFFF em gasolina foi avaliada ao adicionar a tubos de ensaio 2 mL de AFFF 6% a gasolina isenta de álcool. O conteúdo dos frascos foi agitado em agitador de tubos (vórtex) por 1 minuto em alta rotação. Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total, após medição com régua.

Os microrganismos agem, principalmente, na interface óleo-água (AMUND; ADEBIYI, 1991) e por isso o aumento da área de superfície causado pelos surfactantes acelerou a biodegradação, aumentando o potencial de dispersão dos compostos em meios aquosos. A adição de surfactantes fez com que a emulsificação (E_{24}) dos compostos hidrofóbicos presentes na mistura AFFF e gasolina fosse em média 76,25% maior que em sua ausência, comparável ao controle utilizando outro detergente sintético Tween 80, cujo índice de emulsificação para gasolina é de 90,10%.

Outro fator de sucesso na biodegradação de AFFF e gasolina se deve ao fato do inóculo obtido no solo do Jardim Experimental da UNESP Rio-Claro ter sido pré selecionado para ambas as substâncias, dado o histórico e contaminações com hidrocarbonetos de petróleo do local de coleta e a bioestimulação com AFFF durante o preparo dos inóculos. O sucesso em inocular esses microrganismos nos solos deve-se à capacidade destes microrganismos em assimilar os contaminantes em seu metabolismo mais facilmente e / ou mais rapidamente que outros grupos. Assim, a bioaumentação ocorrida ali representou uma alternativa de grande valor no

aperfeiçoamento do processo de biorremediação, assim como já descrito para outras substâncias por Taccari et al. (2012) e Szulc et al. (2014).

Apesar da maior atividade observada nestes sistemas de co-contaminação, essa tese não propõe o uso de surfactantes fluorados para auxiliar processos de biorremediação de solos contaminados com gasolina. É irresponsável considerar a adição de um poluente para remediar outro poluente, afinal, ambas substâncias são perigosas. O ideal é buscar, neste caso, um surfactante ideal para remoção de hidrocarbonetos. Biossurfactantes são, para isso, uma boa alternativa (MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012; MONTAGNOLLI et al., 2014; LOPES 2014).

4.3.1. Modelagem matemática e biodegradação prevista

Os padrões na distribuição dos dados de produção de CO_2 ao longo do tempo, observados na Figuras 66, permitiram a proposta de modelos matemáticos acerca do processo de biodegradação. A modelagem dos dados permitiu um melhor conhecimento da cinética do processo e, com isso, prever e otimizar as condições de tratamento (KERNANSHANI et al., 2006).

Na Figura 68 estão apresentados os ajustes das curvas experimentais pela produção de CO_2 semanal, utilizando o modelo de Membré et al. (1996) adaptado por Montagnolli et al. (2009). Cada curva obtida gerou um índice de correlação (R^2) que demonstra a adequação do ajuste dos dados ao modelo. A equação do modelo utilizado consiste de duas partes, uma delas descreve o crescimento e a outra o declínio da curva. A partir do ajuste aos dados foi possível prever o comportamento cinético esperado de cada sistema respirométrico nas suas respectivas taxas de produção semanal de CO_2 durante o processo de biodegradação.

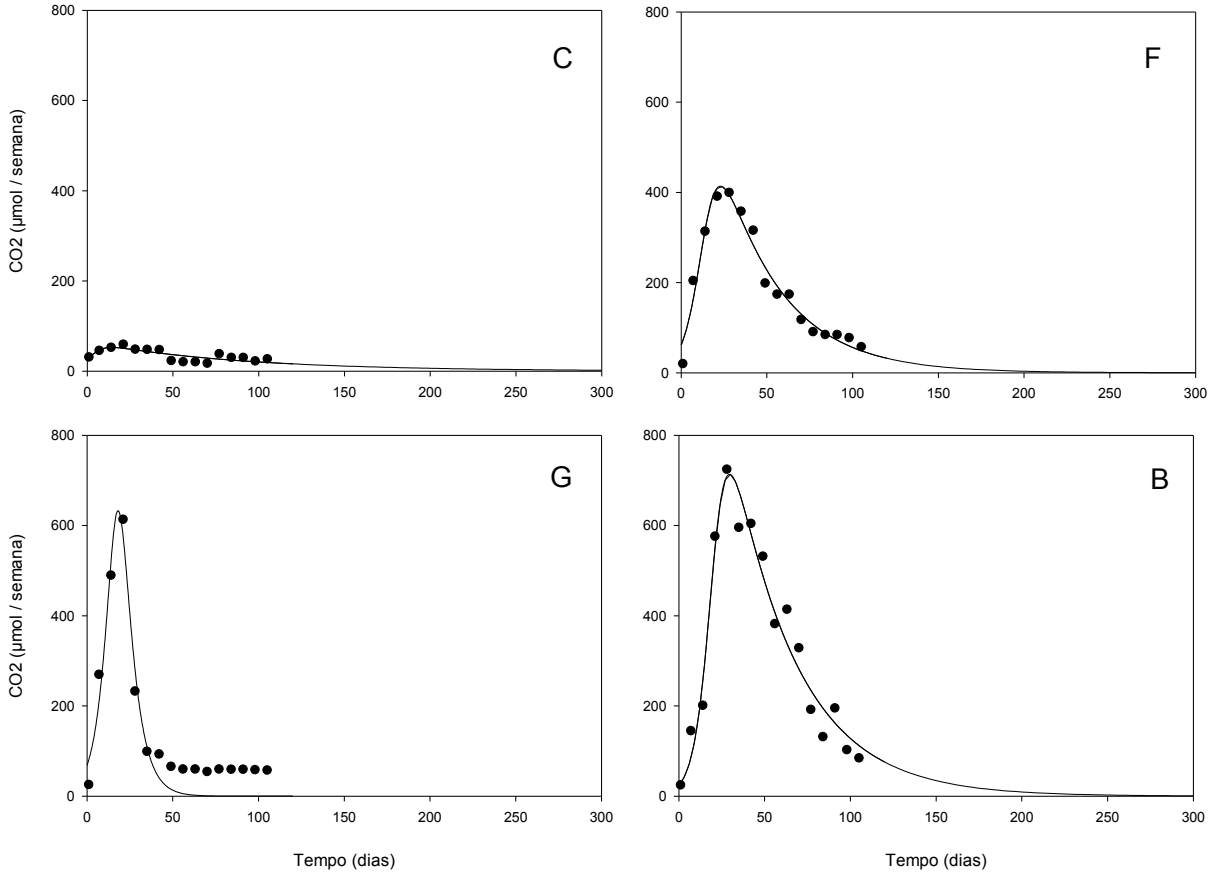


Figura 68 - Produção de CO_2 semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina) ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009). Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, na Figura 68, o eixo que designa o tempo de incubação foi estendido para 300 dias, superior ao intervalo de 105 dias utilizado para coleta de dados. Assim, utilizou-se o modelo para prever a cinética de produção de CO_2 com monitoramento até 300 dias de biodegradação.

Todos os conjuntos de dados de produção semanal de CO_2 se ajustaram ao o modelo proposto. Após cerca de um milhão de iterações dos parâmetros no ajuste ao modelo, o R^2 apresentou valores de 0,700 a 0,980.

Dado os valores altos de correlação ao ajuste dos dados ($R^2 > 0,700$) foi feita a previsão do tempo estimado, para o término da biodegradação (BRminT), ou seja, o final do processo de biodegradação de cada ensaio previsto pelo modelo ajustado aos dados de respirometria. Neste sentido, na Tabela 10 estão demonstrados os valores de R^2 e do tempo estimado para o término da biodegradação (BRminT).

O modelo proposto quantificou com precisão o padrão observado de aumento e declínio na produção de CO_2 nos sistemas respirométricos.

Os dados de produção acumulada de CO_2 foram ajustados de acordo com o modelo de Schimdt et al. (1985) e adaptado por Montagnolii et al. (2014). Foi visto nos perfis de biodegradação que existe um padrão de distribuição próximo ao linear ou exponencial. Desta forma, foi possível desenvolver modelos matemáticos que se ajustaram aos dados. Na Figura 69 estão representados todos estes ajustes, em que foi observada uma tendência à desaceleração da produção acumulada de CO_2, após 40 dias. Por esse motivo foi dada preferência a um modelo logístico não linear, pois um modelo linear não se adaptaria com precisão a todos os casos observados. Com esta estratégia, foi possível obter valores de R^2 acima de 0,982 em todos os ajustes e, consequentemente, estabelecer o valor máximo de biodegradação previsto (Bmax).

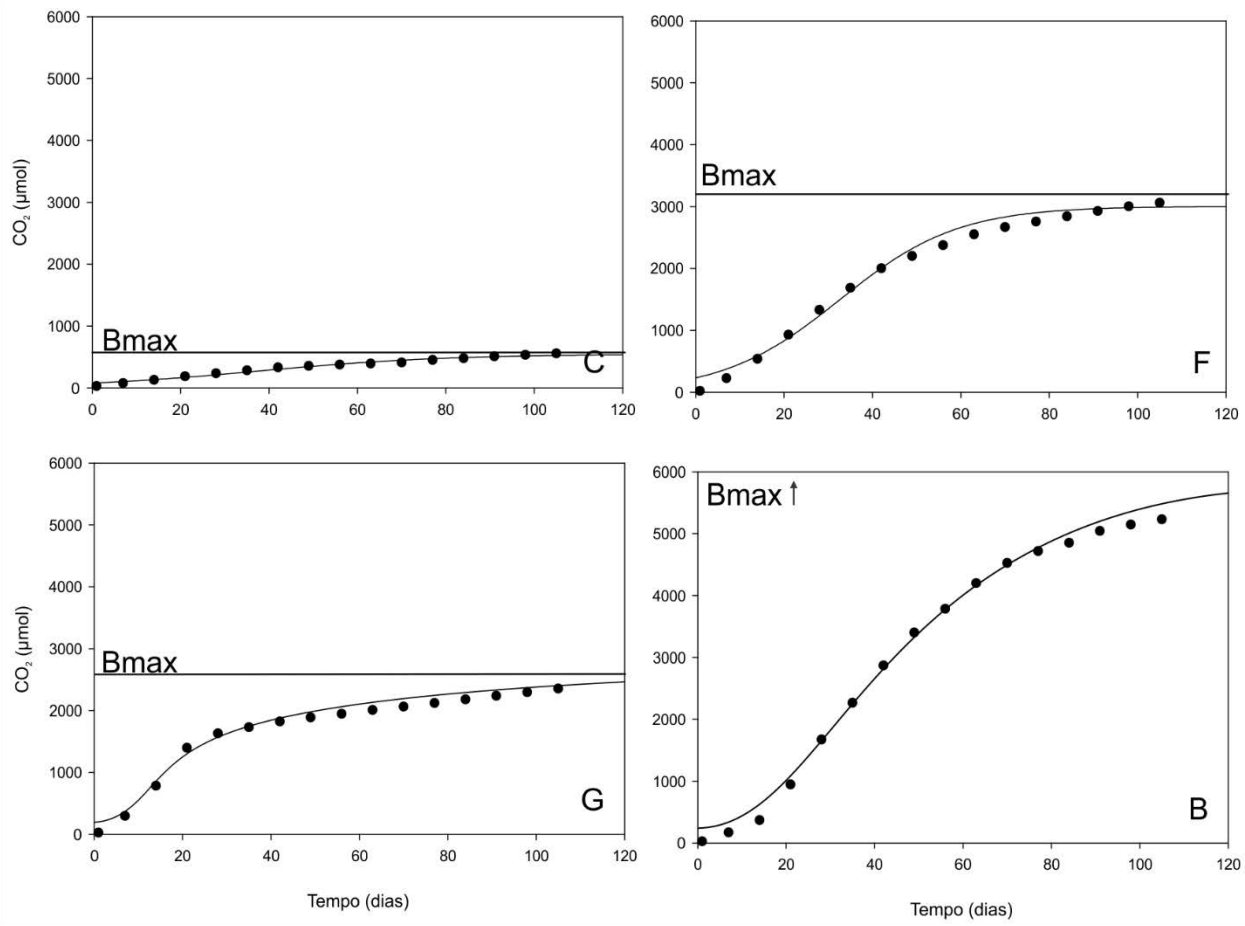


Figura 69 - Produção de CO_2 acumulada pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), F (AFFF), G (gasolina) e B (AFFF+Gasolina) ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnolli et al. (2014). Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o ajuste dos dados (Figura 69), foram gerados dois parâmetros importantes pela análise: valor máximo de biodegradação previsto (Bmax) e tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (BmaxT). A partir disso, foi possível prever o máximo possível de CO_2 que seria produzido e o tempo final de biodegradação de cada biotratamento realizado (Tabela 11).

O valor de Bmax é estabelecido quando a curva gerada pelo modelo se estabiliza e não ocorre mais aumento significativo no parâmetro B, definido na equação como produção acumulada de CO_2, ao longo do tempo. Foi considerado como aumento significativo valores de B < 0,99 x Bmax. Na Figura 69 está representado o ajuste dos dados, onde a linha Bmax indica o valor máximo que a curva ajustada alcançará. O tempo de término de biodegradação foi considerado, então, como o tempo de produção de CO_2 igual a B = 0,95 x Bmax (MONTAGNOLLI et al., 2009).

Comparando-se os valores de Bmax (Tabela 11), tem-se uma maior produção de CO_2 total esperada para os sistemas B, com AFFF e gasolina. Já a respiração basal do solo, obtida no ensaio C, apresentou um valor máximo de biodegradação previsto igual a 595,98 µmol de CO_2.

Ao analisar o tempo que se leva para que o valor de Bmax seja alcançado (BmaxT), nota-se que, os sistemas contendo apenas gasolina são os mais rápidos (G) (Tabela 11). O processo de biodegradação foi realizado em um tempo mais curto, conforme os dados experimentais e também reportado nos estudos de Jain et al. (1992), Kosaric (2001). Christofi; Ivshina (2002) e Montagnolli et al. (2014).

Tabela 11 - BRminT, Bmax, BmaxT e R^2 dos modelos matemáticos ajustados às produções semanal e acumulada de CO_2

	Semanal		**Acumulado**		
Sistema	**BRminT**	**R^2**	**Bmax**	**BmaxT**	**R^2**
	dias		*µmol CO_2*	*dias*	
Controle (C)	*	0,7754	595,9875	*	0,9825
AFFF (F)	136	0,9813	3157,1981	120	0,9941
Gasolina (G)	45	0,9008	2572,2521	49	0,9726
Gasolina+AFFF (B)	170	0,9769	6140,6744	202	0,9909
	***Não relevantes devido aos valores extremamente baixos dos dados no ajuste**				

(Elaborado pelo autor)

A validação dos modelos pode ser feita quando ambos os ajustes atinjam resultados coerentes e semelhantes em um dos parâmetros estimados (HILLS; TRUCANO, 1999). Sendo assim, o parâmetro do tempo final do processo de biodegradação foi analisado nos dois modelos propostos. Para isso foi feita a comparação entre BRminT do modelo ajustado à produção semanal de CO_2 (MEMBRÉ et al., 1996) e BmaxT daquele com os dados de produção acumulada (SCHIMDT et al., 1985), conforme demonstrado na Figura 70.

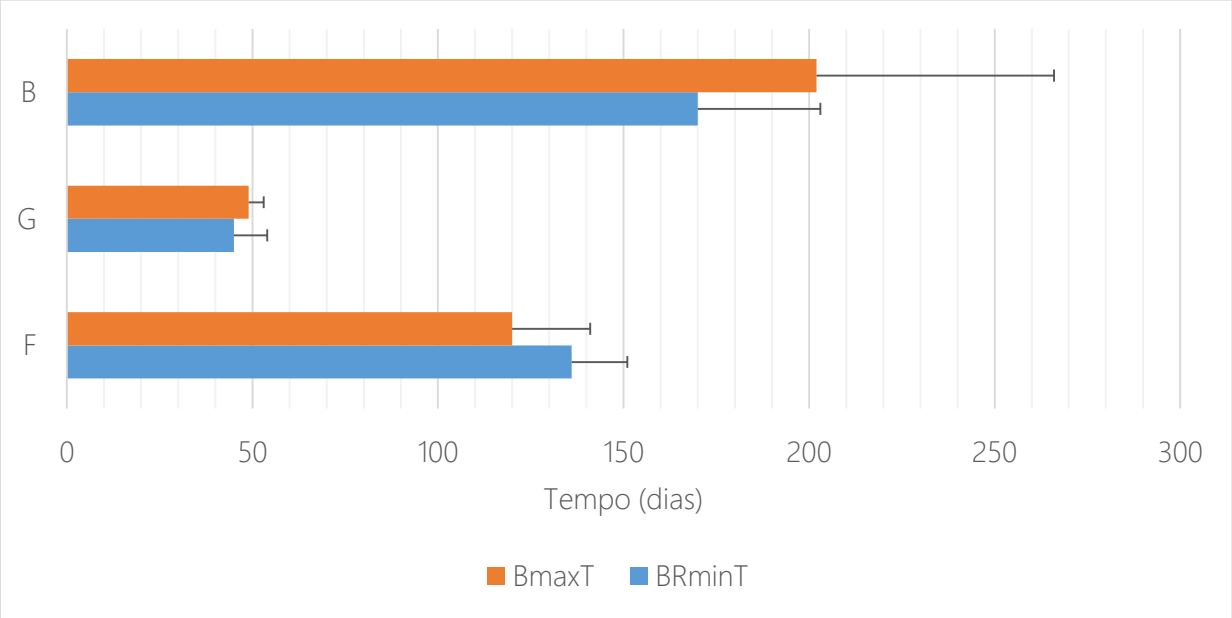


Figura 70 - Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação previsto pelos dois modelos para os dados de produção de CO_2. BRminT – semanal (Membré et al., 1996); BmaxT – acumulada (Schmidt et al., 1985). Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 70 é possível observar que as semelhanças entre os dois ajustes são maiores na previsão de valores menores de tempo. A previsão em longo prazo causa uma maior diferença entre valores previstos para o final da biodegradação. O ajuste obtido foi coerente entre os dois modelos propostos, o suficiente para prever o comportamento destes processos de biodegradação em sistemas de respirometria de Bartha, sob as condições do estudo.

Portanto, observou-se que o processo de biodegradação de AFFF em solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo pode ser modelado na abordagem laboratorial aplicada. Embora os estudos tratados aqui estejam restritos a

compreensão em menor escala dos processos de respiração de uma comunidade microbiana em um ambiente com fatores extremamente controlados (temperatura, capacidade de campo, iluminação), foi também mostrado que pode ser previsto o comportamento ambiental da AFFF no ambiente em cenários de co-contaminação. Essa conclusão abre espaço para o escalonamento cada vez maior dos experimentos a fim de conseguir prever o comportamento desses poluentes em cenários reais de derramamentos e de descarte inadequado dos contaminantes.

5. Capítulo 3

Fito-toxicidade de AFFF

5.1. Introdução

O princípio dos testes de fitoxicidade baseia-se na determinação do potencial de impacto de um poluente na biota presente em certo ambiente. Os dados obtidos podem ser utilizados na regulação do uso destes compostos químicos e no diagnóstico de tratamento, após a contaminação da área (HAGNER et al., 2010).

Testes ecotoxicológicos têm sido há muito tempo utilizados com relativo sucesso como uma ferramenta complementar para monitorar a eficiência na biorremediação do solo, tornando-se essencial para avaliar os riscos ecológicos em ambientes contaminados (WANG et al., 1987). No entanto, poucos trabalhos combinam a realização de ensaios ecotoxicológicos com um estudo detalhado das comunidades microbianas em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e espumas de incêndio (SHEPPARD et al., 2011; LLADÓ et al., 2012). Além disso, nenhum trabalho relacionou a toxicidade de espumas de incêndio do tipo AFFF (ou compostos perfluorados) ao petróleo.

Embora existam muitos ensaios sobre a toxicidade de AFFF citados na revisão da literatura dessa tese, é consenso que a avaliação realista de toxicidade de misturas AFFF no meio ambiente é difícil porque efluentes AFFF são misturas complexas que contêm, além dos componentes da formulação variada de AFFF, outros poluentes

primários, bem como sub produtos potencialmente tóxicos do incêndio em que foram aplicados.

A formulação de AFFF apresenta vários componentes potencialmente tóxicos, que podem ser os próprios fluorcarbonados ou mesmo o butil carbitol.

Enquanto as moléculas precursoras da formulação original da AFFF (fluortelômeros e PFAS) são pouco estudados, os efeitos das substâncias persistentes PFOA e PFOS do final das vias de degradação já foram estudados em embriões de zebra-fish. Huang et al. (2010) demontraram que embriões expostos a esses PFAS apresentaram problemas no desenvolvimento de espinha, bexiga natatória não inflada, diminuição da frequência cardíaca e movimentos espontâneo anormais após a exposição a várias concentrações de PFOS e PFOA (0-8 $mg.L^{-1}$) em 6-120 horas pós-fecundação. Concentrações mais elevadas de um fluortelômeros em peixes, por bioacumulação, aumentam fígados nos meios que estão distribuídos próximos a locais de liberação do AFFF, somado a níveis baixos de β-oxidação peroxisomal e estresse oxidativo hepático, demonstrando assim impacto em curto prazo (9 dias) da AFFF nos peixes expostos.

Em relação ao butil carbitol, organismos aquáticos foram testados usando uma variedade de peixe, invertebrados, algas, e espécies microbianas. Pelo menos cinco espécies de peixe foram testadas quanto à toxicidade aguda, para butil carbitol, usando uma variedade de protocolos de testes e parâmetros toxicológicos. Embora tenham apresentado resposta tóxica, a classificação da USEPA atesta o produto como não toxico, em alguns casos, e de baixa toxicidade em outros (STAPLES et al., 1998).

Não existem testes em plantas para os PFCs encontrados em formulações de AFFF, tanto dos precursores PFAS e fluortelômeros, quanto os persistentes PFOA e PFOS. Logo, este foi um argumento interessantes para os ensaios de toxicidade realizados apresentados nesse capítulo.

5.1.1. Motivação

Para garantir uma avaliação adequada do risco da contaminação e o monitoramento do processo de biorremediação, os testes de toxicidade, as análises químicas e os estudos de ecologia microbiana das comunidades devem ser complementares entre si (AL-MUTAIRI et al., 2008; PLAZA et al., 2010). A fito-toxicidade faz parte dessa abordagem, para demonstrar os efeitos da liberação da

AFFF no ambiente. O fato de não existir publicações com ensaios de fito-toxicidade com AFFF, sejam eles em co-contaminação com petróleo ou não, motivaram a criação dos experimentos desse capítulo.

Os sub-produtos da degradação dos PFAS e fluortelômeros poderiam afetar o desenvolvimento de plantas ao longo do tempo. Diferentemente da maioria dos estudos encontrados na literatura, que monitoram apenas os produtos encontrados originalmente na formulação da AFFF ou os compostos persistentes finais, a toxicidade foi observada em tempo inicial, intermediário e final. Alterações que afetam o desenvolvimento e / ou a sobrevivência de um organismo-teste poderiam, portanto, fornecer uma avaliação geral do progresso da biorremediação em solos contaminados.

5.2. Metodologia

5.2.1. AFFF Utilizado

Para os experimentos de toxicidade, foi utilizado a AFFF 6% da marca Sintex do lote S1371 / 11, assim como no capítulo 2. A formulação distribuída por Sintex é a mesma da marca Ansul analisada no capítulo 1.

5.2.2. Solo Utilizado

Após peneirado com granulometria 1,68 mm, o solo do Jardim Experimental – IB / UNESP, campus Rio Claro foi utilizado para elaborar diferentes amostras contendo AFFF em diferentes condições de tratamento (concentração das soluções e tempo). Os procedimentos seguiram uma adaptação da Norma técnica L6.350 da CETESB.

O canteiro utilizado para os ensaios apresenta histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. O solo dessa área tem sido utilizado exclusivamente para experimentos com gasolina, diesel, querosene e petróleo ao longo dos últimos 8 anos.

Os grupos de tratamento foram separados para retirada em 60 e 120 dias. Após coletados, os solos foram estocados a 4,0±0,1°C para posterior análise toxicológica e metagenômica.

5.2.3. Primeiro grupo de experimentos - Toxicidade das diluições de AFFF

Inicialmente, foram preparadas amostras de AFFF em diferentes diluições a partir da formulação disponível comercialmente de AFFF 6%. Nesse grupo de experimentos não foi utilizado solo, mas apenas a AFFF pura, sendo que a concentração de compostos perfluorados é de aproximadamente 195 $g.L^{-1}$. As diluições então foram feitas para chegar às concentrações de 3% e 1%, respectivamente 97,5 $g.L^{-1}$ e 19,5 $g.L^{-1}$. As concentrações de 3% e 1% são também comercializadas em galões, assim como o produto AFFF 6%. As amostras de foram inseridas diretamente aos bioensaios de toxicidade, a partir da germinação de

sementes e desenvolvimento de plântulas de duas espécies (*Lactuca sativa* e *Eruca sativa*).

5.2.4. Segundo grupo de experimentos – Toxicidade ao longo do tempo

O segundo grupo de experimentos sobre toxicidade foi feito para avaliar a toxicidade de AFFF em diferentes concentrações ao longo do tempo em solo.

O ambiente de biodegradação foram montados através da simulação da contaminação do solo em uma sacola plástica preenchida por 3 kg de solo e quantidades variáves de AFFF (Tabela 12). O recipiente foi então preenchido por pequenos furos de aproximadamente 1 mm de diâmetro, espaçados em 1 cm cada, a fim de permitir a troca de microrganismos entre o solo contendo óleo e o solo do meio externo. O recipiente foi enterrado a 10 cm da superfície (Figura 71). O preparo do inóculo foi uma adaptação da Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

Figura 71 – Amostras sendo enterradas no Jardim Experimental – IB / UNESP, campus Rio Claro. Fonte: Elaborado pelo autor.

A AFFF foi adicionado numa proporção semelhante a derrames ocorridos em ambientes terrestres (USEPA, 2009b). As concentrações foram então ajustadas para melhor representar um ambiente real de uma refinaria de petróleo após aplicação da espuma de incendio. A concentração típica de AFFF encontrada em solo onde é utilizado é de até 15,0 $g.L^{-1}$ de solo (USEPA, 2009b), o que resulta em 4,5 $mL.kg^{-1}$, considerando a densidade média do solo 1,5 $g.cm^{-3}$ e da AFFF 1,12 $g.cm^{-3}$. Portanto, a quantidade de AFFF nas contaminações simuladas de solo foi conduzida em 3 graus de magnitude, sendo elas: 0,1x (ou 0,45$mL.kg^{-1}$), 1x (4,5 $mL.kg^{-1}$) e 10x (45 $ml.kg^{-1}$).

Foram preparadas 12 amostras de solo com variações nas condições de tratamento a que foram submetidas (Tabela 12). Estas amostras foram dispostas em

sacos plásticos e foram enterrados no Jardim Experimental do Instituto de Biociências - UNESP, campus Rio Claro.

Transcorrido o período de 60 e 120, os solos foram desenterrados e imediatamente realizadas as análises de ecotoxicidade.

Tabela 12 - Amostras de solo para análises toxicológicas

Amostras de solo		Composição	Tempo de análise
1	**C0**	Solo	0 dias
2	**F0 0,1x**	Solo + AFFF 0,1x m/v	0 dias
3	**F0 1x**	Solo + AFFF 1x m/v	0 dias
4	**F0 10x**	Solo + AFFF 10x m/v	0 dias
5	**C60**	Solo	60 dias
6	**F60 0,1x**	Solo + AFFF 0,1x m/v	60 dias
7	**F60 1x**	Solo + AFFF 1x m/v	60 dias
8	**F60 10x**	Solo + AFFF 10x m/v	60 dias
9	**C120**	Solo	120 dias
10	**F120 0,1x**	Solo + AFFF 0,1x m/v	120 dias
11	**F120 1x**	Solo + AFFF 1x m/v	120 dias
12	**F120 10x**	Solo + AFFF 10x m/v	120 dias

(Elaborado pelo autor)

5.2.5. Bioensaios de toxicidade – Testes de germinação de sementes

A germinação é um fenômeno biológico da retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente quando o embrião sai do repouso fisiológico e entra em atividade metabólica (NASSIF et al., 1998), desde que satisfeitas as condições internas e ambientais necessárias para que o organismo possa se desenvolver. Qualquer alteração nesses parâmetros por substâncias tóxicas podem afetar o desenvolvimento do tecido vegetal (AYERS; WESTCOT, 1999).

A avaliação da toxicidade das amostras de solo foi realizada por meio de testes fitotoxicológicos por metodologias padronizadas. O método empregado baseou-se

nas metodologias propostas por Dutka (1989), Tiquia et al. (1996), Morales et al. (2004) e Montagnolli et al. (2015). O efeito da contaminação do solo com AFFF foi avaliado utilizando sementes de dois organismos-teste: *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula), conforme apresentado na Figura 72.

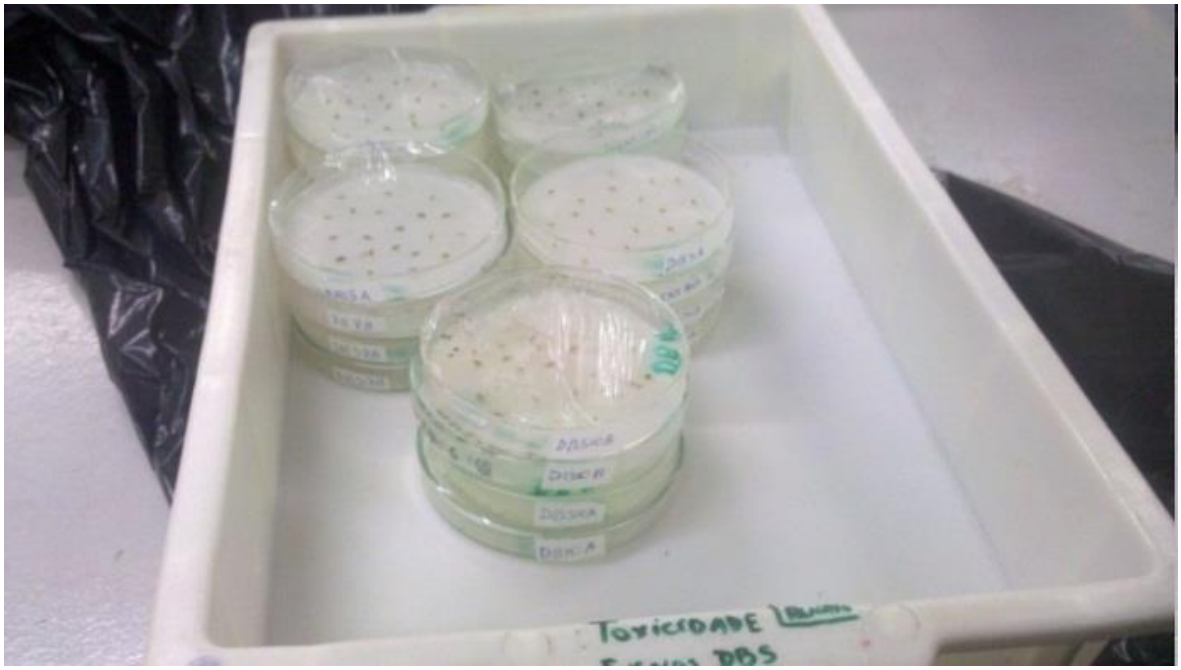


Figura 72 – Sementes de alface utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade (tempo zero) dentro das placas de Petri. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os bioensaios de toxicidade com as espécies vegetais foram avaliados pela germinação de sementes e desenvolvimento da raiz e do hipocótilo. As sementes foram adquiridas de um mesmo fornecedor (TopSeed® – Linha Azul), de mesmo lote e livre de defensivos químicos agrícolas.

Para cada organismo-teste, foi realizado ensaios em triplicata com cada amostra de solo. Também, foram realizados o controle positivo (CP) com água e o controle negativo (CN) com $ZnSO_4$ na amostra de solo controle sem adição de AFFF. Para os testes de germinação, foi colocado em cada placa de Petri um papel de filtro. Sobre o papel de filtro foi adicionado 4,0 mL da solução testada e certificou-se a inexistência de bolhas de ar durante o preparo das placas. As soluções utilizadas foram a porção sobrenadante dos lixiviados das amostras de solo da Tabela 12, mantidas sob agitação a 210 rpm em mesa agitadora Catel por 24 horas. Os frascos continham 5,0 g de solo e 100,0 mL de água desionizada.

As sementes foram colocadas em seguida sobre o papel de filtro com a solução testada. Tanto no ensaio com alface quanto com rúcula foram colocadas 20 sementes (Figura 73). Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada substância testada.

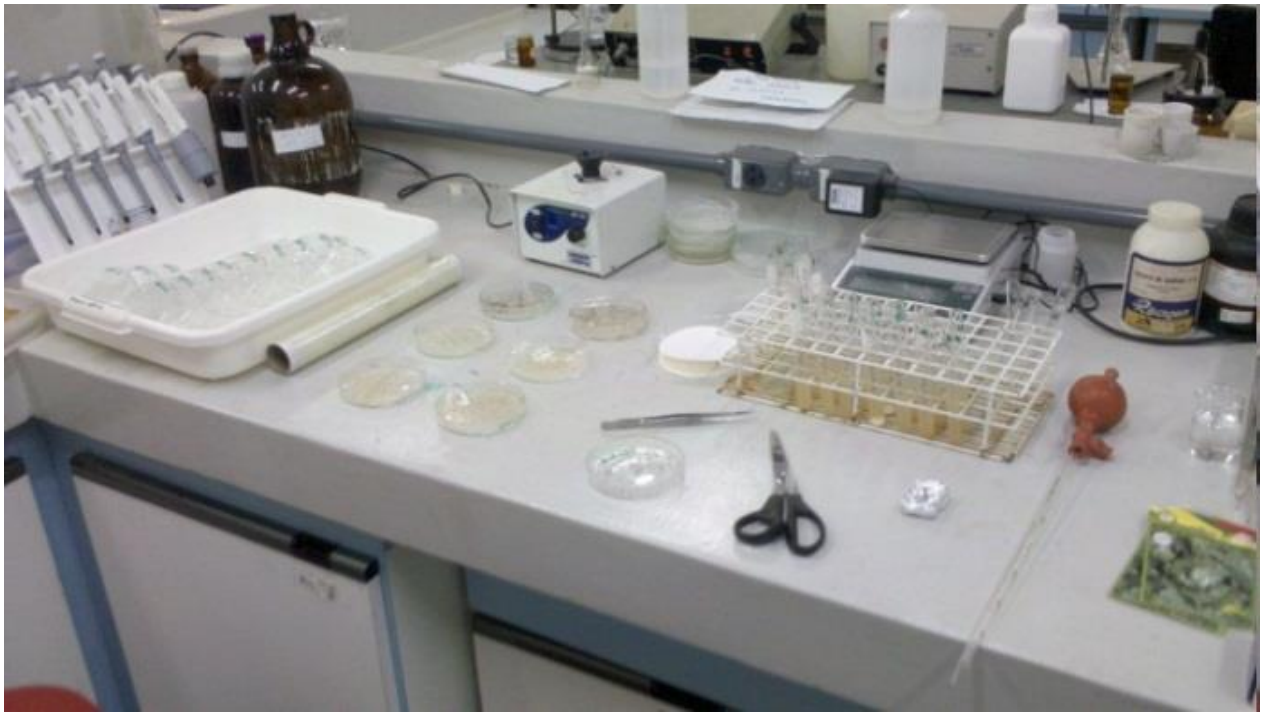


Figura 73 – Montagem dos ensaios de toxicidade. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, os recipientes plásticos foram cobertos com filme de PVC a fim de não perder umidade e incubados a 20,0±0,1°C por 120 horas ao abrigo da luz. No controle positivo (CP) foi adicionado 1,0 mL de sulfato de zinco 0,050 M, para testar a sensibilidade das sementes utilizadas.

5.2.5.1. Germinação e crescimento

Na análise do desenvolvimento da plântula, o método consistiu inicialmente no congelamento das plântulas após 120 horas de incubação. Este procedimento, além de interromper o crescimento das plântulas de modo uniforme, facilita as medições pela diminuição da rigidez dos tecidos vegetais, evitando possíveis quebras das

plântulas durante a realização das medições. Para cada plântula foram tomadas medidas da raiz e hipocótilo.

A contagem de sementes germinadas foi realizada após 120 horas, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentassem 2 mm de protrusão da radícula. Os dados obtidos nos ensaios foram utilizados para calcular a porcentagem de germinação (%G) dada por Labouriau; Agudo (1987) conforme a Equação 14.

$$\%G = \frac{SGa}{SGt} \times 100 \quad (14)$$

onde:

SGa é o o número total de sementes germinadas;

SGt é o número total de sementes na placa de Petri;

Os dados foram analisados estatisticamente e as médias de germinação foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade conforme Sokal; Rohfl (1995) após a transformação dos dados percentuais %G em arco seno (SNEDECOR, 1962; LABOURIAU, 1983; PIMENTEL; GOMES, 1987) conforme a Equação 15. A transformação dos valores foi feita para normalizar o conjunto de dados e permitir a aplicação do teste estatístico.

$$Valor\ transformado = arco\ seno\ (\%G)^{0,5} \quad (15)$$

A porcentagem de germinação foi transformada apenas para os testes de Tukey, porém nas Figuras e Tabelas são apresentadas as porcentagens médias originais.

5.2.5.2. Crescimento de raiz e hipocótilo

A realização dos testes de toxicidade ao desenvolvimento da raiz e hipocótilo seguiu os procedimentos descritos por Morales (2004) e foram feitos com as mesmas placas montadas em 5.2.5. Entretanto, nesse caso, após 120 horas as placas foram submetidas ao congelamento em freezer. Este procedimento, além de interromper o crescimento das plântulas de modo uniforme, facilita as medições pela diminuição da rigidez dos tecidos vegetais, evitando possíveis quebras das plântulas durante a realização das medições. Para cada plântula foram tomadas medidas da raiz e hipocótilo (Figura 74).

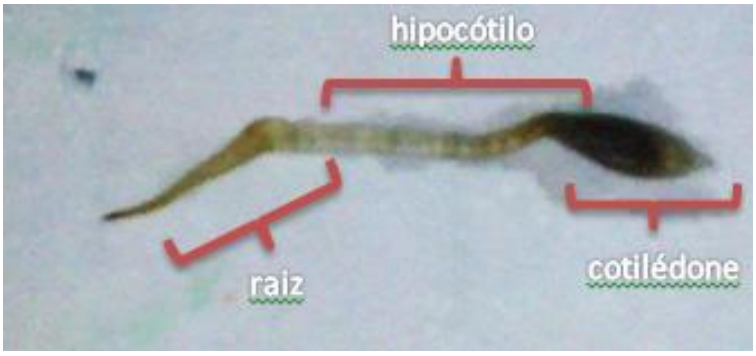


Figura 74 – Semente de pepino e estruturas medidas. As mesmas estruturas aparecem nas sementes de alface e rúcula utilizadas nesse estudo, contudo são melhor ilustradas em sementes de pepino. Fonte: Elaborado pelo autor.

O conjunto de medidas da raiz e hipocótilo permitiu a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal após 120 horas pela observação do comprimento e %I (Equação 16).

$$\%I = [1 - \left(\frac{CMc - Ca}{CMc}\right)] \times 100 \qquad (16)$$

onde:

CMc é o comprimento médio da raiz ou hipocótilo no controle negativo;

Ca é o comprimento médio da amostra analisada.

5.2.6. Análise dos resultados

A análise dos dados de germinação foi feita utilizando uma superfície de resposta tridimensional relacionando a germinação, tempo e concentração de AFFF em um eixo *x*, *y* e *z*. Esse tratamento dos dados permitiu observar a influência que os dois fatores, tempo e AFFF) exercem, simultaneamente, na germinação das sementes de rúcula e alface. Os gráficos foram feitos através do software MICROCAL ORIGIN 8.0. É importante citar que os experimentos não foram feitos com base em planejamento fatorial e, diferentemente desse desenho experimental, o gradiente é preenchido pela extrapolação linear multidirecional direta dos dados experimentais propostos por Renka (1984) e Yuan (1998).

A superfície de resposta é criada a partir dos dados e convertidas em um plano com coordenadas cartesianas tridimensionais (Figura 75), a partir da conversão utilizando as equações 17, 18 e 19.

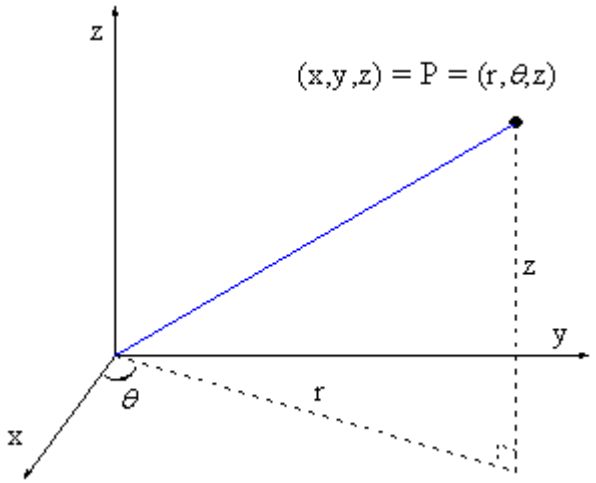


Figura 75 – Disposição dos dados em um ambiente tridimensional dadas 3 variáveis (x, y e z). Fonte: Reproduzido de Microcal Origin (2009).

$$r = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (17)$$

$$\theta = tan^{-1}\left(\frac{y}{x}\right) \quad (18)$$

$$z = z \quad (19)$$

onde,

r é a distância da coordenada em um plano;
θ é o ângulo que determina posição da variável;
z é a germinação;
x é o tempo de biodegradação;
y é a concentração de AFFF.

A partir daí o conjunto de dados passa por um processo de triangulação e definição dos contornos da superfície de resposta.

A primeira etapa é a criação de um mapa tridimensional e triangulação dos dados com base na distância entre ele (Figura 76).

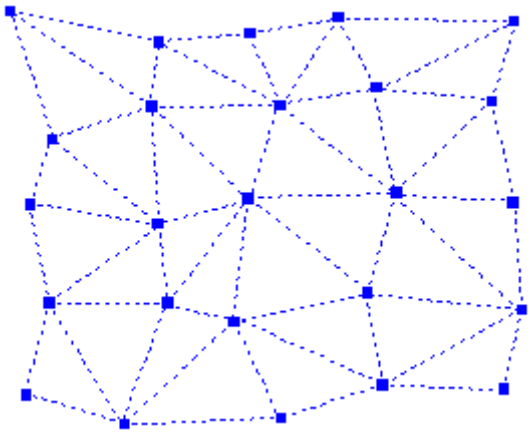


Figura 76 – Mapa de triangulação dos dados nos eixos x,y. Fonte: Reproduzido de Microcal Origin (2009).

Todos os pontos são conectados para criar tirangulos em um plano x,y. Cada um desses pontos possui um valor de z. Eles são criados de modo a ser o mais próximo e de mesmo ângulo possível entre sí. Somado a isso, os triângulos não devem se interseccionar.

O software passa por todos os planos do eixo z procurando pelas laterais dos triângulos do mapa tridimensional. Onde a lateral de cada triângulo intersecciona o plano, o ponto é definido. Cada um desses pontos nos planos separados foram computados por interpolação linear para gerar os polígonos com uma linha de contorno da superfície de resposta (x_c,y_c,z_c). Em outras palavras: a linha de contorno é traçada na borda dos triângulos que formam o mapa tridimensional dos dados, conforme observa-se na pirâmide da Figura 77.

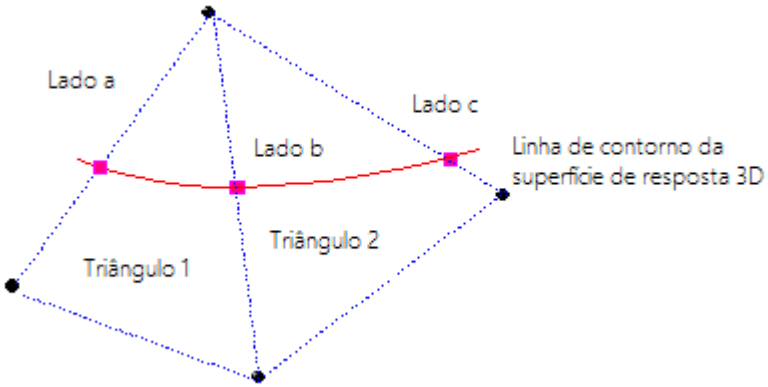


Figura 77 – Linha de contorno traçada na lateral da pirâmide de triangulação dos dados. Fonte: Traduzido de Microcal Origin (2009).

O processo de procura de pontos de interseção do mapa tridimensional de triangulação se repete em vários planos para criação de várias linhas de contorno (Figura 78).

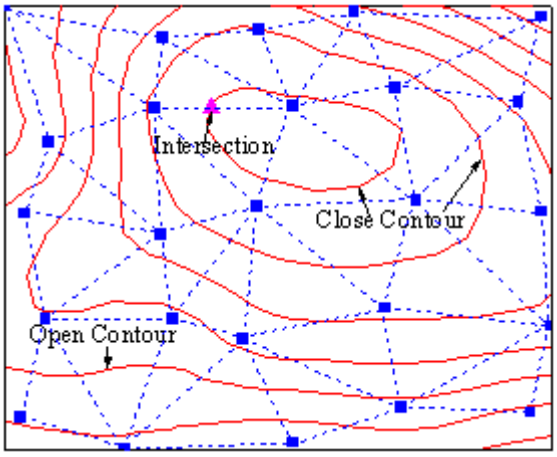


Figura 78 – Linhas de contorno traçadas em vários planos em que *open contour*: contorno aberto, *close contour*: contorno fechado e *intersection*: intersecção. Fonte: Reproduzido de Microcal Origin (2009).

O contorno pode ser suavizado com curvas do tipo *spline*, caso necessário. A resolução da superfície de resposta é dada pela quantidade de níveis de contorno feitas sobre o plano da triangulação dos dados. A cada um dos planos é atribuída uma cor. Para descrever os dados de germinação desse estudo foram utilizados 50 níveis.

5.3. Resultados e Discussões

A germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas foram avaliados para alface e rúcula. A germinação é discutida aqui com base apenas nas superfícies de resposta, entretanto, as tabelas contendo os resultados de germinação podem ser observadas Apêndice D.

5.3.1. Toxicidade das diluições de AFFF

Não ocorreu germinação de nenhuma das sementes nos bioensaios contendo AFFF, nas concentrações encontradas nos galões vendidos. A concentração original de 6% e a diluição para 3% não resultaram em germinação em nenhuma das triplicatas. No caso da diluição de 1%, observou-se a germinação média de apenas 3,4% das sementes de alface e 1,7% das sementes de rúcula.

A formulação original de AFFF é bastante concentrada e causou perturbação no ambiente de germinação das sementes. A acidez e os componentes orgânicos da AFFF podem ter inibido a germinação dos organismos testados. Os compostos fluorados são considerados inertes devido ao número de ligações C-F em sua molécula mas, ainda assim, é provável que tenham sido fatores de inibição da germinação. É válido citar também que os valores testados foram superiores aos encontrados em amostras ambientais, que devem ser inferiores a 15,0 $g.L^{-1}$ de acordo com a USEPA (2009a).

5.3.2. Alface (*Lactuca sativa*)

Após 120 horas de incubação no escuro foi observado que não houve germinação no ensaio CP para todos os tempos. Para as sementes de alface foram determinadas as porcentagens de germinação (Figura 79) e os cálculos de inibição alongamento do hipocótilo e da raiz, relativos ao controle negativo – CN (Figuras 80 e 81).

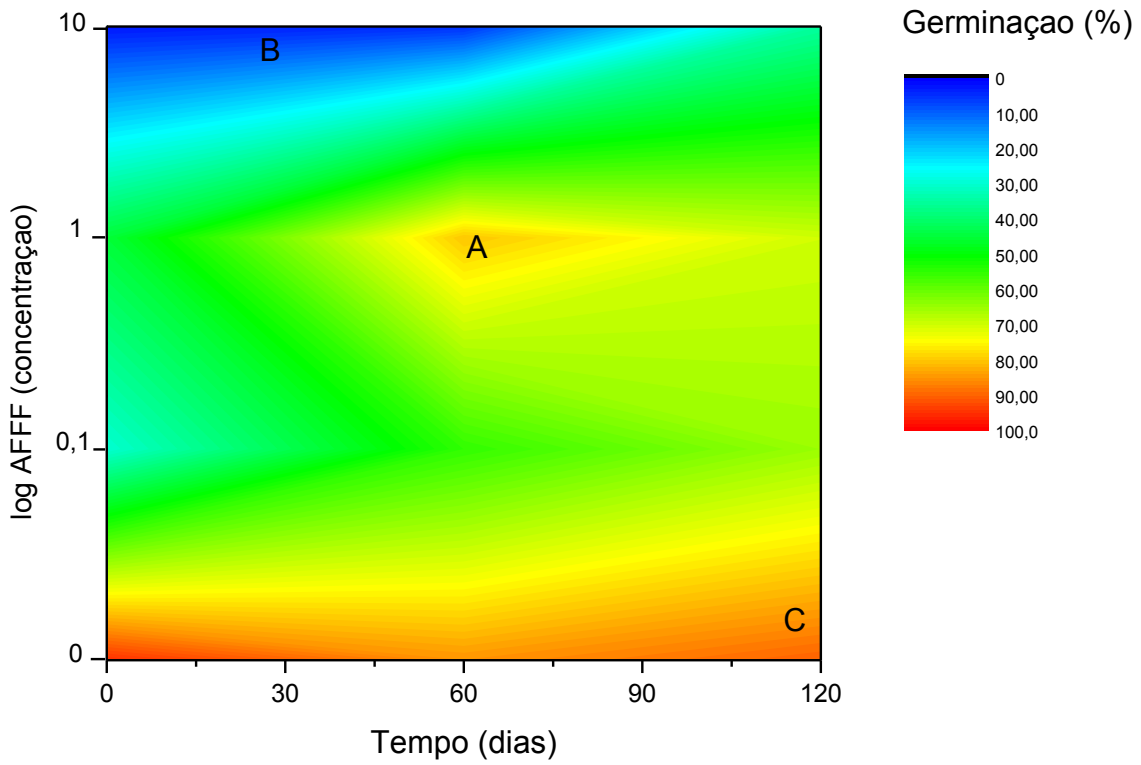


Figura 79 – Germinação de alface em AFFF em diferentes concentrações. A região A mostra a maior germinação na concentração de 1% em 60 dias. As regiões de menor e maior germinação são indicadas pela letra B e C, respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme esperado, a germinação das sementes sem exposição à AFFF nos ensaios controle C0, C60 e C120 atingiu os valores mais altos, entre 90 e 100%. Isso pode ser observado ao longo de toda a região inferior da superfície de resposta da Figura 79.

Com relação à germinação dos bioensaios de toxicidade com sementes de alface, tem-se que as amostras mais tóxicas foram aquelas com maior concentração de AFFF próximas ao tempo inicial e 60 dias (F0-10x e F60-10x). A região B da superfície de resposta (Figura 79) mostra que os valores chegam a 0-10% na extremidade superior esquerda. Contudo, ocorreu também um aumento na germinação (e diminuição na toxicidade) ao longo do tempo, sendo que após 120 dias, mesmo as concentrações mais altas de AFFF nos ensaios permitiram a germinação na faixa de 30-40%.

É possível que a biodegradação de componentes não fluorados da formulação da AFFF possa ter contribuído para a menor toxicidade com o tempo, resultando numa maior germinação após 120 dias.

Entretanto, o fator de sazonalidade das condições do solo no Jardim Experimental, que possa ter beneficiado a germinação de todas as sementes do experimento, foi considerado antes dessa conclusão. Observa-se na região C da Figura 79 um aumento na germinação dos ensaios controle sem AFFF. A análise com o teste de Tukey foi útil para esclarecer se as amostras contendo AFFF variaram junto com o controle ou foram significativamente diferentes de uma variação sazonal. O teste estatístico estabeleceu que houve diferença significativa de todos os ensaios em relação aos controles e entre si. Assim, a variação sazonal das condições do solo não foi o fator responsável para o aumento da germinação, mas sim, a diferença dos tratamentos entre si e fatores internos.

Com isso, observou-se que a AFFF tem uma toxicidade progressivamente menor ao longo do tempo nas concentrações testadas. Ainda assim, a região A da superfície de resposta (Figura 79) mostra uma mudança interessante nesse padrão. Observou-se um aumento na germinação ocorrendo, especificamente, ao redor de 60 dias na concentração 1x (F60-1x). Embora essas amostras de solo não tenham sido analisadas quimicamente, é provável que diferentes metabólitos secundários da biodegradação da AFFF tenham aparecido ao longo do processo. Aqueles que aparecem exclusivamente no tempo intermediário sob o ensaio de concentração 1x foram, portanto, menos tóxicos. Observa-se também na Figura 80 e 81 que o maior crescimento e menor inbição, excluindo-se os controles, ocorre nos ensaios contendo AFFF em ensaio de concentração de 1x (F60-1x e F120-1x).

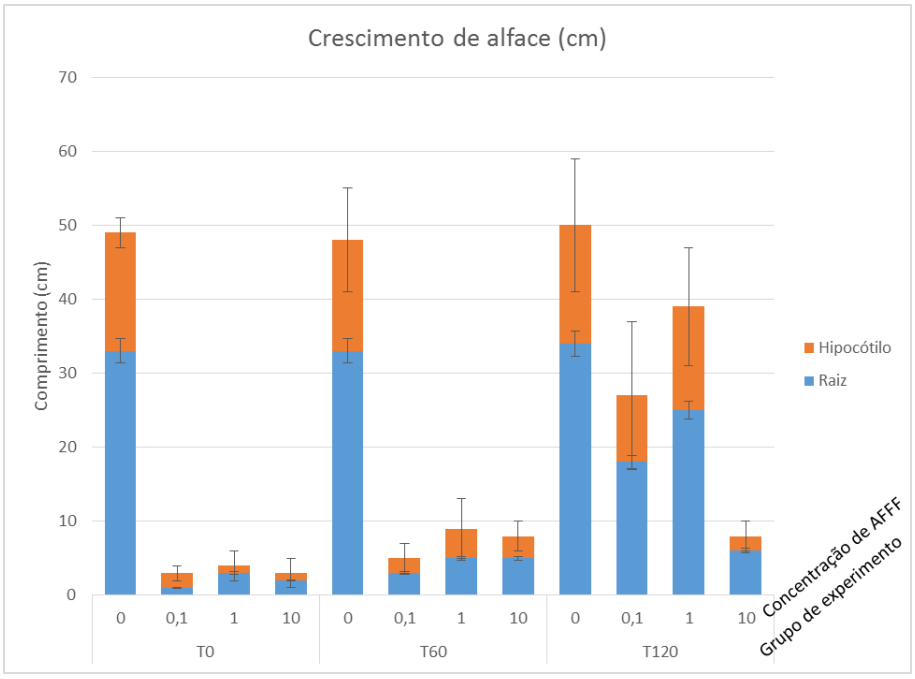


Figura 80 – Crescimento de alface em AFFF em bioensaios de toxicidade no tempo inicial (T0), intermediário (T60) e final (T120). Fonte: Elaborado pelo autor.

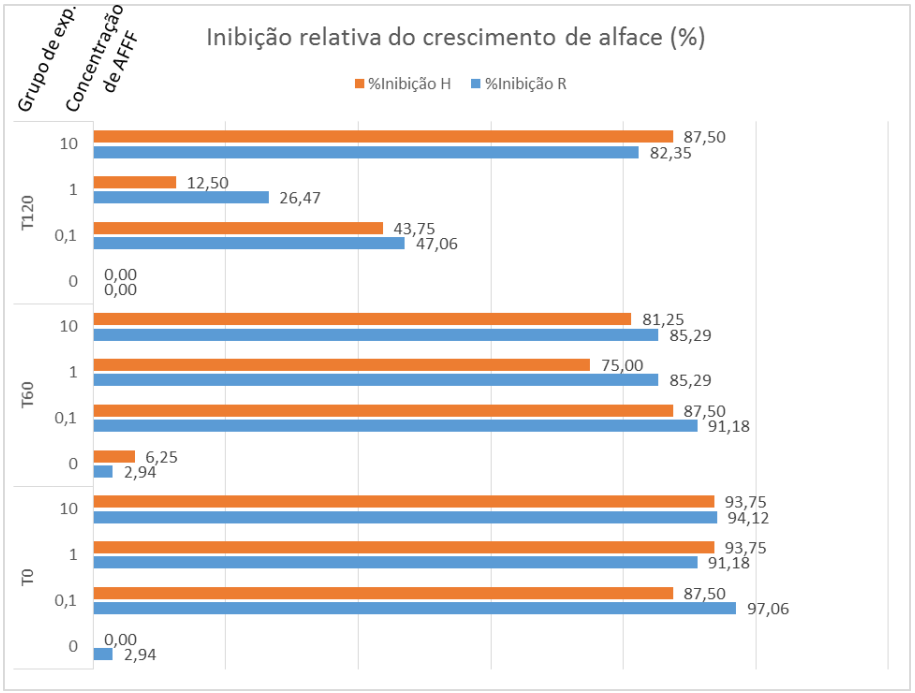


Figura 81 – Inibição relativa do crescimento de alface por AFFF em bioensaios de toxicidade no tempo inicial (T0), intermediário (T60) e final (T120). A palavra experimento foi abreviada para exp. para caber na Figura. Fonte: Elaborado pelo autor.

As Figuras 80 e 81 facilitam a visualização da resposta de alface à AFFF. Evidencia-se que no tempo final, sob ensaios com as concentrações de 0,1x e 1x existe maior crescimento e menos inibição de alface. O solo sem contaminação por AFFF, entretanto, apresenta ainda assim maiores valores de crescimento.

5.3.3. Rúcula (*Eruca sativa*)

Após 120 horas de incubação no escuro foi observado que não houve germinação no ensaio CP para todos os tempos. Para as sementes de rúcula foram determinados a porcentagem de germinação (Figura 82) e os cálculos de inibição alongamento do hipocótilo e da raiz relativos ao controle negativo – CN (Figuras 83 e 84).

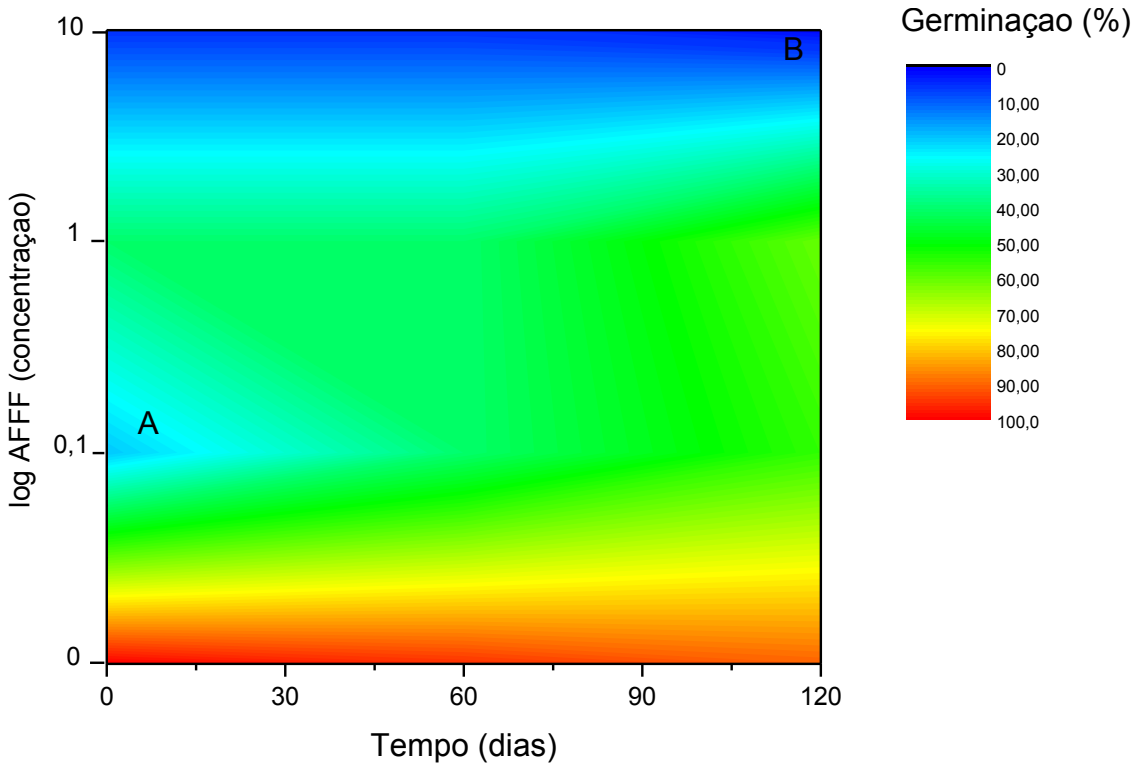


Figura 82 - Germinação de alface em AFFF em diferentes concentrações. A região A indica menor germinação na concentração de 0,1% no tempo inicial. A região de maior germinação na concentração 10x é indicada pela letra B. Fonte: Elaborado pelo autor.

Novamente, a germinação das sementes sem exposição à AFFF nos ensaios controle C0, C60 e C120 atingiu os valores mais altos, entre 90 e 100%. Isso pode ser observado ao longo de toda a região inferior da superfície de resposta da Figura 82.

Com exceção das regiões A e B (Figura 82), toda a superfície de resposta aproxima-se de uma relação linear entre concentração e germinação, em que a variável de tempo não afeta a germinação. Em outras palavras, a superfície de resposta obtida não conta com muita variação entre AFFF (y) e germinação (z) ocasionadas pelo tempo (x), sendo a germinação uma função quase exclusiva da concentração de AFFF (y).

Os bioensaios de toxicidade com sementes de rucula (Figura 82) se assemelham aos resultados obtidos sobre toxicidade de AFFF para alface (Figura 79). As amostras mais tóxicas foram aquelas com maior concentração de AFFF. A região B da superfície de resposta (Figura 82) mostra que o tempo é um fator responsável por diminuir a toxicidade de AFFF para rúcula, embora menos que o observado nos ensaios com alface (Figura 79). O aumento na germinação (e diminuição na toxicidade) ao longo do tempo foi menos pronunciado nas sementes de rúcula. Assim, a alface é um melhor bioindicador de toxicidade para as espumas de incêndio.

Curiosamente, os menores valores médios de germinação (Figura 82), crescimento (Figura 83) e inibição (Figura 84) são encontrados nos grupos com concentrações 0,1x, e não em 1x.

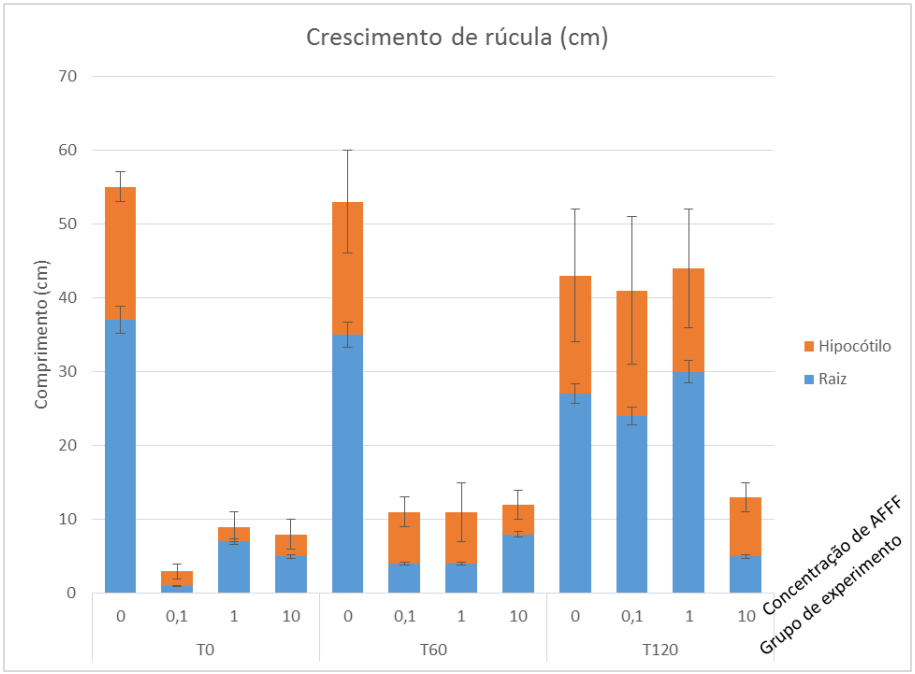


Figura 83 – Crescimento de rúcula em AFFF em bioensaios de toxicidade. Fonte: Elaborado pelo autor.

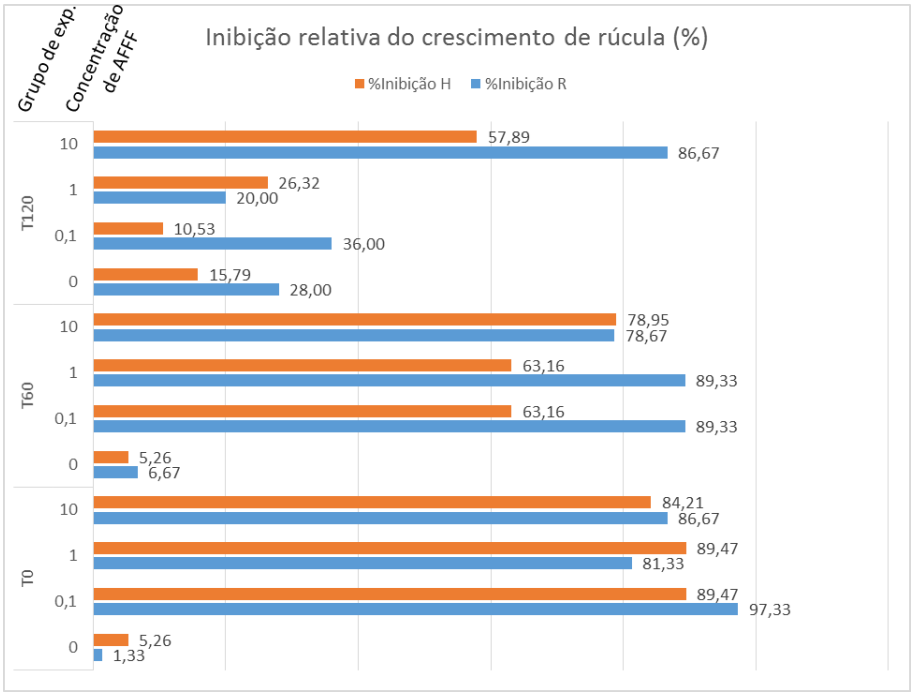


Figura 84 - Inibição relativa do crescimento de rúcula por AFFF em bioensaios de toxicidade. A palavra experimento foi abreviada para exp. para caber na Figura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ainda assim, os resultados com maior valor de crescimento (e menor inibição) correspondem aos ensaios de 120 dias.

Juntamente aos dados de alface foi confirmada a influência do tempo na diminuição da toxicidade da AFFF para a rúcula. Existe uma tendência ao aumento na germinação, indicando que o meio passa a ser mais favorável ao crescimento das sementes após 120 dias. A superfície de resposta para germinação (Figuras 79 e 82) indica isso com o alargamento na área verde e amarela (faixas intermediarias de germinação) no lado direito do gráfico.

5.3.4. Fito-toxicidade de AFFF e bioacumulação

Com relação à formulação total da AFFF, existem muitas referências sobre a baixa toxicidade do butil carbitol (JOHANSSON, 1988; STAPLES et al. 1998). Já a toxicidade de muitos compostos perfluorados para plantas é ainda desconhecida.

Com isso, é seguro atribuir a toxicidade observada nos bioensaios aos compostos perfluorados. Entretanto, não existem publicações com dados sobre fito toxicidade de AFFF e seus compostos para plantas para comparar com os resultados obtidos nos experimentos desse capítulo. A literatura carece de testes de toxicidade em plantas tanto na formulação original das espumas quanto os componentes individuais (PFAS ou fluortelomerados). Além disso, poucos trabalhos em toxicidade analisam componentes individuais, já que tanto a formulação quanto os metabólitos secundários de biotransformação dos PFCs ainda são pouco conhecidos.

Os resultados encontrados neste trabalho são parte de uma primeira iniciativa em demonstrar o efeito da AFFF em plantas. Mais estudos são necessários para delimitar a influência de AFFF no desenvolvimento de muitos outros organismos-teste.

Existe conhecimento, entretanto, sobre a bioacumulação desses compostos na cadeia alimentar, incluindo plantas (VAN ASSELT et al., 2011). Os dados obtidos nos bioensaios de toxicidade, demonstrados principalmente nas Figuras 79 e 82, indicam que, apesar da toxicidade inicial da AFFF liberada no ambiente, tanto alface quanto rúcula crescem em solo contaminado. Embora isso signifique algo bom, quanto à diminuição da toxicidade desses compostos ao longo do tempo (120 dias), para alface e rúcula, isso não significa que a baixa toxicidade esteja associada à biodegradação dos perfluorados no meio. Conforme discutido no capítulo 2 (Figura 66), o butil carbitol é a porção mais biodegradada, enquanto que as moléculas contendo várias ligações entre carbono e flúor, consideradas biologicamente inertes para esses organismos, entram nos tecidos dos organismos durante seu desenvolvimento e acumulam-se na cadeia alimentar por até 45 anos (CLARKE et al., 2010). Isso é preocupante, afinal é conhecido a mais de uma década que compostos fluorados orgânicos com propriedades bioacumulativas apresentaram toxicidade para organismos, incluindo mamíferos. (SCHULTZ et al., 2003).

Baseando-se no aumento da germinação de alface e rúcula, apesar da presença de alta concentração da AFFF no solo, combinados com a literatura sobre bioacumulação aqui discutidas, é proposto o esquema da Figura 85 sobre como acontece o processo de bioacumulação da AFFF.

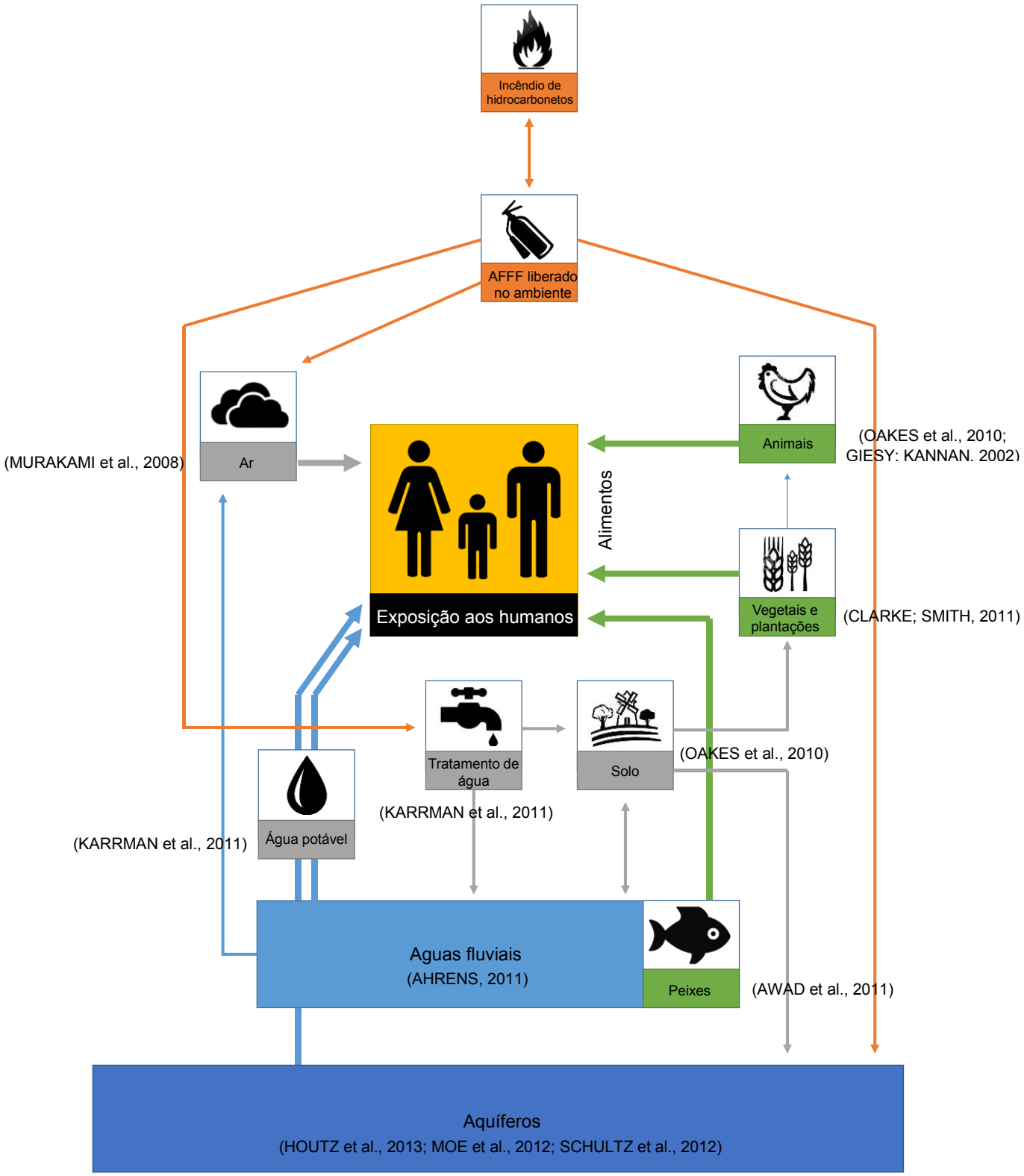


Figura 85 – Visão geral da bioacumulação da AFFF. As setas azuis representam as rotas associadas à agua, as setas verdes representam as rotas bióticas, as setas laranjas representam a liberação direta da AFFF e as setas em cinza representam fatores abióticos. Fonte: Elaborado pelo autor.

A baixa fitotoxicidade após 120 dias e potencial para bioacumulação em plantas aumenta a problemática da persistência desses compostos. A metodologia proposta nessa tese de fato não fez análises químicas nos tecidos vegetais para detecção de compostos bioacumulados. Entretanto, a bioacumulação dos PFCs da AFFF nos organismos-teste (rúcula e alface) é uma suposição provável.

Estudos relatam que esses PFCs persistentes estão amplamente distribuídos em animais. Sabe-se que a exposição a eles resulta em hepatotoxicidade, problemas no desenvolvimento, imunotoxicidade, efeitos hormonais adversos e potencial carcinogênico em animais (CLARKE et al., 2010; HÖLZER et al., 2008). Em um estudo recente por Lorber et al. (2015) foram encontrados até 19 $ng.mL^{-1}$ de compostos perfluorados (PFOA, PFOS, PFBA e PFHxA) no plasma sanguíneo humano. O grupo principal de PFCs inclui os PFOS, e já foi frequentemente detectado em produtos alimentícios em altas concentrações (FSA, 2009). A rota de exposição de humanos aos PFOS, no entanto, ainda não foi caraterizada (HALLDORSSON et al., 2008). A proposta é que ela ocorra conforme a Figura 85. Embora fontes não alimentares, como até mesmo partículas de poeira, possam conter PFCs (e levadas em consideração na Figura 85), o consumo através da alimentação é a causa de 98% da exposição humana aos fluorcarbonados (ERICSON et al., 2008; WILHELM et al., 2008; FROMME et al., 2009).

Por fim, todas as substâncias discutidas nos trabalhos sobre bioacumulação e toxicidade foram detectadas nas análises quantitativas do capítulo 1. Por isso, alerta-se para a falta de legislação rígida e controle sobre o uso, venda e descarte das AFFFs.

6. Capítulo 4

Metagenômica de Solo com AFFF

6.1. Introdução

O cultivo de microrganismos e técnicas independentes de cultivos são as metodologias que permitem explorar a diversidade microbiana presente no solo (KIRK et al., 2004). Atualmente, sabe-se que um grama de solo pode conter até 10^9 células microbianas, distribuídas em milhares de espécies distintas, em que apenas 0,1% a 10% possa ser cultivável (TORSVIK et al., 2002). Dessa maneira, a obtenção de informações sobre biodiversidade, ecologia, dinâmica e riqueza da comunidade microbiana, em determinado ambiente, pode ser conquistada por meio de técnicas independente de cultivo, sendo estas baseadas em métodos moleculares, os quais tem como principal objetivo a extração do DNA total deste ambiente, para posteriores análises (KIRK et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2011).

Estas novas metodologias aumentaram a capacidade de correlacionar os dados microbiológicos com os fatores físico-químicos, distância geográfica e cobertura vegetal, permitindo inferências mais robustas a respeito das comunidades microbianas (KIRK et al., 2004).

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como aquelas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), têm permitido a identificação destes organismos de forma independente da morfologia, e também de

forma independente de cultivo, levando a um maior conhecimento dos seres constituintes da microbiota (AVIO et al., 2009).

Desde o início do ano 2000, as técnicas moleculares com têm sido cada vez mais utilizadas para acessar diretamente toda o *pool* de microrganismos ambientais sem as limitações associadas com o cultivo em laboratório de cepas microbianas (EYERS et al. 2004). Apesar disso, o grupo dos procariotos permanece como o maior reservatório inexplorado de atividades enzimáticas na biosfera. Para aumentar o conhecimento sobre eles, técnicas de 'metagenômica' estão ganhando popularidade. Essas técnicas consistem na análise de toda uma comunidade em uma amostra ambiental, ao invés de cultivos de isolados individuais. Em outras palavras, o foco da metagenômica são os genomas totais de organismos que habitam um determinado ambiente. Isso mudou completamente o cenário anterior em que a análise orientada por função das capacidades biodegradante eram tipicamente baseadas na detecção visual do crescimento em meios seletivos, contendo poluentes como aceptor de elétrons, como única fonte de carbono ou na produção de metabólitos coloridos / marcados. O termo "metagenômica" também se refere a "genômica aleatórios de comunidade", isto é, o sequenciamento em larga escala de metagenomas ambientais com maior preocupação sobre a função dos genes das amostras, ao invés da taxonomia (GEORGE et al., 2011).

A metagenômica é considerada uma grande promessa para a biorremediação (COWAN et al., 2005; GABOR et al., 2007). De fato, ela permite o estudo de comunidades ambientais em toda a sua complexidade, o que inclui as interações entre os membros da comunidade. Frequentemente, atribuiu-se que a mineralização completa de um poluente requer intercâmbio metabólico entre espécies diferentes e, portanto, é realizado por consórcios bacteriana (JIMENEZ et al., 1991; SMIDT; DE VOS, 2004; ABRAHAM et al., 2002) em vez de uma única espécie. Mas, acima de tudo, a metagenômica tem o potencial de aumentar substancialmente a descoberta e caracterização das vias metabólicas bacterianas envolvidas na degradação de AFFF e compostos perfluorados, muitos dos quais ainda são desconhecidos.

A maioria das pesquisas sobre estes compostos têm sido tradicionalmente focada na avaliação da sua eficácia no auxílio de combate a incêndios, detecção, vias de degradação e persistência. Há relativamente pouca informação disponível sobre os potenciais efeitos ambientais nas comunidades microbianas de solo (GIMÉNEZ et al., 2004). Estes produtos químicos de combate a incêndios são usados

extensivamente em áreas naturais de elevado valor ambiental, e os dados disponíveis sugerem que existe um potencial significativo de danos à vegetação terrestre e aos ecossistemas aquáticos por alguns destes compostos (ADAMS; SIMMONS, 1999; LUNA et al., 2007). Há uma necessidade de quantificar o impacto de produtos químicos de combate a incêndios e verificar seus efeitos sobre a metagenoma do solo.

Medições baseadas na comunidade microbiana podem ser potencialmente úteis para a detecção de alterações na qualidade do solo, devido à aplicação de produtos químicos de combate a incêndios e, portanto, para avaliar a compatibilidade ambiental destes compostos e a assimilação pela microbiota local (PANKHURST et al., 1997). No entanto, apesar do uso intensivo de retardadores de fogo, surpreendentemente, não há nenhuma informação sobre os seus efeitos sobre a comunidade microbiana do solo. Estudos recentes realizados em zona húmida temperada têm mostrado que, sob condições de laboratório, a estrutura da comunidade microbiana de diferentes amostras de solo, pode ser afetada a curto prazo por uma espuma de incêndio com polímeros à base de acrílico e proteínas (BASANTA et al., 2003; DIAZ-RAVINA et al., 2006). Contudo, esses estudos anteriores abordaram outro tipo de espuma de incêndio (FP, descrita na Tabela 2), e não as AFFFs.

6.1.1. Motivação

Os produtos químicos de combate a incêndios podem induzir mudanças de médio a longo prazo nas comunidades microbianas do solo e, portanto, no funcionamento e qualidade do solo, fazendo com que que utilizações futuras da área sejam planejadas com cautela. Microrganismos do solo são os principais agentes responsáveis pela sustentabilidade a longo prazo dos ecossistemas do solo, uma vez que controlam a decomposição de matéria orgânica e, consequentemente, os fluxos e rendimentos de carbono no solo e nutrientes, por meio de processos de decomposição, mineralização e imobilização (NANNIPIERI et al., 2003). Mudanças em vários aspectos de microrganismos do solo (número, massa, atividade e diversidade) causados pelas atividades naturais ou humanas podem perturbar o funcionamento do ecossistema e levar à perda de qualidade do solo. Somado a isso, os parâmetros microbianos e alterações no perfil da comunidade de solo podem ser

usados como bioindicadores de sensibilidade do solo a mudanças induzidas por diferentes distúrbios e contaminantes.

Para entender o processo de alteração da microbiota nesta última etapa do estudo, verificou-se o efeito da aplicação das soluções de AFFF na alteração da estrutura de comunidade bacteriana de solo contaminado por compostos fluorcarbonados por PCR-DGGE.

6.2. Metodologia

Foram analisadas 25 amostras de solo. Três amostras no tempo inicial e outras doze no tempo final fazem parte do conjunto de amostras de solo submetidas às técnicas moleculares (Tabela 13). O solo preparado no capítulo 3, na seção 5.2.4 foi utilizado como amostra analisada. Foram avaliados para os tempos de 0 e 60 dias as amostras.

Tabela 13 - Amostras de solo para realização de análises moleculares

Tempo / **Amostra**	**Tempo inicial (identificação entre parênteses)**	**60 dias (identificação entre parênteses)**
Controle Solo	3 amostras (C0)	3 amostras (C60)
AFFF 0,1 x	---	3 amostras (0,1x)
AFFF 1x	---	3 amostras (1x)
AFFF 10x	---	3 amostras (10x)

(Elaborado pelo autor)

6.2.1. Local de estudo

A simulação de solo contaminado por petróleo e AFFF foi feita no Jardim Experimental do campus da UNESP – Rio Claro.

Os procedimentos de biologia molecular foram realizados em conjunto com o Prof. Dr. Fernando Dini Andreote no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo (ESALQ / USP), Piracicaba-SP.

6.3. Metagenômica por gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE)

De um ponto de vista prático, a riqueza de dados produzidos de estudos metagenomica identifica traços funcionais em comunidades microbianas que conferem robustez a poluição e / ou capacidade de biodegradação, permitindo, portanto, a distinção entre áreas contaminadas, onde a atenuação natural é suficiente a partir de locais onde biorremediação ativa é necessária. Atualmente, diversas

metodologias são desenvolvidas para estudo da comunidade microbiana no ambiente, sendo o ponto de partida a extração do DNA e / ou RNA total diretamente das amostras ambientais (SINGH et al., 2006; ANDREOTE et al., 2009). Metodologias conhecidas como *fingerprint* estudam a estrutura da comunidade, a partir de um perfil de produtos de amplificação por PCR, que podem ser diferenciados a partir de alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C), por meio de uma metodologia intitulada gel de eletroforese em gradiente desnaturante – DGGE (MUYZER et al., 1993).

Fragmentos de DNA de cadeia dupla com o mesmo comprimento mas diferentes pares de base podem ser separados num gel de poliacrilamida, que tem um gradiente linear de produtos químicos de desnaturação: ureia e formamida (electroforese em gel de gradiente desnaturante, DGGE). Os fragmentos de DNA migram no gel, até que sejam parcialmente desnaturados. A separação de fragmentos de DNA ocorre com o uso de um grampo GC, que é uma longa sequência rica em guanina (G) e citosina (C) incorporada a um dos *primers*.

A desnaturação de uma sequência rica em GC é muito mais difícil do que a do resto da sequência e, por conseguinte, os fragmentos de DNA são apenas parcialmente desnaturados no gel. A diferença na tendência desnaturação dos compostos ricos em GC contra regiões ricas em AT é causada pela diferente quantidade de ligações de hidrogênio que mantêm as bases em conjunto (Figura 86).

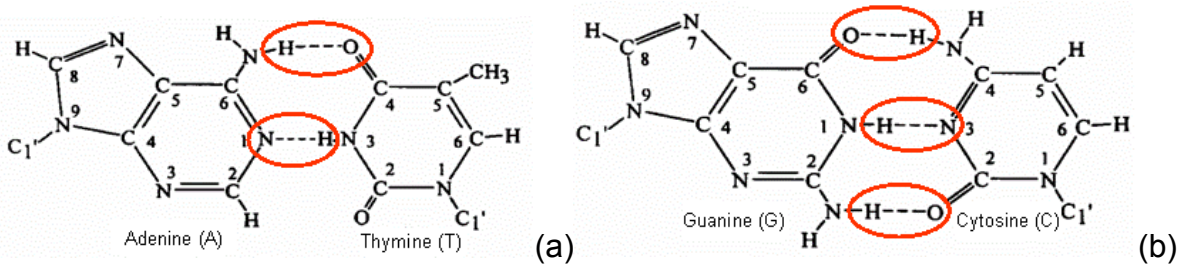


Figura 86 - Pares de base adenina-timina (a) e guanina-citosina (b). As pontes de hidrogênio são mostradas dentro dos círculos em vermelho. Fonte: Reproduzido de Kaksonen (2014).

O número de fragmentos no gel DGGE indica a diversidade na comunidade microbiana. Os fragmentos de DNA em géis de electroforese podem, posteriormente, ser sequenciados. Para este fim, os fragmentos são cortados do gel, re-amplificado, purificado a partir de *primers* e, em seguida, sequenciados. Neste estudo, contudo,

apenas foi analisada a variedade dos perfis microbianos de solo. A abordagem adotada foi para determinar a associação das bandas de DGGE para as principais subclasses filogenéticas. A Figura 87 mostra uma visão geral dos passos do protocolo de DGGE.

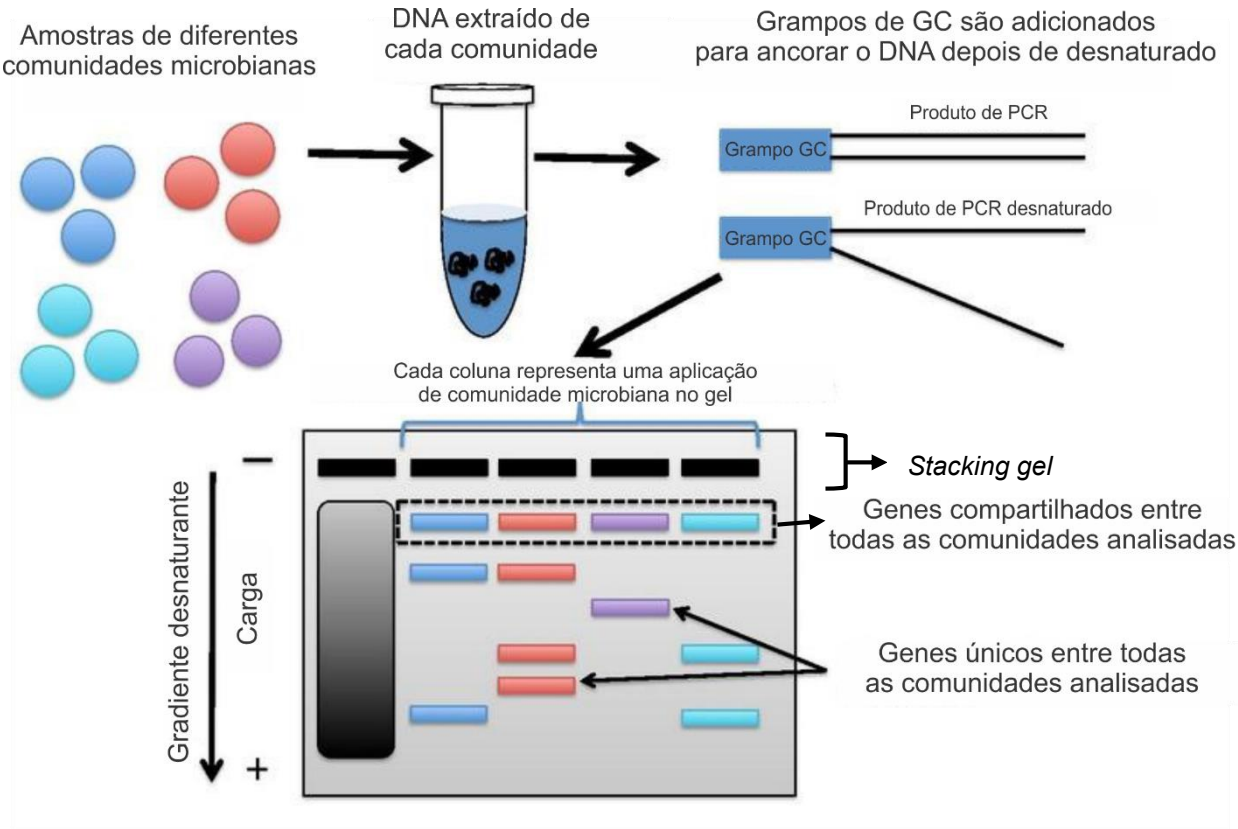


Figura 87 – Visão geral da técnica de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE). Fonte: Traduzido de Kaksonen (2014).

Na análise dos resultados obtidos por PCR-DGGE, verifica-se que cada banda identificada no gel representa um grupo de microrganismo com a mesma sequência de nucleotídeos ou sequências similares com o mesmo comportamento de desnaturação (SINGH et al., 2006). Essa técnica é adequada na comparação de duas ou mais comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 2003). No caso das amostras apresentarem padrões de bandas distintos no gel, certamente as comunidades analisadas são diferentes entre si (BOON et al., 2000).

6.3.1. Extração de DNA total das amostras de solo

As amostras de solo para a análise foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial *PowerSoil® DNA Isolation* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em balança semi analítica, foi pesado 0,400 g de cada amostra e adicionado em tubos *PowerBead* de 2,0 mL. Foram adicionados 60 µL da solução C1, invertendo o tubo várias vezes, e, posteriormente, foi agitado em agitador de tubos na velocidade máxima por 10 minutos e centrifugado a 10.000 g por 30 segundos. O sobrenadante, de aproximadamente 450 µL, foi transferido para um novo tubo, adicionado 250 µL da solução C2, agitado por 5 segundos e incubado a 4ºC por 5 minutos. Transcorrido este período, centrifugou-se a 10.000 g por 1 minuto e então 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 200 µL da solução C3, seguido com agitação por 5 segundos e incubação a 4ºC por 5 minutos. Logo após, centrifugou-se a 10.000 g por 1 minuto e transferiu-se 750 µL do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 µL da solução C4, agitou-se por 5 segundos, carregou-se 675 µL da solução no tubo contendo a coluna e, então, centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 g. A solução coletada no tubo foi descartada e 675 µL foi carregado na coluna e centrifugado por 1 minuto a 10.000 g. A solução coletada no tubo foi novamente descartada e o restante foi aplicado na coluna, centrifugado da mesma maneira que nas condições anteriores. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 g por 30 segundos; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 minuto a 10.000 g. Realizada esta etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo com a adição de 100 µL da solução C6 no centro da coluna. Por fim, estes tubos foram centrifugados por 30 segundos a 10.000 g e obteve-se o DNA extraído das amostras de solo.

O resultado das extrações foi avaliado por meio de uma alíquota de 5 µL do DNA extraído, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), corado com *GelRed* (Biotium Inc., Hayward, CA) em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA). A corrida das amostras no gel foi realizada em campo elétrico de 80 V, por aproximadamente 30 minutos. Utilizou-se como marcador padrão de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o gel foi, posteriormente, visualizado e fotografado em luz UV.

6.3.2. Amplificação de genes específicos do DNA extraído por PCR

A metodologia de PCR, seguida por DGGE, foi aplicada a fim de comparar a diversidade e a estrutura das comunidades bacteriana e fúngica em função dos diferentes tratamentos do solo contaminado. O procedimento baseou-se no estudo de Haichar et al. (2008), com adaptações. O DNA extraído das treze amostras de solo foi submetido a reações de PCR para amplificação de genes-alvo específicos a partir de *primers* e condições descritas na Tabela 14, utilizando termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Tabela 14 - Lista de *primers* utilizados para amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total

Primer	**Sequência (5'-3')**	**Alvo**	**Referência**
1492R	ACC.TTG.TTA.CGA.CTT	Gene 16S DNAr	LANE et al., 1991
27F	AGA.GTT.TGA.TCM.TGG.CTC.AG	Gene 16S DNAr	LANE et al., 1991
1387R	CGG.TGT.GTA.CAA.CCG.GGA.ACG	Gene 16S DNAr	HEUER et al., 1997
968-GC	GCG.CCG.GGG.AGC.GCC.CCG.GGC.GGG. GCG.GGG.GCA.CGG.GGG.GAA.CGC.GAA.G	Gene 16S DNAr	HEUER et al., 1997

(Adaptado de referências; elaborado pelo autor)

A amplificação do gene 16S DNAr, para o grupo de Bactéria, foi realizada com os *primers* 1492R e 27F, a partir do seguinte ciclo: desnaturação inicial de 4 minutos a 94ºC; seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94ºC, 1 minuto a 63º C, 1 minuto a 72ºC; e uma extensão final de 10 minutos a 72ºC; resultando em 25 µL de produto de PCR (Tabela 15). Na segunda reação para o grupo de Bactéria, utilizaram-se os *primers* 1387R e 968-GC e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial de 4 minutos a 94ºC; seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 56ºC, 2 minutos a 72ºC; e uma extensão final de 10 minutos a 72ºC; resultando em 50 µL de produto de PCR (Tabela 16).

Tabela 15 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR

PCR1 - Bactéria	**Concentração final**	**Volume por reação (µL)**	**Volume total (µL)**
Água Milli-Q		14,15	**212,3**
Amostra		**2,00**	
PCR buffer	1X	2,50	**37,5**
$MgCl_2$	3,75 mM	3,75	**56,3**
BSA	100,00%	0,25	**3,8**
dNTPs	0,20 mM	2,00	**30,0**
forward primer	0,20 $pmol.\mu l^{-1}$	0,05	**0,8**
reverse primer	0,20 $pmol.\mu l^{-1}$	0,05	**0,8**
Taq polimerase	0,05 $U.\mu l^{-1}$	0,25	**3,8**
Total		**25**	**345,0**

(Elaborado pelo autor)

Tabela 16 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR

PCR2 - Bactéria	**Concentração final**	**Volume por reação (µL)**	**Volume total (µL)**
Água Milli-Q		33,60	**504,0**
Amostra		**1,00**	
PCR buffer	1X	5,00	**75,0**
$MgCl_2$	2,50 mM	5,00	**75,0**
Formamida	100,00%	0,50	**7,5**
dNTPs	0,20 mM	4,00	**60,0**
forward primer	0,40 $pmol.\mu l^{-1}$	0,20	**3,0**
reverse primer	0,40 $pmol.\mu l^{-1}$	0,20	**3,0**
Taq polimerase	0,05 $U.\mu l^{-1}$	0,50	**7,5**
Total		**50**	**735,0**

(Elaborado pelo autor)

Após a obtenção dos *amplicons*, os produtos da PCR (segunda reação) foram avaliados em gel de agarose 1,2% (m/v), seguido de coloração em brometo de etídeo com visualização e registro fotográfico em luz UV (Figura 88).

Figura 88 – Equipamento para registro fotográfico do gel de agarose em lux UV.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3.3. Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE

As análises de DGGE foram efetuadas com o *phorU2 system* (Ingeny, Leiden, Holanda) em um gel de poliacrilamida 6,0%, com um gradiente de desnaturação de 45-65% para as bactérias de solo (Figura 89).

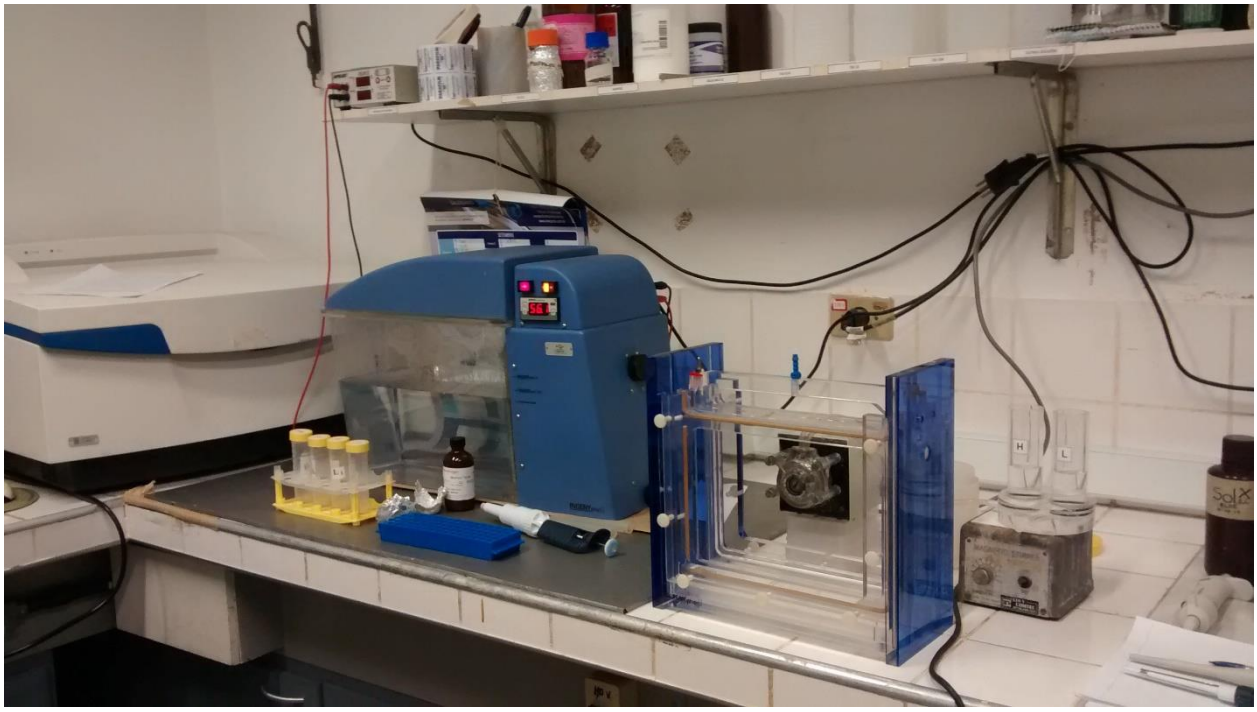


Figura 89 – Equipamento para eletroforese em gel de DGGE. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o preparo do gel, os respectivos gradientes de 45% (*Low*) e 65% (*High*) foram realizados misturando-se as soluções A (0%, acrilamida 6,0%) e B (80%, acrilamida 8,0%, ureia 5,6 M e formamida deionizada 32%), além de 75 µL de persulfato de amônia (APS) 20% e 12 µL de TEMED, em cada uma das soluções. Em seguida, as soluções foram utilizadas na montagem do gel com auxílio de bomba misturadora; e, após 50 minutos, o *stacking gel* foi confeccionado a partir de 7 mL da solução A, 45 µL de APS 20% e 10 µL de TEMED, sendo aguardado mais 60 minutos para sua polimerização. Assim, foram aplicados no gel 8,0 µL do produto de PCR, juntamente com 3,0 µL de tampão de carregamento.

As condições da eletroforese foram de 60ºC por 16 horas a 90 V em tampão TAE 0,5 x. Realizado este passo, o gel de poliacrilamida com as amostras foi corado com *SYBR-gold* (Invitrogen, Breda, Holanda) em TAE 0,5 x no escuro por 120 minutos. As imagens resultantes forma usadas para conversão em matrizes de bandas com o software IMAGEQUANT TL UNIDIMENSIONAL - Amersham Biosciences, Amersham, UK, v.2003 (McCaig et al. 2001).

6.3.4. Análises estatísticas

Os *software* PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001) e CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) foram utilizados para a análise dos dados, utilizando como matriz de similaridade o algoritmo de Bray Curtis.

Para avaliar a similaridade entre os grupos observados também foram realizados os métodos multivariados de Análise de Coordenadas Principais (da sigla em inglês *Principal Coordinates Analysis*, PCoA). A PCoA fundamenta em um mapeamento linear da distância ou diferenças entre os grupos para o espaço de ordenação, ou seja, para a projeção no espaço cartesiano. Neste sentido, utiliza-se um algoritmo a fim de explicar a maior parte da variação no conjunto de dados obtidos. Logo, os conjuntos de dados de cada amostra são representados como pontos no espaço. A análise também fornece valores que estabelece o quanto de variação é explicada em cada eixo (RAMETTE, 2007).

Calcula-se o coeficiente de correlação entre as posições correspondentes nas matrizes de pontos, e avalia-se seu significado baseado nas permutações das amostras em uma das matrizes (RAMETTE, 2007). Para tal, foram utilizados os algoritmos de Bray-Curtis e Euclidiano para as matrizes de DGGE. Em ecologia microbiana é bastante utilizado com o intuito de testar as relações entre matrizes de distância moleculares e de dados geográficos para um mesmo conjunto de organismos ou de se relacionar diversidade comunidade a heterogeneidade ambiental (PARKER; SPOERKE, 1998; CHO; TIEDJE, 2000; HORNER-DEVINE et al., 2004; SCORTICHINI et al., 2006).

6.4. Resultados e Discussões

6.4.1. Extração de DNA e PCR

A extração de DNA das amostras de solo, descritas em 6.3.1., foi feita pelo kit comercial PowerSoil® DNA Isolation, funcionou após ajustes de concentração e diluições da amostra inicial.

O resultado das extrações foi avaliado por meio de uma alíquota de 5 µL do DNA extraído, submetida à eletroforese em gel de agarose corado com GelRed (Figura 90).

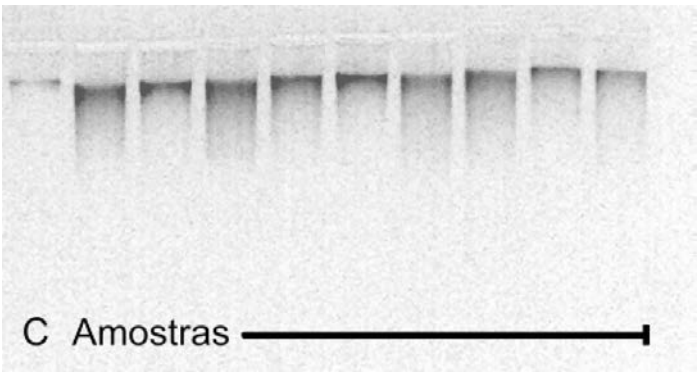


Figura 90 – Eletroforese da extração de DNA de solo em gel de agarose (C: controle sem solo). Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de rastro no gel indica sucesso na extração de DNA do solo nas amostras analisadas.

As reações de PCR (primeira – 16S, segunda – região de variabilidade 16S) também ocorreram e produziram a quantidade necessária de produto (Figura 91), para a aplicação posterior em análise metagenomica no gel de poliacrilamida pela técnica de DGGE. Não foi observada contaminação por DNA, conforme ausência de bandas no ensaio C (Controle).

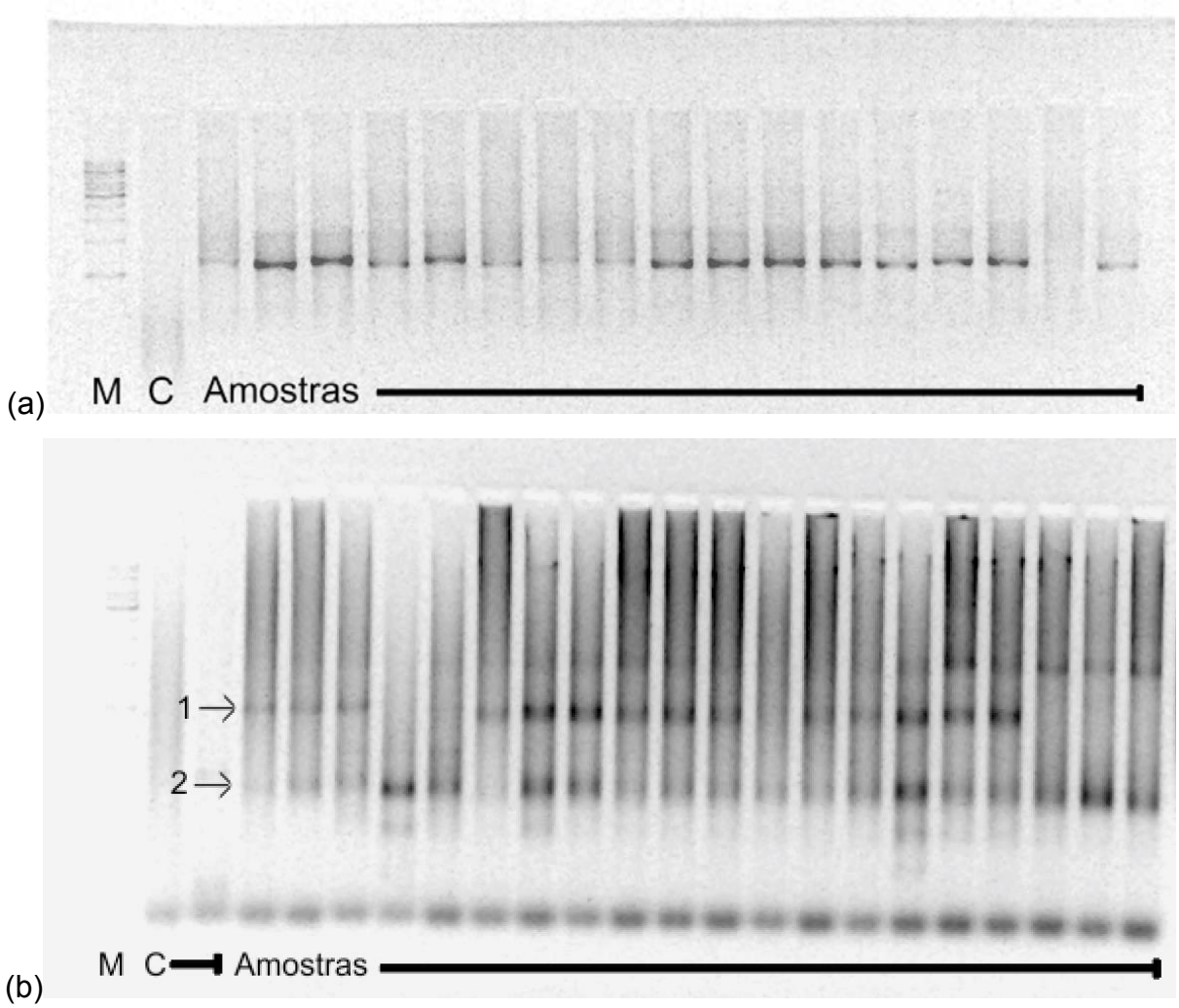


Figura 91 - Eletroforese da primeira reação de PCR (a) e da segunda reação de PRC (b) em gel de agarose (C: controle, M: marcador molecular Gene Ladder para 1000 kb). As setas indicam as bandas de produtos da primeira reação de PCR (1) em excesso e produtos da segunda reação de PCR (2). Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de 2 bandas no gel de agarose observada na Figura 91 indica que a amplificação do DNA pelos *primers* utilizados funcionou. A banda 2, por sua vez, é mais importante, pois será expandida pela técnica de DGGE e verificada a metagenômica da comunidade do solo pela divisão em grupos de diversidade. A formação dessa banda foi observada em todos os ensaios. A banda 1 corresponde ao excesso de *amplicons* da primeira reação de PCR e não interfere nos passos subsequentes da técnica de DGGE.

6.4.2. Análise da estrutura da comunidade microbiana por DGGE

As imagens dos géis de DGGE foram analisadas conforme a presença de bandas em cada amostra (MCCAIG et al., 2001). Abaixo, estão apresentados os padrões de bandas para bactéria (Figura 92).

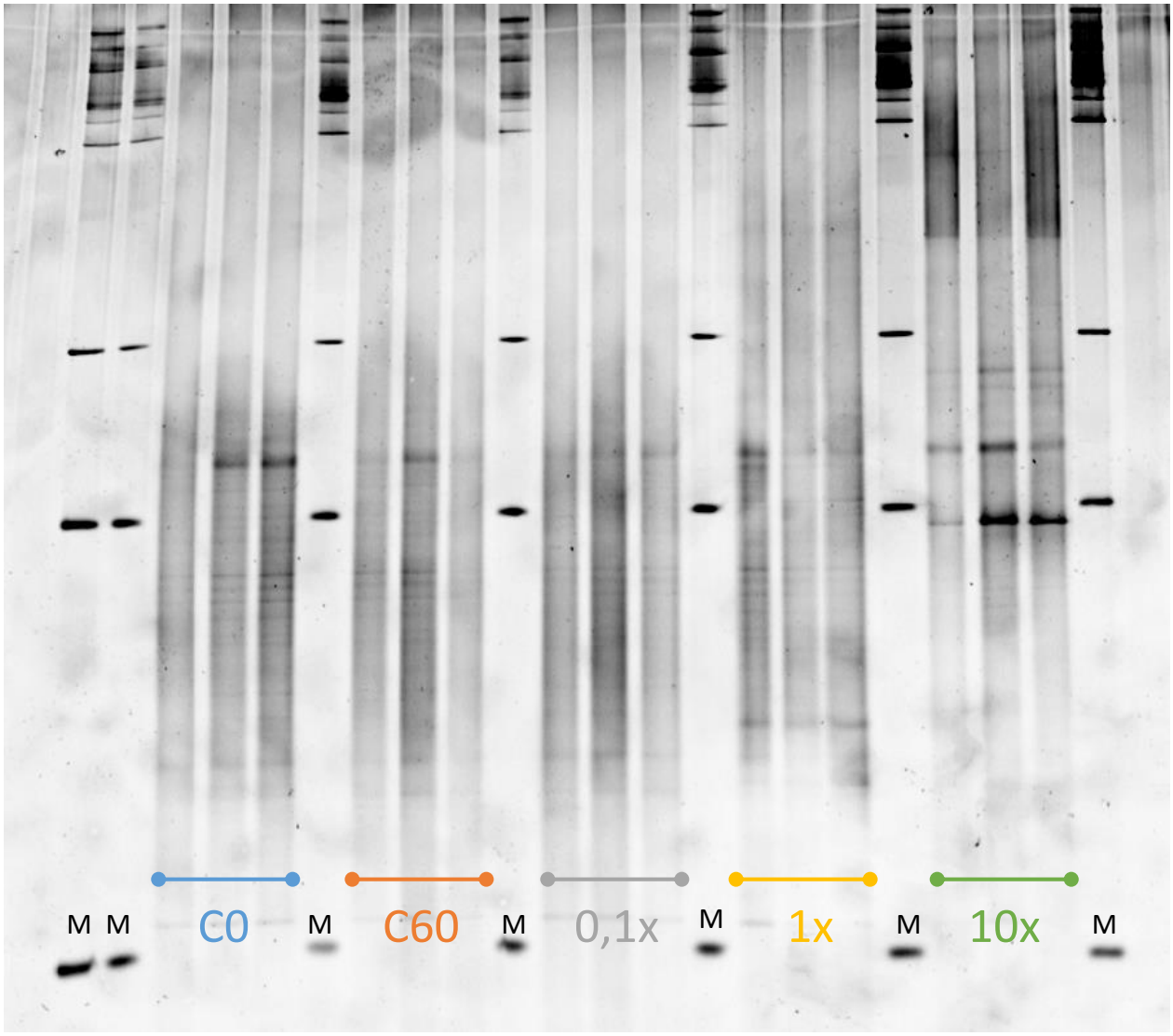


Figura 92 - *Amplicons* do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Poliacrilamida 6,0%; gradiente desnaturante 45-65%; TAE 0,5 x; 60º C; 90 volts; 16 horas (M: marcador molecular Gene Ladder para 1000 kb, C0: controle sem AFFF no tempo inicial, C60: controle sem AFFF após 60 dias, 0,1x, 1x e 10x: amostras com concentrações diferentes de AFFF). Fonte: Elaborado pelo autor.

A janela de gradiente desnaturante escolhida permitiu a observação de bandas nas amostras, conforme indicado na Figura 93. Cada banda representa um grupo de bactérias semelhantes. A quantidade e a posição das bandas no gel foram obtidas em resolução suficiente para definir o perfil da comunidade microbiana de solo.

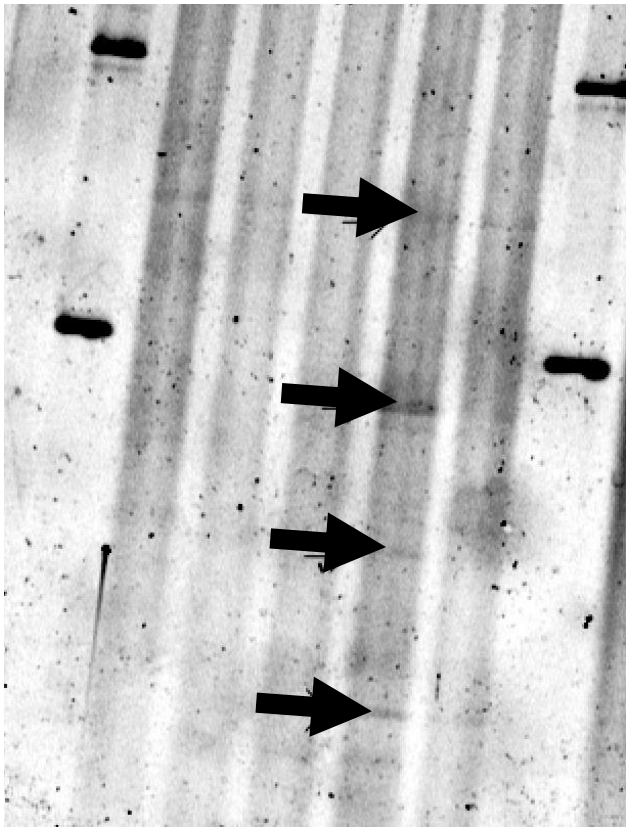


Figura 93 – Detalhe dos a*mplicons* do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Cada uma das setas indica bandas de grupos específicos de bactérias encontrados no solo contaminado por hidrocarbonetos e AFFF. Fonte: Elaborado pelo autor.

As bandas significam grupos individuais de microrganismos na amostra contaminada por hidrocarbonetos e AFFF. Ao comparar bandas diferentes entre amostras é possível determinar a influência de um tratamento (no caso, contaminação por petróleo ou AFFF) na variabilidade de grupos na microbiota de solo.

As análises multivariadas de PCoA realizadas com as imagens de DGGE foram então aplicadas ao grupo de bactéria (Figura 94).

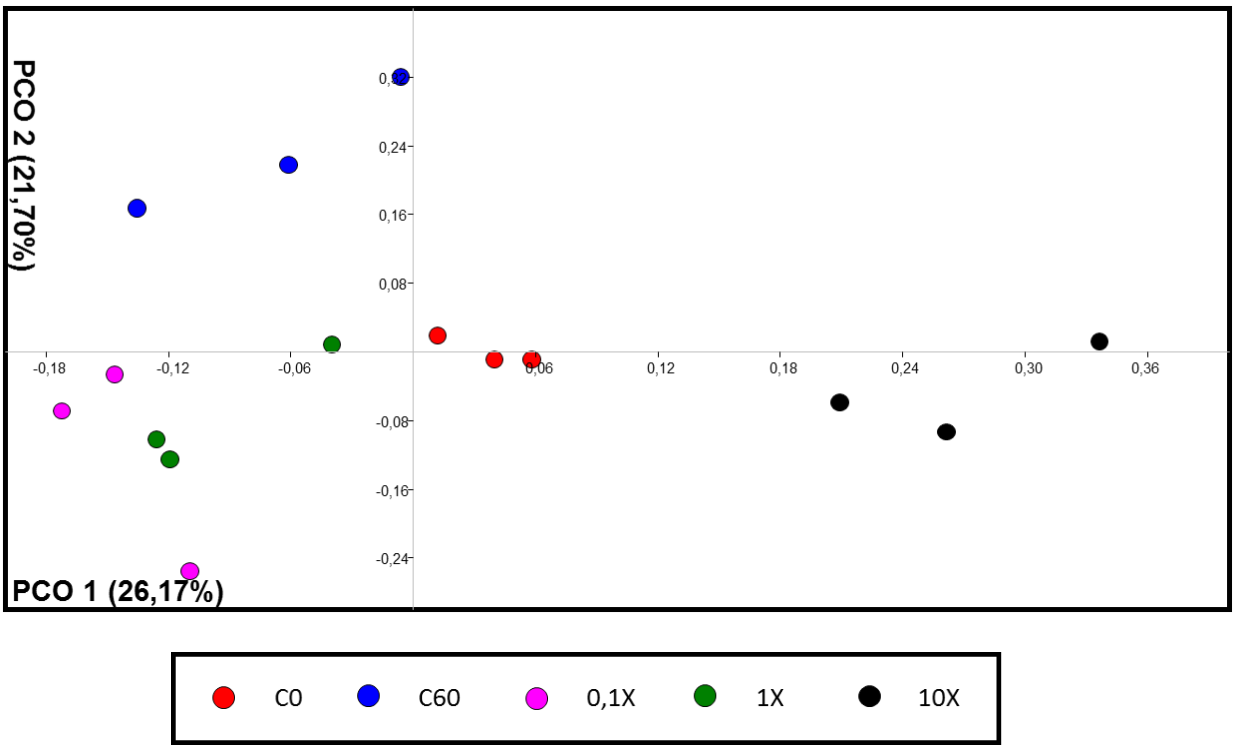


Figura 94 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos grupos formados com base na análise de DGGE, para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 94, está apresentada a análise coordenadas principais (PCoA) para as bactérias da comunidade de solo. Para melhor visualização e compreensão, as amostras foram agrupadas em conjuntos de cores, de acordo com suas distâncias no plano e com sua representatividade.

Foi utilizado o algoritmo Bray-Curtis para explicar a variação no conjunto de dados obtidos. A variação entre amostras foi de 82,41%.

Na interpretação da PCoA (Figura 94), considera-se a regra do cosseno baseada no eixo central. Assim, quando o ângulo entre os pontos com o eixo central (x, y = 0) for menor que 90º, estas amostras apresentam correlação positiva (ângulo 0º = +1). Em ângulos maiores que 90º, a correlação entre elas é negativa (ângulo 180º = -1). Por fim, quando existe um ângulo reto entre os pontos com o eixo central, as amostras não possuem correlação entre si – neutro (ângulo 90º = 0). Também, a posição e agrupamento dos pontos nas coordenadas do plano indicam proximidade e similaridade entre elas.

As amostras de solo no tempo inicial (Controle C0) ocupam posição central no plano da PCoA. As amostras, em geral, encontram-se distribuídas ao longo do plano, mas as triplicatas encontram-se agrupadas entre si. É possível identificar *clusters*, ou agrupamentos de dados e inferir sobre a maneira com que a comunidade microbiana variou ao longo do tempo.

Partindo do tempo inicial, observou-se nos ensaios controle C60 que, após 60 dias, a microbiota tende a uma variação natural. Existe um *cluster* de amostras C60 no quadrante superior esquerdo da PCoA. Esta variação independe da contaminação por AFFF e pode ser associada a mudanças sazonais do solo, por exemplo.

A mesma variação foi observada com a adição de AFFF nas comunidades microbianas de solo. O uso de concentrações mais baixas (0,1x e 1x) de AFFF causou uma diferenciação do perfil de bactérias no solo diferente do controle inicial (C0) e da evolução natural da comunidade em 60 dias (C60). Observou-se um cluster no quadrante inferior esquerdo. Isso indica que a presença de AFFF em baixas e médias concentrações afeta a comunidade microbiana do solo. Este resultado corresponde à conclusão de Andreoni et al. (2004), que afirma que a microbiota é muito sensível, mesmo a baixa concentração de um contaminante e, portanto, responde rapidamente à perturbação no ambiente.

No caso de concentrações altas de AFFF em solo foram notadas maiores mudanças na comunidade bacteriana de solo. De fato, é possível observar até mesmo no gel de eletroforese (Figura 92) a grande diferença no padrão de bandas. Na análise de PCoA, os pontos mais distantes da comunidade original do controle C0 está agrupado à extrema direita do gráfico (Figura 94). Deste modo, a comunidade bacteriana sofreu muita alteração em sua estrutura, em função da presença do poluente.

O novo perfil microbiano é possivelmente melhor adaptado para metabolizar o contaminante em altas concentrações, indicando que, apesar dos compostos fluorcarbonados serem em grande parte inertes, a formulação total da AFFF, distribuída comercialmente, afeta a comunidade de solo. Assim, a AFFF promove um desequilíbrio na comunidade edáfica com o favorecimento de algumas populações microbianas em detrimento de outras (LLADÓ et al., 2012), conforme observado no capítulo 1 pelas diferentes especializações de solo A, B e Controle na biotransformação dos perfluorados de AFFF Ansul.

Poucos mecanismos enzimáticos da biodegradação de AFFF foram esclarecidos pela literatura recente. Ainda não existem estudos de diversidade genética ou perfil fisiológico de comunidades de solo contaminados por AFFF assim como os encontrados para pesticidas, agrotóxicos ou muitos outros poluentes. Existe apenas um estudo por Barreiro et al. (2010), que aponta para mudanças em longo prazo na biomassa de solos contaminados por espumas de incêndio. A abordagem dos dados desta tese, embora não conclua sobre a taxonomia do solo, permite, entretanto, algumas inferências. É provável que microrganismos dahalogenantes sejam os principais grupos capazes de se desenvolver em comunidades contaminadas por compostos perfluorados e o crescimento desses microrganismos seja responsável pela mudança nos perfis de solo observados na Figura 94. Bactérias como *Dehalococcoides etanogenes* (YUJIE et al., 2013), *Pseudomonas* sp. 2CBS (FETZNER et al. 1998), *Sphingomonas chlorophenolica* (XUN; ORSER 1991), *Mycobacterium chlorophenolicum* (UOTILA et al. 1992) e *Sphingomonas paucimobilis* (NAGATA et al., 1993) podem ser predominantes em um novo perfil de comunidade microbiana observado em solos contendo AFFF em nível de contaminação 10x.

O conhecimento das comunidades microbianas presentes no ambiente contaminado revela-se ser uma importante ferramenta na determinação das estratégias a serem adotadas para a biorremediação *in situ* (ROS et al., 2010; SUN et al., 2012). Compreender como a biorremediação influencia a diversidade da comunidade microbiana do solo torna-se um passo crucial para um melhor conhecimento sobre o comportamento e função dessas populações

Desta forma, o uso de solo contaminado (para ocupação humana ou produção de alimento) pode levar, além dos riscos toxicológicos, a interferência de novos grupos de microrganismos. O novo perfil microbiano induzido pela contaminação por AFFF poderia inviabilizar o uso de áreas, como por exemplo pelo favorecimento de microrganismos patógenos ou pela queda da produtividade agrícola.

7. Conclusões

Neste estudo foram avaliados os efeitos da co-contaminação das AFFFs com hidrocarbonetos, sob diversas abordagens, que permitiram concluir:

- A microbiota de locais contaminados com AFFF são capazes de metabolizar substratos contendo contaminação por AFFF e BTEX;
- A principal rota metabólica de biotransformação da formulação de AFFF Ansul produz principalmente 6:2 FtS e PFHxA, a partir de precursores 6:2 FtTAoS;
- O metabolismo de biotransformação de PFCs ocorre somente em condições aeróbias, assim como a biodegradação de BTEX;
- A presença de BTEX em ensaios aeróbios de co-contaminação com AFFF Ansul gerou produtos intermediários de biotransformação alternativos, que podem indicar a formação de novos compostos desconhecidos, cujos métodos de detecção não foram descritos;
- A biodegradação de BTEX é menos eficiente na presença de AFFF, apesar da propriedade surfactante desses compostos. Isso ocorre pela competição com o butil carbiol como substrato da comunidade microbiana;
- A observação de processos de biotransformação não ocorreu em anaerobiose;
- A presença de AFFF Sintex promoveu maior rendimento de CO_2 em ensaios respirométricos contendo gasolina em solo;
- A fito-toxicidade de AFFF para rúcula e alface é alta, aumentando em função da concentração e diminuindo em função do tempo de exposição ao ambiente;
- A contaminação do solo por AFFF induz mudanças metagenômicas no perfil de comunidade bacteriano encontrado.

7.1. Considerações finais

Os dados deste trabalho apresentaram uma série de consequências, quanto à liberação do AFFF no contexto de incêndios na indústria petroquímica. A liberação de compostos persistentes deve ser evitada. Entretanto, o contexto dessa liberação é o de situações de emergência, em que vidas e patrimônio estão em risco. Desta forma, apesar de todas as recomendações, é muito importante realçar o bom senso sobre prioridades, em que a remediação ambiental deve ser colocada em segundo plano, quando a segurança de seres humanos pode ser comprometida. Não foi feita aqui a proposta de preservar o ambiente em detrimento de vidas. Afinal, por esse motivo, existem técnicas de biorremediação: recuperar áreas degradadas após a liberação de contaminantes. Contudo, apenas com o conhecimento preciso do comportamento ambiental das AFFFs, apresentadas neste trabalho e em outros na literatura, que protocolos otimizados e potencialmente menos danosos ao ambiente podem ser futuramente elaborados.

8. Referências Bibliográficas

3M (3M Company). **Material Safety Data Sheet for FC-95 Fluorad Brand Fluorochemical Surfactant**. St. Paul: 3M Company, 1999.

AAP (America Associate Press). 2009. **Montara platform and West Atlas rig on fire**. The West Australian. Disponível em: https://au.news.yahoo.com/thewest/a/6415320/montara-platform-and-west-atlas-rig-on-fire/. Acesso em 8 de janeiro de 2015.

AAP (America Associate Press). 2012. **Venezuela battles refinery tank fire for a third day**. Chicago tribune. Disponível em: http://articles.chicagotribune.com/2012-09-21/news/sns-rt-venezuela-refinery-pix-tvl1e8kldbu-20120921_1_oil-refinery-amuay-pdvsa. Acesso em 8 de janeiro de 2015.

ABBASI, T.; ABBASI, S. A. The expertise and the practice of loss prevention in the Indian process industry—some pointers for the third world. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 83, n. 5, p. 413–420, 2005.

ABNT. **Líquido Gerador de Espuma de Película Aquosa (AFFF) à 3% para Uso Aeronáutico**. Norma NBR 11830. Brasil: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1993.

ABNT. **Sistema de Combate a Incêndio por Espuma**. Norma NBR 12615. Brasil: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1992.

ABRAHAM, W. R.; NOGALES, B.; GOLYSHIN, P. N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 246–253, 2002.

ADAMS. R.; SIMMONS, D. Ecological effects of fire fighting foams and retardants: a summary. **Australian Forestry**, v. 62, n. 4, p. 307–314, 1999.

ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**. New York: Interscience Publishers, 1960.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS Concepts Guide**. Santa Clara: Agilent Technologies, 2013.

AHRENS, L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 1, p. 20-31, 2011.

AHRENS, L.; NORSTRÖM, K.; VIKTOR, T.; COUSINS, A.P.; JOSEFSSON, S. Stockholm Arlanda Airport as a source of per- and polyfluoroalkyl substances to water, sediment and fish. **Chemosphere**. *Publicação pendente*, 2015.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 2nd ed. London Academic Press, 1999.

ALM, R. R.; STERN, R. M. **Aqueous Film-Forming Foamable Solution Useful as Fire Extinguishing Concentrate**. U.S. Patent 5085786, 1992.

AL-MUTAIRI, N.; BUFARSAN, A.; AL-RUKAIBI, F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 142-148, 2008.

AMUND, O. O.; ADEBIYI, A. G. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. **Tribology International**, v. 24, n. 4, p. 235–237, 1991.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 401–412, 2004.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.

ANKLEY, G. T.; KUEHL, D. W.; KAHL, M. D.; JENSEN, K. M.; LINNUM, A.; LEINO, R. L.; VILLENEUVE, D. A. Reproductive and developmental toxicity and bioconcentration of perfluorooctanesulfonate in a partial life-cycle test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 316–2324, 2005.

AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 242-253, 2009.

AWAD, E.; ZHANG, X. M.; BHAVSAR, S. P.; PETRO, S.; CROZIER, P. W.; REINER, E. J.; FLETCHER, R.; TITTEMIER, S. A., BRAEKEVELT, E. Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 19, p. 8081-8089, 2011.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1999.

BACKE, W. J.; DAY, T. C.; FIELD J. A. Zwitterionic, Cationic, and Anionic Fluorinated Chemicals in Aqueous Film Forming Foam Formulations and Groundwater from U.S. Military Bases by Non-aqueous Large-Volume Injection HPLC-MS/MS. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 5226-5234, 2013.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.

BAO, J.; JIN, Y.; LIU, W.; RAN, X.; ZHANG, Z. Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. **Chemosphere**, v. 77, n. 5, p. 652–657, 2009.

BARBARO, J. R.; BARKER, J. F.; LEMON, L. A.; MAYFIELD, C. I. Biotransformation of BTEX under anaerobic denitrifying conditions: field and laboratory observations. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 11, n. 3, p. 245–272, 1992.

BARBER, J. L.; BERGER, U.; CHAEMFA, C.; HUBER, S.; JAHNKE, A.; TEMME, C.; JONES, K.C. Analysis of perand polyfluorinated alkyl in air samples from Northwest Europe. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, n. 6, p. 530-541, 2007.

BARREIRO, A.; MARTÍN, A.; CARBALLAS, T.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Response of soil microbial communities to fire and fire-fighting chemicals. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6172–6178, 2010.

BARRY, V.; WINQUIST, A.; STEENLAND, K. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposures and incident cancers among adults living near a chemical plant. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 11, p. 1313-1318, 2013.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BASANTA, M. R.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; CARBALLAS, T. Microbial biomass and metabolic activity in a forest soil treated with an acrylamide copolímero. **Agrochimica**, v. 47, n. 1, p. 9-13, 2003.

BASTVIKEN, D. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences - Encyclopedia of Inland Waters**, New York: Elsevier, 2009

BHAKTA, A.; RUCKENSTEIN, E. Foams and Concentrated Emulsions: Dynamics and "Phase" Behavior. **Langmuir**, v. 11, n. 12. p. 4642–4652, 1995.

BLACK, J. 2014. **The ancient invention of the steam engine by the Hero of Alexandria**. Ancient Origins. Disponível em: http://www.ancient-origins.net/ancient-technology/ancient-invention-steam-engine-hero-alexandria-001467. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

BOBERT, M.; PERSSON, H.; PERSSON, B. Foam Concentrates: Viscosity and Flow Characteristics. **Fire Technology**, v. 33, n. 4, p. 336–355, 1997.

BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 742-747, 2000.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; BROWN, E. J. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 125-132, 1995.

BROWN, D.; MAYER, C. E. **3M to Pare Scotchgard Products**. The Washington Post, 17 de Maio de 2000.

BUCK, R. C.; FRANKLIN, J.; BERGER, U.; CONDER, J. M.; COUSINS, I. T.; DE VOOGT, P.; JENSEN A. A.; KANNAN, K.; MABURY, S. A; VAN LEEUWEN, S. P. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 513–41, 2011.

BUTENHOFF, J.; COSTA, G.; ELCOMBE, C.; FARRAR, D.; HANSEN, K.; IWAI, H.; JUNG, R.; KENNEDY, G. J.; LIEDER, P.; OLSEN, G.; THOMFORD, P. Toxicity of ammonium perfluorooctanoate in male cynomolgus monkey after oral dosing for 6 months. **Toxicological Sciences**, v. 69, n. 1, p. 244–257, 2002.

CALAFAT, A. M.; KUKLENYIK, Z.; REIDY, J. A.; CAUDILL, S. P.; TULLY, J. S.; NEEDHAM, L. L. Serum concentrations of 11 perfluoroalkyl compounds in the U.S. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES) 2003–2004 and comparisons with NHANES 1999–2000. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 2237–2242, 2007.

CANCILLA, D. A.; MARTINEZ, J.; AGGELEN, G. C. V. Detection of aircraft deicing/antiicing fluid additives in a perched water monitoring well at an International airport. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 23, p. 3834–3835, 1998.

CASEY, J. F. **Fire Service Hydraulics**. 2nd ed. New York: Technical Publishing, 1984.

CETESB, **Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma Técnica L6.350, São Paulo: Cetesb, 1990.

CHIAIA, A. C.; BANTA-GREEN, C.; FIELD, J. Eliminating solid phase extraction with large-volume injection LC/MS/MS: Analysis of illicit and legal drugs and human urine indicators in us wastewaters. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 23, p. 8841-8848, 2008.

CHIANG, C. Y.; SALANITRO, J. P.; CHAI, E. Y.; COLTHART, J. D.; KLEIN, C. L. Aerobic biodegradation of benzene, toluene, and xylene in a sandy aquifer: data analysis and computer modeling. **Ground Water**, v. 27, n. 6, p. 823–834, 1989.

CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; BARCELO, D. Comparison of online solid-phase disk extraction to liquid-liquid extraction for monitoring selected pesticides in environmental waters. **Environmental Science and Technology**, v. 27, n. 12, p. 2352-2359, 1993.

CHO, J. C.; TIEDJE, J. M. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5448–5456, 2000.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 915–936, 2002.

CLARK, K. P.; KLEINER, E. K. **Synergistic surfactant compositions and fire fighting concentrates thereof**. U.S. Patent 5.616.273, 1997.

CLARK, W. E. **Fire Fighting Principles and Practices**. 2nd ed. Tulsa: Pennwell Corp, 1991.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 226–247, 2011.

CLARKE, D. B.; BAILEY, V. A.; ROUTLEDGE, A.; LLOYD, A. S.; HIRD, S.; MORTIMER, D. N. Dietary intake estimate for perfluorooctanesulphonic acid (PFOS)

and other perfluorocompounds (PFCs) in UK retail foods following determination using standard addition LC–MS/MS. **Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 4, p. 530–545, 2010.

CMA. **HEDSET for Ethylene Glycol Butyl Ether**. Washington: EU Risk Assessment of Existing Chemicals Program by the Chemical Manufacturers Association, 1994.

COLEMAN, N. V.; MATTES, T. E.; GOSSETT, J. M.; SPAIN, J. C. Biodegradation of cis -dichloroethene as the sole carbon source by a beta-proteobacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 2726–2730, 2002.

CORTINA, T.; KORZENIOWSKI, S. AFFF positioned to exceed environmental goals. **Asia–Pacific Fire Magazine**, Junho 18–22, 2008a.

CORTINA, T.; KORZENIOWSKI, S. Firefighting Foams – Reebok Redux. **Industrial Fire Journal**, Abril 18–20, 2008b.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W. Metagenomic gene discovery: Past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 321–329, 2005.

CROCKER, W. P.; NAPIER, D. H. Assessment of mathematical models for fire and explosion hazards of liquefied petroleum gases. **Journal of Hazardous Materials**, v. 20, n. 1, p. 109-135, 1998.

CROSS, J. **Anionic Surfactants: Analytical Chemistry**; 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1998.

CUNNINGHAM, J. A.; RAHME, H.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C.; REINHARD, M. Enhanced in situ bioremediation of BTEX contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 8, p. 1663–1670, 2001.

DARWIN, R. L.; OTTMAN, R. E.; NORMAN, E. C.; GOTT, J. E.; HANAUSKA, C. P. Foam and the Environment, a delicate balance. **Fire Journal**, v. 89, n. 3, p. 67–73, 1995.

DAVIS K. L.; AUCOIN, M. D.; LARSEN, B. S.; KAISER, M. A.; HARTTEN, A. S. Transport of ammonium perfluorooctanoate in environmental media near a fluoropolymer manufacturing facility. **Chemosphere**, v. 67, n. 10, p. 2011–2019, 2007.

DE CAMP, L. S. **The Ancient Engineers**. 3rd ed. New York: Dorset Press, 1986.

DE SOLLA, S. R.; DE SILVA, A. O.; LETCHER, R. J. Highly elevated levels of perfluorooctane sulfonate and other perfluorinated acids found in biota and surface water downstream of an international airport, Hamilton, Ontario, Canada. **Environment International**, v. 39, n. 1, p. 19–26, 2012.

DE VOOGT, P.; SAEZ, M. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 326-342, 2006.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multi-component mixtures. **Bioremediation**, v. 4, n. 2, p. 171–179, 2000.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene–enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 5, p. 526–536, 1999.

DEEB, R. A.; SHARP, J. O.; STOCKING, A.; MCDONALD, S.; WEST, K. A.; LAUGIER, M.; ALVAREZ, P. J. J.; KAVANAUGH, M. C.; ALVAREZ-COHEN, L. 2002. Impact of ethanol on benzene plume lengths: Microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, n. 9, p. 868–875, 2002.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; BÅATH, E.; MARTÍN, A.; CARBALLAS, T. Microbial community structure in forest soils treated with a fire retardant. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 6, p. 465–471, 2006.

DINGLASAN, M. J. A.; YE, Y.; EDWARDS, E. A.; MABURY, S. A. Fluorotelomer alcohol biodegradation yields poly- and perfluorinated acids. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 2857–2864, 2004.

DINGLASAN-PANLILIO, M. J. A.; MABURY, S. A. Significant residual fluorinated alcohols present in various fluorinated materials. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1447–1453, 2006.

DLUGOKENCKY, E; HOUWELING, S. **Methane - Encyclopedia of Atmospheric Sciences**, New York: Elsevier, 2003.

DOLFING, J. Energetics of anaerobic degradation pathways of chlorinated aliphatic compounds. **Microbial Ecology**, v. 40, n. 1. p. 2–7, 2000.

DOLFING, J.; JANSSEN, D. B. Estimates of Gibbs free energy of formation of chlorinated aliphatic compounds. **Biodegradation**, v. 5, n. 1, p. 21–28, 1994.

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, n. 2, p. 264–72, 2007.

DREYER, A.; MATTHIAS, V.; TEMME, C.; EBINGHAUS, R. Annual time series of air concentrations of polyfluorinated compounds. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 4029–4036, 2009.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay - Methods for toxicological alalysis of waters, wastewaters and sediments**. Toronto: National Water Research Institute, 1989.

ECHA (European Chemical Agency). 2013. **Candidate list of substances of very high concern for authorization**. Disponível em: http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table. Acesso em 27 de junho de 2014.

ELLIS, D. A.; MARTIN, J. W.; DESILVA, A. O.; MABURY, S. A.; HURLEY, M. D.; SULBAEKANDERSEN, M. P.; WALLINGTON, T. J.; 2004. Degradation of fluorotelomer alcohols: a likely atmospheric source of perfluorinated carboxylic acids. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 12, p. 3316–3321, 2004.

EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; TELIB, A. E. E. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 1104-1122, 2014.

EMMETT, E. A.; SHOFER, F. S.; ZHANG, H.; FREEMAN, D.; DESAI, C.; SHAW, L. M. Community exposure to perfluorooctanoate: relationships between serum concentrations and exposure sources. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 48, n. 8, p. 759-770, 2006.

EMMONS, H. W. The further history of fire science. **Fire Technology**, v. 21, n. 3, p. 230-238, 1985.

EN 1568 (European Norm). **Fire extinguishing media - Foam concentrates: Specification for low expansion foam concentrates for surface application to water immiscible/miscible liquids**. 1st ed. Oxford: Fire Industry Association / European Standard, 2000.

ENSIGN, S. A. Microbial metabolism of aliphatic alkenes. **Biochemistry**, v. 40, n. 20, p. 5845–5853, 2001.

ERICSON, I.; NADAL, M.; VAN BAVEL, B.; LINDSTRÖM, G.; DOMINGO, J. L. Levels of perfluorochemicals in water samples from Catalonia, Spain: Is drinking water a significant contribution to human exposure? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 7, p. 614–619, 2008.

ESCHAUZIER, C.; BEERENDONK, E.; SCHOLTE-VEENENDAAL, P.; DE VOOGT, P. Impact of treatment processes on the removal of perfluoroalkyl acids from the drinking water production chain. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 1708-1715, 2012.

EYERS, L.; GEORGE, I.; SCHULER, L. Environmental genomics: Exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 123–130, 2004.

FALK, R. A. **Aqueous Wetting and Film Forming Compositions**. U.S. Patent 4090967, 1978.

FEI, C. Y.; MCLAUGHLIN, J. K.; TARONE, R. E.; OLSEN, J. Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 11, p. 1677-1682, 2007.

FETZNER, S. Bacterial dehalogenation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 633–657, 1998.

FIELD, J. A.; SCHULTZ, M.; BAROFSKY, D. Identifying Hydrocarbon and Fluorocarbon Surfactants in Specialty Chemical Formulations of Environmental Interest by Fast Atom Bombardment/Mass Spectrometry. **Chimia**, v. 57, n. 9, p. 556-560, 2003.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciências de Espumas - Aplicação na Extinção de Incêndios. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 126-130, 1999.

FIGUEREDO, R. C. R.; SABADINI E. Firefighting foam stability: the effect of the drag reducer poly(ethylene) oxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 215, n. 3, p. 77-86, 2003

FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 179-183, 2004.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Plataforma da Petrobras é interditada na bacia de Campos**, 10 de Fevereiro de 2011.

FRÖMEL, T.; KNEPPER, T. P. Biodegradation of fluorinated alkyl substances. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 208, n. 53, p. 161–77, 2010.

FROMME, H.; TITTLEMIER, S. A.; VÖLKEL, W.; WILHELM, M.; TWARDELLA, D. Perfluorinated compounds – exposure assessment for the general population in western countries. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 3, p. 239–270, 2009.

FSA (Food Standards Agency). 2009. **Survey of fluorinated chemicals in food**. FSA. Disponível em: www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis0509.pdf. Acesso em 7 de novembro de 2014.

FUENTES, S.; COLOMINA, M. T.; VICENS, P.; FRANCO-PONS, N.; DOMINGO, J. L. Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during

pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring. **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 2, p. 589–598, 2007.

GABOR, E.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F. Updating the metagenomics toolbox. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 2, p. 201–206, 2007.

GAUTHIER, S. A.; MABURY, S. A. Aqueous photolysis of 8:2 fluorotelomer alcohol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1837–1846, 2005.

GIFEL. 1998. **Breve descritivo do sinistro em um tanque de óleo diesel na REPLAN da refinaria da Petrobrás em Paulínia/SP**. Disponível em www.gifel.com.br/lisref/Paulinea.htm. Acesso em 11 de junho de 2011.

GEORGE, I.; STENUIT, B.; AGATHOS, S. N. **Application of metagenomics to bioremediation - Metagenomics: Theory, Methods and Applications**, Norfolk: Caister Academic Press, 2010.

GEWURTZ, S. B.; BHAVSAR, S. P.; PETRO, S.; MAHON, C. G.; ZHAO, X.; MORSE, D.; REINER, E. J.; TITTLEMIER, S. A.; BRAEKEVELT, E.; DROUILLARD, K. High levels of perfluoroalkyl acids in sport fish species downstream of a firefighting training facility at Hamilton International Airport, Ontario, Canada. **Environment International**, v. 67, n. 1, p. 1–11, 2014.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 7, p. 1339–1342, 2001.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. Perfluorochemical surfactants in the environment. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 146A–152A, 2002.

GIMÉNEZ, A.; PASTOR, E.; ZÁRATE, L.; PLANANAS, E.; ARNALDOS, J. Long-term forest fire retardants: a review of quality, efectiveness, application and environmental considerations. **International Journal of Wildland Fire**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2004.

GLYNN, A.; BERGER, U.; BIGNERT, A.; ULLAH, S.; AUNE, M.; LIGNELL, S. Perfluorinated alkyl acids in blood serum from primiparous women in Sweden: serial sampling during pregnancy and nursing, and temporal trends. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 16, p. 9071–9079, 2012.

GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M. C.; BAUTISTA, L. F.; DELGADO, L.; VILLA, J. A. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9438–9446, 2011.

GONZALEZ-BARREIRO, C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SITKA, A.; SCHARF, S.; GANS, O. Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 2123-2132, 2006.

GOOGLE Inc. 2014. **Google Maps**. Disponível em http://maps.google.com. Acesso em julho de 2014.

GRANDJEAN, P.; ANDERSEN, E. W.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; NIELSEN, F.; MOLBAK, K.; WEIHE, P.; HEILMANN, C. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. **Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 4, p. 391-397, 2012.

GRAVES A.; LANG C.; LEAVITT M. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 813–26, 1991.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**. 5th ed. New York: Springer, 2004.

GURURAJ, M.; KUMAR, R.; GANDHI, K. S. A Network Model of Static Foam Drainage. **Langmuir**, v. 11, n. 4, p. 1381-1391, 1995.

HAGENAARS, A.; KNAPEN, D.; MEYER, I. J.; VAN DER VEN, K.; HOFF, P.; COEN, W. D. Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 155–163, 2003.

HAGNER, M.; PENTTINEN, O. P.; PASANEN, T.; TIILIKKALA, K.; SETÄLÄ, H. Acute toxicity of birch tar oil on aquatic organisms. **Agricultural and Food Science**, v. 19, n. 1, p. 24-32, 2010.

HALLDORSSON, T. I.; FEI, C.; OLSEN, J.; LIPWORTH, L.; MCLAUGHLIN, J. K.; OLSEN, S. F. Dietary predictors of perfluorinated chemicals: A study from the Danish

National Birth Cohort. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 23, p. 8971–8977, 2008.

HAMED, T. A.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETO, T.; MEHMETO, U. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 27–35, 2003.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Eletronica**, v. 1, n. 4, p. 1-9, 2001.

HANSEN, K. J., CLEMEN, L. A., ELLEFSON, M. E., JOHNSON, H. O. Compound-specific, quantitative characterization of organic: fluorochemicals in biological matrices. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 766-770, 2001.

HARDING, K. C.; SHAN, Y.; ALVAREZ-COHEN, L. AFFF and TCE biotransformation and bioremediation (título provisório). **Environmental Science and Technology**. *Publicação pendente*, 2015.

HARKINS, W. D.; FELDMAN, A. Theory of spreading of thin films. **Journal of the American Chemical Society**, v. 44, n. 1, p. 2665-2685, 1922.

HAUG, L. S.; HUBER, S.; SCHLABACH, M.; BECHER, G.; THOMSEN C. Investigation on per- and polyfluorinated compounds in paired samples of house dust and indoor air from Norwegian homes. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 19, p. 7991–7998, 2011.

HEAD, G. L.; HORN, S. **Essentials of the Risk Management Process**. 1st ed. Malvern: Insurance Institute of America, 1985.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HIGGINS, C. P.; FIELD, J. A.; CRIDDLE, C. S.; LUTHY, R. G. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 11, p. 3946–3956, 2005.

HILLS, R. G.; TRUCANO, T. G. **Statistical Validation of Engineering and Scientific Models: Background**. California: Sandia National Laboratories, 1999.

HOFFMAN, K.; WEBSTER, T. F.; WEISSKOPF, M. G.; WEINBERG, J.; VIEIRA, V. M. Exposure to polyfluoroalkyl chemicals and attention deficit/hyperactivity disorder in U.S. children 12e15 years of age. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n. 12, p. 1762-1767, 2010.

HOLM, A.; WILSON, S. R.; MOLANDER, P.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Determination of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in human plasma by large volume injection capillary column switching liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 13, p. 1071-1079, 2004.

HÖLZER, J.; MIDASCH, O.; RAUCHFUSS, K.; KRAFT, M.; REUPERT, R.; ANGERER, J.; KLEESCHULTE, P.; MARSCHALL, N.; WILHELM, M. Biomonitoring of perfluorinated compounds in children and adults exposed to perfluorooctanoatecontaminated drinking water. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 5, p. 651–657, 2008.

HORNER-DEVINE, M. C.; LAGE, M.; HUGHES, J. B.; BOHANNAN, B. J. M. A taxa area relationship for bacteria. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 750–753, 2004.

HOUDE, M.; CZUB, G.; SMALL, J. M.; BACKUS, S.; WANG, X.; ALAEE, M.; MUIR, D. C. G. Fractionation and bioaccumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) isomers in a Lake Ontario food web. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 9397–9403, 2008.

HOUDE, M.; MARTIN, J. W.; LETCHER, R. J.; SOLOMON, K. R.; Muir, D. C. G. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances, a review. **Environmental Science and Technology**, v. 40, v. 11, p. 3463–3473, 2011.

HOUTZ, E. F.; HIGGINS, C. P.; FIELD, J. A.; SEDLAK, D. L. Persistence of perfluoroalkyl acid precursors in AFFF-impacted groundwater and soil. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 15, p. 8187–8195, 2013.

HOUTZ, E. F.; SEDLAK, D. L. Oxidative conversion as a means of detecting precursors to perfluoroalkyl acids in urban runoff. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 17, p. 9342-9349, 2012.

HUANG, H.; HUANG, C.; WANG, L.; YE, X.; BAI, C.; SIMONICH, M. T.; TANGUAY, R. L.; DONG, Q. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS). **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 139-147, 2010.

HUDLICKY, M.; PAVLATH, A. E. **Chemistry of Organic Fluorine Compounds II: A Critical Review**. Washington: American Chemical Society, 1995.

HUSAIN, T. **Kuwaiti Oil Fires: Regional Environmental Perspectives**. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1995.

HUSET, C. A.; BARLAZ, M. A.; BAROFSKY, D. F.; FIELD, J. A. Quantitative determination of fluorochemicals in municipal landfill leachates. **Chemosphere**, v. 82, n. 10, p. 1380-1386, 2011.

IMR International. **Fire Fighting Foam Concentrates**. 23rd ed. San Diego: IMR International, 2006.

ISENBERG, C. **The Science of Soaps Films and Soap Bubbles**. Mineola: Dover Publications Inc., 1992.

JAIN, D. K.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 87–93, 1992.

JIMENEZ, L.; BREEN, A.; THOMAS, N. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1566–1569, 1991.

JOENSEN, U. N.; BOSSI, R.; LEFFERS, H.; JENSEN, A. A.; SKAKKEBAEK, N. E.; JORGENSEN, N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 6, p. 923-927, 2009.

JOHANSSON, G. Aspects of biological monitoring of exposure to glycol ethers. **Toxicology Letters**, v. 43, n. 1, p. 5-21, 1988

JOHANSSON, N.; ERIKSSON, P.; VIBERG, H. Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 412–418, 2009.

JOHNSON, J. Introduction to Green Chemistry. **Chemical Engineering News**, 10 de Maio de 1999.

JOOS, P.; HUNSEL, J. V. Spreading of aqueous surfactant solutions on organic liquids. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 106, n. 1, p. 161-167, 1985.

KAKSONEN, A. (2014) **Molecular approaches for microbial community analysis**. Tampere University of Technology. Disponível em http:// biomine.skelleftea.se/ biomene/molecular/index_11.htm. Acesso em 2 de dezembro de 2014.

KANNAN, K.; CORSOLINI, S.; FALANDYSZ, J.; FILLMANN, G.; KUMAR, K.S.; LOGANATHAN, B.G.; MOHD, M.A.; OLIVERO, J.; WOUWE, N.V.; YANG, J.H.; ALDOUS, K.M. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 17, p. 4489–4495, 2004.

KAO, C. M.; BORDEN, R. C. Site-specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions. **Ground Water**, v. 35, n. 2, p. 305–311, 1997.

KARRMAN, A.; ELGH-DALGREN, K.; LAFOSSAS, C.; MØSKELAND, T. Environmental levels and distribution of structural isomers of perfluoroalkyl acids after aqueous fire-fighting foam (AFFF) contamination. **Environmental Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 372-380, 2011.

KATO, K.; WONG, L. Y.; JIA, L. T.; KUKLENYIK, Z.; CALAFAT, A. M. Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999–2008. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 19, 8037–8045, 2011.

KELLMANN, M.; MUENSTER, H.; ZOMER, P.; MOL, H. Full Scan MS in Comprehensive Qualitative and Quantitative Residue Analysis in Food and Feed Matrices: How Much Resolving Power is Required? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 8, p. 1464-1476, 2009.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 204–211, 2006.

KEY, B. D.; HOWELL, R. D.; CRIDDLE, C. S. Defluorination of organofluorine sulfur compounds by *Pseudomonas* sp. strain D2. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 15, p. 2283–2287, 1998.

KEY, B. D.; HOWELL, R. D.; CRIDDLE, C. S. Fluorinated organics in the biosphere. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 9, p. 2445 -2454, 1997.

KHAN, F. I.; ABBASI, S. A. A new tool for conducting rapid risk assessment in petroleum refineries and petrochemical industries. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, v. 12, n. 4, p. 299-313, 1999.

KIM, S. K.; KANNAN, K. Perfluorinated acids in air, rain, snow, surface runoff, and lakes: relative importance of pathways to contamination of urban lakes. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 24, p. 8328–8334, 2007.

KINNER, D. L. 1998. **Fluorinated Organic Chemicals**. The Florida Times-Union.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 1, p. 169-188, 2004.

KISSA, E. **Fluorinated surfactants: Synthesis, properties, and applications**. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

KLEIN, R. Focus on foam. **Fire Engineering Journal and Fire Prevention**, v. 1, n. 1, p. 40–42, 2004

KNOWLES, R. S. **The First Pictorial History of the American Oil and Gas Industry**. 1st ed. Athens: Ohio University Press, 1983.

KNOX, S. S.; JACKSON, T.; JAVINS, B.; FRISBEE, S. J.; SHANKAR, A.; DUCATMAN, A. M. Implications of early menopause in women exposed to perfluorocarbons. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1747-1753, 2011.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 295–304, 2001.

KOVALCHUK, N. M.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; MATAR, O.; IVANOVA, N. Fluoro- vs hydrocarbon surfactants: Why do they differ in wetting performance? **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 210, n. 1, p. 65–71, 2014.

KROŃ , B.; PROCHASKA, K.; CHRZANOWSKI, Ł. Biodegradability of firefighting foams. **Fire Technology**, v. 48, n. 2, p. 173−181, 2010.

KWOK, D. Y.; NEUMANN, A. W. Contact angle measurements and contact angle interpretation. **Advanced Colloid Interface Science**, v. 81, n. 1, p. 167-249, 1999.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1, p. 37-56, 1987.

LAU, C., LINDSTROM, A.B., SEED, J. Perfluorinated chemicals 2008, PFAA Days II meeting report and highlights. **Reproductive Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 429–434, 2009.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing - Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons, 1991.

LEAHY, J. G.; OLSEN, R. H. Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration, and the effect of nitrate. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, n. 1, p. 23-30, 2006.

LEHMLER, H. Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants: A review. **Chemosphere**, v. 58, n. 11, p. 1471–1496, 2005.

LESON, G.; WINER, A. M. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 41, n. 8. 1045–54, 1991.

LEVINE, A. D.; LIBELO, E. L.; BUGNA, G.; SHELLEY, T.; MAYFIELD, H.; STAUFFER, T. B. Biogeochemical assessment of natural attenuation of JP-4-contaminated ground water in the presence of fluorinated surfactants. **The Science of the Total Environment**, v. 208, n. 3, p. 179-195, 1997.

LI, H.; LIU, Y. H.; LUO, N.; ZHANG, X. Y.; LUAN, T. G.; HU, J. M. Biodegradation of benzene and its derivatives by a psychrotolerant and moderately haloalkaliphilic *Planococcus* sp. strain zd22. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 7, p. 629–36, 2006.

LIEN, N. P. H.; FUJII, S.; TANAKA, S.; NOZOE, M.; TANAKA, H.; Contamination of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in surface water of the Yodo River basin (Japan). **Desalination**, v. 226, n. 2, p. 338–347, 2008.

LIU, J.; LEE, L. S.; NIES, L. F.; NAKATSU, C. H.; TURCO, R. F. Biotransformation of 8:2 fluorotelomer alcohol in soil and by soil bacterial isolates. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 8024–8030, 2007.

LIU, J.; WANG, N.; BUCK, R. C.; WOLSTENHOLME, B. W.; FOLSOM, P. W.; SULECKI, L. M.; BELLIN, C. A. Aerobic biodegradation of [14C] 6:2 fluorotelomer alcohol in a flowthrough soil incubation system. **Chemosphere**, v. 80, n. 7, p. 716–723, 2010.

LIU, J; AVENDAÑO, S. M. Microbial degradation of polyfluoroalkyl chemicals in the environment: A review. **Environment International**, v. 61, n. 1, p. 98–114, 2013.

LLADÓ, S.; SOLANAS, A. M.; DE LAPUENTE, J.; BORRÀS, M.; VIÑAS, M. A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. **Science of Total Environment**, v. 435, n. 1, p. 262–269, 2012.

LOI, E. I.; YEUNG, L. W.; MABURY, S. A.; LAM, P. K. Detections of commercial fluorosurfactants in Hong Kong marine environment and human blood: a pilot study. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 4677-4685, 2013.

LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; CONTINI, S.; SCHWESIG, D.; WERRES, F.; BALSAA, P.; GANS, O.; WEISS, S.; BLAHA, L.; BOLCHI, M.; GAWLIK, B. M. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, v. 44, n. 14, p. 4115–4126, 2010.

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the biodegradation of different types of lubricant oils in liquid medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1285-1290, 2009.

LOPES, P. R. M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

LÓPEZ-FONTAIN, J. L.; SARMIENTO, F.; SCHULZ, P. C. The aggregation of sodium perfluorooctanoate in water. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 8, p. 862-871, 2005.

LORBER, M.; EAGLESHAM, G. E.; HOBSON, P.; TOMS, L. M. L.; J. F. MUELLER, J. F.; THOMPSON, J. S. The effect of ongoing blood loss on human serum concentrations of perfluorinated acids. **Chemosphere**, v. 118, n. 1, p. 170–177, 2015.

LUNA, B.; MORENO, J. M.; CRUZ, A.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F. Effects of a long-term fire retardant chemical (Fire-Trol 934) on seed viability and germination of plants growing in a burned Mediterranean area. **International Journal of Wildland Fire**, v. 16, n. 3, p. 349–59, 2007.

MACDONALD, D. **Corporate Risk Control**. 1st ed. New York: John Wiley and Sons, Co. 1990.

MACKAY, D.; PATERSON, S. Evaluating the multimedia fate of organic chemicals. **Environmental Science and Technology,** v. 25, n. 3, p. 427–436, 1991.

MAHMOUD, M. A. M.; KÄRRMAN, A.; OONO, S.; HARADA, K. H.; KOIZUMI, A. Polyfluorinated telomers in precipitation and surface water in an urban area of Japan. **Chemosphere**, v. 74, n. 3, p.467–472, 2009.

MANNAN, S. **Lees' Process Safety Essentials**. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd., 2014.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 650-663, 2001.

MARMUR, A. The Lotus Effect: Superhydrophobicity and Metastability. **Langmuir**, v. 20, n. 9, p. 3517-3519, 2004.

MARTIENSSEN, M.; FABRITIUS, H.; KUKLA, S.; BALCKE, G. U.; HASSELWANDER, E.; SCHIRMER, M. Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 87, n. 2, p. 37–53, 2006.

MARTIN, J. W.; KANNAN, K.; BERGER, U.; DE VOOGT, P.; FIELD, J.; FRANKLIN, J.; GIESY, J. P.; HARNER, T.; MUIR, D. C. G.; SCOTT, B.; KAISER, M.; JARNBERG, U.; JONES, K. C.; MABURY, S. A.; SCHROEDER, H.; SIMCIK, M.; SOTTANI, C.; VAN BAVEL, B.; KARRMAN, A.; LINDSTROM, G.; VAN LEEUWEN, S. Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 13, p. 248–255, 2004.

MARTINES, C.; LONGO, M.; LERDA, D.; CERONI, G.; CAVALLÁRO, A. A GC Method for the Quantitative Determination of BTEX in Gasoline. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, n. 1, p. 413-417, 1996.

MARTINO, C. D.; LOPEZ, N. I.; IUSTMAN, L. J. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 67, n. 1., p. 15–20, 2012.

MARZOUK, E. M.; GHULMAN, H. A. **Design and Evaluation of Fire Protection Systems in Power Plants Fuel Tanks and Petroleum Industry**. 1st ed. Umm Al-Qura: Department of Mechanical Engineering, 2007.

MATHUR, A. K.; MAJUMDER, C. B. Kinetics modelling of the biodegradation of benzene, toluene and phenol as single substrate and mixed substrate by using *Pseudomonas putida*, **Chemical & Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 1, p. 101–109, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4334–4340, 2010.

MCCAIG, A. E.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4554-4559, 2001.

MEESTERS, R. J. W.; SCHRÖDER, H. F. Perfluorooctane sulfonate: a quite mobile anionic anthropogenic surfactant, ubiquitously found in the environment. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 235–242, 2004.

MELZER, D.; RICE, N.; DEPLEDGE, M. H.; HENLEY, W.E.; GALLOWAY, T.S. Association between serum perfluorooctanoic acid (PFOA) and thyroid disease in the US national health and nutrition examination survey. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 5, p. 686-692, 2010.

MEMBRÉ, J. M.; THURETTE J.; CATTEAU, M. Modeling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 1, p.345-350, 1996.

MIYAKE, Y.; YAMASHITA, N.; ROSTKOWSKI, P.; SO, M. K.; TANIYASU, S.; LAM, P. K. S.; KANNAN, K. Determination of trace levels of total fluorine in water using combustion ion chromatography for fluorine: A mass balance approach to determine individual perfluorinated chemicals in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 2, p. 98–104, 2007.

MOE, M. K.; HUBER, S.; SVENSON, J.; HAGENAARS, A.; PABON, M.; TRUMPER, M.; BERGER, U.; KNAPEN, D.; HERZKE, D. The structure of the firefighting foam surfactant Forafac 1157 and its biological and photolytic transformation products. **Chemosphere**, v. 89, n. 7, p. 869-875, 2012.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 297-305, 2009.

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, p-4116-4122, 2014.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 342-353, 2015.

MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. **Petroleum derivatives biodegradation: environmental impact and bioremediation strategies**. San Francisco: Amazon, 2012.

MOODY, C. A.; FIELD, J. A. Determination of perfluorocarboxylates in groundwater impacted by fire-fighting activity. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 16, p. 2800-2806, 1999.

MOODY, C. A.; HEBERT, G. N.; STRAUSS, S. H.; FIELD, J. A. Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan, USA. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 5, n. 2, p. 341–345, 2003.

MOODY, C.; FIELD, J. Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 18, p. 3864-3870, 2000.

MORALES, C. G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, México, 2004.

MORLETT-CHAVEZ, J. A.; ASCACIO-MARTINEZ, J. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; VELAZQUEZ-VADILLO, J. F.; HASKINS, W. E.; BARRERA-SALDANA, H. A. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 581–587, 2010.

MULLIGAN, D. J. Fire-Fighting Foams - True Specialities. **Speciality Chemicals**, v. 1, n. 1, p. 343–347, 1990.

MURAKAMI, M.; IMAMURA, E.; SHINOHARA, H.; KIRI, K., MURAMATSU, Y.; HARADA, A.; TAKADA, H. Occurrence and sources of perfluorinated surfactants in rivers in Japan. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 17, p. 6566–6572, 2008.

Museo del Prado. 2015. **Nuevos datos y obras de Francisco Gutiérrez**. Museo del Prado. Disponível em: https://www.museodelprado.es/uploads/tx_gbboletinobras/numero_31_02.pdf. Acesso em 7 de janeiro de 2015.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoreses analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 127-141, 2003.

NAGATA, Y.; HATTA, T.; IMAI, R.; KIMBARA, K.; FUKUDA, M.; YANO, K.; TAKAGI, M. Purircation and characterization of c-hexachlorocyclohexane (c-HCH) dehydrochlorinase (LinA) from Pseudomonas paucimobilis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 1, p.1582-1583, 1993.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. **Informativo Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 1998.

NATARAJAN, R.; AZERAD, R.; BADET, B.; COPIN, E. Microbial cleavage of C–F bond. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 425–435, 2005.

NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S. **Degradation and transformation of organic fluorine compounds - Organofluorines the handbook of environmental chemistry**. New York: Springer, 2002.

NFPA (National Fire Protection Association). **Fire Protection Handbook**, 17th ed. Quincy: NFPA, 1991.

NFPA (National Fire Protection Association). **Standard for low-, medium-, and high-expansion foam**, 11th ed. Quincy: NFPA, 2005.

NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1222–5, 2004.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 81-85, 2004.

NOLAN, D. P. **Handbook of Fire & Explosion Protection Engineering Principles for Oil, Gas, Chemical, & Related Facilities**. 1st ed. Norwich: William Andrew Inc., 1996.

O GLOBO. **Princípio de incêndio atingiu unidade da Reduc na manhã desta quinta**. 7 de Setembro de 2010.

OAKES, K. D.; BENSKIN, J. P.; MARTIN, J. W.; INGS, J. S.; HEINRICHS, J. Y.; DIXON, D. G.; SERVOS, M. R. Biomonitoring of perfluorochemicals and toxicity to the downstream fish community of Etobicoke Creek following deployment of aqueous film-forming foam. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 120–129, 2010.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). 2007. **Results of survey on production and use of PFOS, PFAS and PFOA, related substances and products/mixtures containing these substances.** OECD, Disponível em http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono%282005%291. Acesso em 10 de fevereiro de 2013.

OVERIGE BLUSSYSTEMEN. 2000. **AFFF Firefighting**. Overige. Disponível em http://members.ziggo.nl/sverboog/Lege%20pagina%2047.htm. Acesso em 14 de março de 2012.

PABON, M.; CORPART, J. M.; Fluorinated surfactants: synthesis, properties, effluent treatment. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 114, n 2, p. 149-56, 2002.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.58, n. 2, p.254–260, 2006.

PANKHURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R. **Biological indicators of soil health**. Wallingford: CAB; 1997.

PARKER, M. A.; SPOERKE, J. M. Geographic structure of lineage associations in a plant–bacterial mutualism. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 11, n. 5, p. 549–562, 1998.

PARSONS J. R.; SAEZ M.; DOLFING J.; DE VOOGT P. Biodegradation of perfluorinated compounds. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 196, n. 1, p. 53–71, 2008.

PASMAN, H. J.; SUTER, G. Effect working party on loss prevention and safety promotion in the process industries. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 83, n. 1, p. 18–21, 2005.

PEDEN-ADAMS, M. M.; KELLER, J. M.; EUDALY, J. G.; BERGER, J.; GILKESON, G. S.; KEIL, D. E. Suppression of humoral immunity in mice following exposure to perfluorooctane sulfonate. **Toxicological Sciences**, v. 104, n. 1, p. 144–154, 2008.

PERSSON, S.; ROTANDER, A.; KÄRRMAN, A.; BAVEL, B.V.; MAGNUSSON, U. Perfluoroalkyl acids in subarctic wild male mink (*Neovison vison*) in relation to age, season and geographical area. **Environment International**, v. 59, n. 1, p. 425–430, 2013.

PETROBRÁS. **Projeto de Sistemas de Combate a Incêndio com Água e Espuma para Áreas de Armazenamento e Transferência de Álcool Etílico**. Norma N-1886, Petróleo Brasileiro S. A., 1983.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1987.

PLACE, B. J.; FIELD, J. A. Identification of Novel Fluorochemicals in Aqueous Film-Forming Foams Used by the US Military. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7120−7127, 2012.

PLAZA, G.A.; NALECZ-JAWECKI, G.; PINYAKONG, O.; ILLMER, P.; MARGESIN, R. Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon-contaminated sites. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 163, n. 2, p. 477–488, 2010.

PLUMLEE, M.H.; LARABEE, J.; REINHARD, M. Perfluorochemicals in water reuse. **Chemosphere**, v. 72, n. 10, p. 1541–1547, 2008.

POOLE, C. F.; GUNATILLEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 2, p. 17-39, 2000.

PRESS-TELEGRAM. 1998. **1 Plane Destroyed, 4 Damaged in Airport Fire**. Los Angeles Times. Disponível em http://articles.latimes.com/1998/apr/01/local/me-34857. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

PREVEDOUROS, K.; COUSINS, I. T.; BUCK, R. C.; KORZENIOWSKI, S. H. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 32–44, 2006.

RAHMAN, M. F.; PELDSZUS, S.; ANDERSON, W.B. Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: a review. **Water Research**, v. 50, n. 1, p. 318-340, 2014.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 1, p. 142–160, 2007.

RANJBAR, H.; SHAHRAKI, B. H. Effect of Aqueous Film-Forming Foams on the Evaporation Rate of Hydrocarbon Fuels. **Chemical Engineering & Technology**, v. 36, n. 2, p. 295-299, 2013.

RAYNE, S.; FOREST, K. Perfluoroalkyl sulfonic and carboxylic acids: A critical review of physicochemical properties, levels and patterns in waters and wastewaters, and treatment methods. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, 2009, v. 44, n. 12, p.1145-1199, 2009.

RAYNE, S.; FOREST, K.; FRIESEN, K. J. Congener-specific numbering systems for the environmentally relevant C4 through C8 perfluorinated homologue groups of alkyl sulfonates, carboxylates, telomer alcohols, olefins, and acids, and their derivatives. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 43, n. 12, p. 1391–1401, 2008.

REMDE, A.; DEBUS, R. Biodegradability of fluorinated surfactants under aerobic and anaerobic conditions. **Chemosphere**, v. 32, n. 8, p. 1563–1574, 1996.

RENKA, R. J. Interpolation of Data on the Surface of a Sphere. **ACM Transactions on Mathematical Software**, v. 10, n. 4, p. 417-436, 1984.

REUTERS. 2007. **Plane explodes at Japanese airport**. The Guardian. Disponível em: http://www.theguardian.com/world/2007/aug/20/china.japan. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

RHOADS, K. R.; JANSSEN, E. M. L.; LUTHY, R. G.; CRIDDLE, C. S. Aerobic biotransformation and fate of N-ethyl perfluorooctane sulfonamidoethanol (N-EtFOSE) in activated sludge. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 2873–2878, 2008.

ROBERTSON, C., KRAUSS, C. 2010. **Gulf Spill Is the Largest of Its Kind, Scientists Say**. The New York Times Company. Disponível em www.nytimes.com/2010/08/03/us/03spill.html. Acesso em 29 de setembro de 2014.

ROGERS, R. S. Eyes On Ionic Liquids. **Chemical Engineering News**, 15 de Abril de 1999.

ROS, M.; RODRIGUEZ, I.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. **Bioresource Technology,** v. 101, n. 18, p. 6916-6923, 2010.

RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; FERNANDEZ-SANCHEZ, J. M.; KANE, S. R.; KIM, D.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol and methyl-tertbutyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2631–2639, 2002.

RUPPERT, W. H.; VERDONIK, D. P.; HANAUSKA, C. H. **Environmental impact of fire fighting foams**. Baltimore: Hughes Associates Inc., 2005.

SÁEZ, M; LIU, J. Aerobic biodegradation of perfluorinated fluotelomer compounds (titulo provisório). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, *Publicação pendente*. 2015.

SAITO, N.; HARADA, K.; INOUE, K.; SASAKI, K.; YOSHINAGA, T.; KOIZUMI, A. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. **Journal of Occupational Health**, v. 46, n. 1, p. 49–59, 2004.

SALAZAR, S. M. **Technical Report 825**. San Diego: Naval Ocean Systems, 1985.

SARDQVIST, S. **Water and other extinguishing agents**. 4th ed. Karlstad: Swedish Rescue Services Agency, 2002.

SASAKI, T.; MAKI, H.; ISHIHARA, M.; HARAYAMA, S. Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 22, p. 3618-3621, 1998.

SCHEFFEY, J. L.; WRIGHT, J. A. **Analysis of test criteria for specifying foam fire-fighting agents for aircraft rescue and fire-fighting**. 1st ed. Columbia: Hughes Associates, Inc., 1994.

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p.323-331, 1985.

SCHMIDT, T. C.; MORGENROTH, E.; SCHIRMER, M.; EFFENBERGER, M.; HADERLEIN, S. B. **Oxygenates in Gasoline: Environmental Aspects**. Washington: ACS, 2002.

SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, n. 2, p. 29–56, 2002.

SCHRÖDER, H. F. Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 131–151, 2003.

SCHULTZ, M.; BAROFSKY, D.; FIELD, J. Fluorinated alkyl surfactants. **Environmental Engineering Science**, v. 20, n. 5, p. 487–501, 2004.

SCORTICHINI, M.; NATALINI, E.; MARCHESI, U. Evidence for separate origins of the two *Pseudomonas avellanae* lineages. **Plant Pathology**, v. 55, n. 3, p. 451–457, 2006.

SEACAT, A. M.; THOMFORD, P. J.; HANSEN, K. J.; OLSEN, G. W.; CASE, M. T.; BUTENHOFF, J. L. Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkey. **Toxicological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 249–264, 2002.

SHAH, F. A.; MAHMOOD, Q.; RASHID, N.; PERVEZ, A.; RAJA, I. A.; SHAH, M. M. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. 1, p. 627–642, 2015.

SHEPPARD, P.; ADETUTU, E.; MAKADIA, T.; BALL, A. Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon-contaminated soil. **Soil Research**, v. 49, n. 3, p. 261–269, 2011.

SHINODA, K.; HATO, M.; HAYASHI, T. Physicochemical properties of aqueous solutions of fluorinated surfactants. **Journal of Physical Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 909–914, 1972.

SHINODA, K.; NOMURA, T. Miscibility of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants in micelles and liquid mixtures. Basic studies of oil repellent and fire extinguishing agents. **Journal of Physical Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 365–369, 1980.

SIMCIK, M. F., DORWEILER, K. J. Ratio of perfluorochemical concentrations as a tracer of atmospheric deposition to surface waters. **Environmental Science and Technology**, 39, n. 23, p. 8678–8683, 2005.

SINCLAIR, E.; KANNAN, K. Mass Loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1408–1414, 2006.

SINGH, B. K.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J. M.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, v. 57, n. 1, p. 72-82, 2006.

SKUTLAREK, D.; EXNER, M.; FÄRBER, H. Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, n. 5, p. 299–307, 2006.

SMIDT, H.; DE VOS, W. M. Anaerobic microbial dehalogenation. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 43–73, 2004.

SNEDECOR, G. W. **Statistical methods**. Iowa: Iowa State University Press, 1962.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd ed, New York: W. H. Freeman and Co, 1995.

SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, M. R.; LEBEAULT, R. J. M.; VANDECASTEELE, J. P. Biodegradation of gasoline: Kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 1008–1016, 1999.

STAPLES, C. A.; BOATMAN, R. J.; CANO, M. L. Ethylene glycol ethers: an environmental risk assessment. **Chemosphere**, v. 36, n. 7, p. 1585-1613, 1998.

STAROV, V. M.; VELARDE, M. G.; RADKE, C. **Wetting and Spreading Dynamics. Surfactant Science Series**. 1st ed. London: Taylor & Frances, 2008.

STICKLEY, A. R. J.; TWEDT, D. J.; HEISTERBERG, J. F.; MOTT, D. F.; GLAHN, J. F. Surfactant spray system for controlling blackbirds and starlings in urban roosts. **Wildlife Society Bulletin**, v. 14, n. 4, p. 412-418, 1986.

SUN, G. D.; XU, Y.; JIN, J. H.; ZHONG, Z. P.; LIU, Y.; LIU, Z. P. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233, n. 1, p. 72–78, 2012.

SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAC, L.; PIOTROWSKA0CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, n. 1, p. 121-128, 2014.

TACCARI, M.; MILANOVIC, V.; COMITINI, F.; CASUCCI, C.; CIANI, M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 66, n. 1, p. 39-46, 2012.

TANIYASU, S.; KANNAN, K.; SO, M. K.; GULKOWSKA, A.; SINCLAIR, E.; OKAZAWA, T.; YAMASHITA, N. Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 2, p. 89-97, 2005.

TANIYASU, S.; KANNAN, K.; YEUNG, L. W. Y.; KWOK, K. Y.; LAM, P. K. S.; YAMASHITA, N. Analysis of trifluoroacetic acid and other shortchain perfluorinated acids (C2-C4) in precipitation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison to patterns of long-chain perfluorinated acids (C5-C18). **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 2, p. 221-230, 2008.

THIBODEAUX, J. R.; HANSON, R. G.; ROGERS, J. M.; GREY, B. E.; BARBEE, B. D.; RICHARDS, J. H.; BUTENHOFF, J. R.; STEVENSON, L. A.; LAU, C. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 2, p. 369–381, 2003.

TIPPETT, C. R., 2013. **Acme Oil Company**. Petroleum History Society. Disponível em: http://www.petroleumhistory.ca/history/companies.html#acme. Acesso em 14 de outubro de 2014.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.

TOMS, L. M. L.; CALAFAT, A.; KATO, K.; THOMPSON, J.; HARDEN, F.; HOBSON, P.; SJÖDIN, A.; MUELLER, J. F.; Polyfluoroalkyl chemicals (PFCs) in human blood serum from children and adults in Australia. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 4194–4199, 2009.

TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 53–62, 2002.

TOWLER, G.; SINNOTT, R. **Chemical Engineering Design**. 6th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd., 2013.

TUGNOLI A.; COZZANI, V.; PADOVA, A. D.; BARBARESI, T.; TALLONE, F. Mitigation of fire damage and escalation by fireproofing: A risk-based strategy. **Reliability Engineering & System Safety**, v. 105, n. 1, p. 25-35, 2012.

TULLO, A. Top 75 Chemical Producers. **Chemical Engineering News**, Maio 22-29, 2000.

UEMURA, A.; MARIN-MORALES, E.; ANGELIS, D. F. **Manual de protocolos de laboratório**. Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro: Publicação interna / UNESP - IB, 2013.

UOTILA, J. S.; KITUNEN, V. H.; SAASTAMOINEN, T.; COOTE, T.; HAÈGGBLOM, M. M.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Characterization of aromatic dehalogenases of *Mycobacterium fortuitum* CG-2. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 5669-5675, 1992.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). **Provisional Health Advisories for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS)**. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, 2009a.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). **Soil Screening Levels for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctyl Sulfonate (PFOS)**. Atlanta: U.S. Environmental Protection Agency, 2009b.

VAN ASSELT, E. D.; R.P.J.J. RIETRA, R. P. J. J.; RÖMKENS, P. F. A. M.; VAN DER FELS-KLERX, H. J. Perfluorooctane sulphonate (PFOS) throughout the food production chain. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 1–6, 2011.

VESTERGREN, R.; COUSINS I. T. Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 15, p. 5565–5575, 2009.

WAGGY, G. T.; CONWAY, L. A.; HANSEN, J. L.; BLESSING, R. L. Comparison of 20-d BOD and OECD Closed-Bottle Biodegradation Tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.13, n. 8, p. 1277-1280, 1994.

WANG, N., SZOSTEK, B., FOLSOM, P. W., SULECKI, L. M., CAPKA, V., BUCK, R. C., BERTI, W. R., GANNON, J. T. Aerobic biotransformation of 14C-labeled 8–2 telomer alcohol by activated sludge from a domestic sewage treatment plant. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 19, p. 531–538, 2005b.

WANG, N.; LIU, J.; BUCK, R. C.; KORZENIOWSKI, S. H.; WOLSTENHOLME, B. W.; FOLSOM, P. W.; SULECKI, L. M. 6:2 Fluorotelomer sulfonate aerobic biotransformation in activated sludge of waste water treatment plants. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 853–858, 2011.

WANG, N.; SZOSTEK, B.; BUCK, R. C.; FOLSOM, P. W.; SULECKI, L. M.; CAPKA, V.; BERTI, W. R.; GANNON, J. T. Fluorotelomer alcohol biodegradation-direct evidence that perfluorinated carbon chains breakdown. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 19, p. 7516–7528, 2005a.

WANG, N.; SZOSTEK, B.; BUCK, R. C.; FOLSOM, P. W.; SULECKI, L. M.; GANNON, J. T. 8–2 Fluorotelomer alcohol aerobic soil biodegradation: pathways, metabolites, and metabolite yields. **Chemosphere**, v. 75, n. 8, p. 1089–1096, 2009.

WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 409-414, 1987.

WEINBERG, I.; DREYER, A.; EBINGHAUS, R. Landfills as sources of polyfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers and musk fragrances to ambient air. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 4, p. 935–941, 2011.

WEISS, O.; WIESMÜLLER, G. A.; BUNTE, A.; GÖEN, T.; SCHMIDT, C.K.; WILHELM, M.; HÖLZER, J. Perfluorinated compounds in the vicinity of a fire training area – human biomonitoring among 10 persons drinking water from contaminated private wells in Cologne, Germany. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 2, p. 212–215, 2012.

WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-Effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2, p. 1045-1050, 2008.

WHITACRE, D. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. 5th ed. New York: Springer Science & Business Media, 2008.

WILHELM, M.; HOLZER, J.; DOBLER, L.; RAUCHFUSS, K.; MIDASCH, O.; KRAFT, M. Preliminary observations on perfluorinated compounds in plasma samples (1977–2004) of young German adults from an area with perfluorooctanoate-contaminated drinking water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 5, p. 142–145, 2009.

WILLIAMS, D. E.; OLANIRAN, B. A. Exxon's decision-making flaws: The hypervigilant response to the Valdez grounding. **Public Relations Review**, v. 20, n. 1, p. 5-18, 1994.

WOODMAN, A. L.; RICHTER, H. P.; ADICOFF, A.; GORDON, A. S. AFFF Spreading Properties at Elevated Temperatures. **Fire Technology**, v. 14, n. 4, p. 265-272, 1978.

WU, Y.; CHIANG, C.; LU, C. Respirometric evaluation by graphical analysis for microbial systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 92, n. 3, p. 137–152, 2004.

XIAO, F.; GULLIVER, J. S.; SIMCIK, M. F.; Perfluorooctane sulfonate (PFOS) contamination of fish in urban lakes: a prioritization methodology for lake management. **Water Research**, v. 47, n. 20, p. 7264-7272, 2013.

XUN, L.; ORSER, C. S. Purification and properties of pentachlorophenol hydroxylase, a flavoprotein from *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 14, p. 4447-4453, 1991.

YAMASHITA, N.; KANNAN, K.; TANIYASU, S.; HORII, Y.; OKAZAWA, T.; PETRICK, G.; GAMO, T. Analysis of perfluorinated acids at parts-perquadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 21, p. 5522-5528, 2004.

YANG, L.; LI, Y. Anaerobic digestion of giant reed for methane production. **Bioresource Technology**, v. 171, n. 1, p. 233–239, 2014.

YEOM, S. H.; YOO, Y. J.; LEE, J. W. **The importance of microbial adaptation in the degradation of BTX - Studies in Environmental Science**. New York: Elsevier, 1997.

YOO, H.; WASHINGTON, J. W.; ELLINGTON, J. J.; JENKINS, T. M.; NEILL, M. P. Concentrations, distribution, and persistence of fluorotelomer alcohols in sludge-applied soils near Decatur, Alabama, USA. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 8397–8402, 2010.

YU, J.; HU, J.; TANAKA, S.; FUJII, S. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants. **Water Research**, v. 43, n. 1, p. 2399–2408, 2009.

YUAN, F. Automatic Drawing of Equal Quantity Curve. **Computer Aided Engineering**, v. 1, n. 3, p. 1-7, 1998.

YUJIE M.; LEE, P. K. H.; HARDING, K. C.; ALVAREZ-COHEN, L. Characterization of four TCE-dechlorinating microbial enrichments grown with different cobalamin stress and methanogenic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.14, p. 6439-6450, 2013.

ZAHN, L.; WELLENS, H. Testing of biodegradability in the batch experiment – further experiences and new applicabilities. **Z. Wasser A bwasser Forsch**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1980.

ZUSHI, Y.; MASUNAGA, S. First-flush loads of perfluorinated compounds in stormwater runoff from Hayabuchi River basin, Japan served by separated sewerage system. **Chemosphere**, v. 76, n. 6, p. 833–840, 2009.

Apêndice A – Dados de LC-MS / MS

Tabela A1 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF 3M

Amostra		5:1:2 FtB	5:3 FtB	6:2 FtTAoS	62Z-FAS	6:2 FtS	6:2 FtSaB	6:2 FtTHN+	7:1:2 FtB	7:3 FtB	82Z-FAS	8:2 FtS
Tempo inicial	FC-	0,00277	0,00279	0,00001	0,00004	0,53687	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000	0,58749	0,00000
	FC+	0,00200	0,00240	0,00001	0,00001	0,05449	0,00000	0,00000	0,00001	0,00001	0,38684	0,00000
	AC-	0,00219	0,00235	0,00000	0,00001	0,69622	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,16597	0,00000
	AC+	0,00117	0,00101	0,00000	0,00001	0,37882	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,02696	0,00000
	LV-	0,00290	0,00136	0,00001	0,00000	0,16333	0,00001	0,00001	0,00001	0,00000	0,44254	0,00001
	LV+	0,00267	0,00150	0,00000	0,00000	0,34989	0,00000	0,00000	0,00000	0,00001	0,15117	0,00001
30 dias	FC-	0,00211	0,00195	0,00001	0,00000	0,02433	0,00001	0,00000	0,00001	0,00001	0,43582	0,00000
	FC+	0,00283	0,00276	0,00001	0,00001	0,06616	0,00001	0,00001	0,00000	0,00000	0,16004	0,00001
	AC-	0,00181	0,00255	0,00001	0,00000	0,06191	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,37081	0,00000
	AC+	0,00179	0,00227	0,00000	0,00000	0,80293	0,00001	0,00001	0,00001	0,00000	0,37544	0,00000
	LV-	0,00125	0,00105	0,00000	0,00001	0,82510	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,35219	0,00001
	LV+	0,00202	0,00108	0,00001	0,00000	0,38499	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,51778	0,00001
60 dias	FC-	0,00200	0,00159	0,00000	0,00000	0,83367	0,00000	0,00000	0,00001	0,00001	0,06927	0,00000
	FC+	0,00260	0,00201	0,00000	0,00000	0,76975	0,00001	0,00001	0,00001	0,00000	0,60321	0,00000
	AC-	0,00123	0,00281	0,00000	0,00000	0,56567	0,00001	0,00001	0,00000	0,00000	0,88772	0,00001
	AC+	0,00257	0,00196	0,00000	0,00001	0,54626	0,00001	0,00000	0,00001	0,00000	0,59255	0,00001
	LV-	0,00186	0,00130	0,00000	0,00000	0,14635	0,00001	0,00001	0,00000	0,00001	0,89933	0,00001
	LV+	0,00280	0,00257	0,00000	0,00000	0,70112	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,40932	0,00001
90 dias	FC-	0,00174	0,00136	0,00001	0,00001	0,22311	0,00001	0,00001	0,00000	0,00001	0,24175	0,00001
	FC+	0,00278	0,00258	0,00001	0,00000	0,48762	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,24489	0,00001
	AC-	0,00183	0,00137	0,00000	0,00000	0,47483	0,00000	0,00001	0,00000	0,00000	0,23357	0,00000
	AC+	0,00271	0,00216	0,00001	0,00001	0,53349	0,00001	0,00001	0,00000	0,00001	0,68617	0,00000
	LV-	0,00297	0,00101	0,00000	0,00001	0,10163	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,41568	0,00000
	LV+	0,00276	0,00154	0,00001	0,00000	0,16348	0,00001	0,00000	0,00001	0,00001	0,79965	0,00000

(Elaborado pelo autor)

Tabela A1 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF 3M (Continuação)

Amostra		9:1:2 FtB	EtFOSA	EtFOSE	FHxSA	FOSA	PFBA	PFBS	PFBSaAm	PFBSaAmA	PFDA
Tempo inicial	FC-	0,00008	0,00000	0,00001	292,95784	0,70077	72,49954	140,28564	0,51422	0,63169	0,68235
	FC+	0,00004	0,00000	0,00001	670,43934	0,33120	178,57317	188,41483	0,47556	0,45461	0,52479
	AC-	0,00004	0,00001	0,00000	680,42601	0,83815	17,68897	89,15506	0,73115	0,88155	0,17938
	AC+	0,00004	0,00001	0,00001	615,81710	0,66178	64,28484	135,44351	0,60328	0,67820	0,01582
	LV-	0,00008	0,00001	0,00001	760,56899	0,41662	176,49534	161,28421	0,11926	0,22813	0,80274
	LV+	0,00004	0,00001	0,00001	688,93590	0,76718	54,47946	86,81306	0,21279	0,38265	0,37606
30 dias	FC-	0,00004	0,00001	0,00001	398,37050	0,64813	24,26741	24,71628	0,28524	0,78901	0,17949
	FC+	0,00005	0,00001	0,00000	308,88479	0,24919	148,72566	170,39781	0,66562	0,07150	0,46468
	AC-	0,00003	0,00000	0,00001	354,39924	0,69701	95,51105	147,24552	0,55751	0,10869	0,46225
	AC+	0,00008	0,00001	0,00001	642,75286	0,72749	175,73408	47,29223	0,24673	0,55846	0,09116
	LV-	0,00005	0,00000	0,00000	449,45089	0,82132	104,67355	105,77364	0,06630	0,51439	0,80930
	LV+	0,00002	0,00000	0,00000	352,26548	0,18735	175,90327	176,07254	0,15073	0,05166	0,07210
60 dias	FC-	0,00007	0,00001	0,00000	492,34755	0,54425	148,53906	70,66331	0,15544	0,63085	0,69571
	FC+	0,00005	0,00001	0,00000	79,86128	0,62914	160,62922	119,57999	0,21508	0,18467	0,57103
	AC-	0,00002	0,00000	0,00000	100,85755	0,17452	81,73813	12,78631	0,88854	0,80522	0,17023
	AC+	0,00009	0,00000	0,00001	178,83906	0,29705	60,72508	199,63847	0,44581	0,66893	0,22847
	LV-	0,00003	0,00001	0,00000	341,96110	0,84133	125,89220	142,91722	0,44882	0,49203	0,20199
	LV+	0,00003	0,00000	0,00001	203,16079	0,17169	91,13206	80,73523	0,75111	0,17189	0,58964
90 dias	FC-	0,00009	0,00001	0,00001	174,60569	0,87930	146,82953	189,93155	0,09364	0,72480	0,43099
	FC+	0,00009	0,00000	0,00000	536,29058	0,79462	47,39068	73,36599	0,15716	0,22776	0,74775
	AC-	0,00006	0,00001	0,00001	468,06456	0,51871	162,00650	18,69517	0,52043	0,14466	0,61024
	AC+	0,00002	0,00001	0,00001	626,59933	0,25339	168,60394	169,67311	0,70573	0,86410	0,49281
	LV-	0,00002	0,00000	0,00001	313,14651	0,17982	108,99297	125,74230	0,07010	0,55681	0,69527
	LV+	0,00008	0,00000	0,00000	302,01589	0,18110	151,11638	56,64519	0,58377	0,27694	0,76260

(Elaborado pelo autor)

Tabela A1 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF 3M (Continuação)

Amostra		PFDS	PFDoA	PFHpA	PFHpS	PFHxA	PFHxS	PFHxSaAm	PFHxSaAmA	PFNA	PFTeDA	PFOA	PFOS
Tempo inicial	FC-	6,347	0,083	0,184	12,935	31,671	16,650	0,000	0,002	0,001	0,010	20,249	4360,324
	FC+	0,373	0,011	0,683	10,498	29,007	332,166	0,000	0,001	0,002	0,047	24,641	2312,347
	AC-	8,413	0,037	0,741	14,784	39,407	69,444	0,000	0,001	0,003	0,050	22,213	4651,020
	AC+	7,993	0,052	0,596	16,062	32,562	389,059	0,000	0,001	0,001	0,021	26,871	3338,731
	LV-	8,267	0,032	0,330	18,307	29,249	138,328	0,000	0,001	0,003	0,039	39,262	1805,615
	LV+	2,781	0,026	0,243	15,498	30,276	150,831	0,000	0,002	0,001	0,036	38,906	2141,376
30 dias	FC-	1,928	0,033	0,722	14,542	37,596	117,520	0,000	0,001	0,003	0,073	38,962	1618,663
	FC+	2,423	0,084	0,485	12,032	20,139	287,221	0,000	0,001	0,002	0,053	32,021	3026,342
	AC-	6,691	0,028	0,718	19,541	27,246	343,156	0,000	0,002	0,003	0,029	21,234	2858,114
	AC+	5,222	0,082	0,620	10,420	21,117	233,780	0,000	0,002	0,002	0,039	37,091	4148,308
	LV-	2,826	0,010	0,710	19,395	15,745	31,348	0,000	0,003	0,001	0,037	30,956	2358,209
	LV+	6,030	0,027	0,832	15,874	25,058	43,954	0,000	0,003	0,003	0,013	32,526	1455,346
60 dias	FC-	4,278	0,078	0,745	10,549	13,927	309,807	0,000	0,002	0,003	0,039	26,229	2467,915
	FC+	2,650	0,085	0,367	13,405	35,590	43,331	0,000	0,003	0,002	0,085	21,509	4506,522
	AC-	1,749	0,020	0,817	11,495	11,587	245,976	0,000	0,003	0,001	0,047	23,624	3418,354
	AC+	1,771	0,070	0,248	18,606	32,740	122,580	0,000	0,001	0,002	0,081	25,049	3648,007
	LV-	5,638	0,065	0,625	19,803	13,172	73,706	0,000	0,002	0,001	0,021	37,342	3363,538
	LV+	5,122	0,048	0,445	19,795	37,022	182,477	0,000	0,003	0,001	0,070	29,574	1209,976
90 dias	FC-	7,632	0,065	0,506	11,701	36,169	238,174	0,000	0,003	0,002	0,081	32,675	1613,482
	FC+	0,769	0,084	0,052	18,740	17,608	122,648	0,000	0,002	0,002	0,074	35,486	1913,539
	AC-	7,617	0,076	0,766	11,043	16,466	223,503	0,000	0,001	0,003	0,035	28,992	2210,178
	AC+	8,799	0,016	0,849	12,913	37,043	234,804	0,000	0,003	0,002	0,021	29,365	2397,388
	LV-	3,638	0,004	0,751	12,704	23,788	175,946	0,000	0,003	0,002	0,075	39,831	4152,361
	LV+	3,038	0,048	0,743	19,171	12,348	291,560	0,000	0,002	0,001	0,041	21,422	4882,927

(Elaborado pelo autor)

Tabela A2 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF Ansul

Amostra		5:1:2 FtB	5:3 FtB	6:2 FtTAoS	62Z-FAS	6:2 FtS	6:2 FtSaB	6:2 FtTHN+	7:1:2 FtB	7:3 FtB	82Z-FAS	8:2 FtS
Tempo inicial	FC-	0,649	0,359	4927,421	0,000	170,851	195,008	31,117	0,465	0,000	0,000	0,482
	FC+	0,738	0,336	4422,910	0,000	176,900	162,129	22,245	0,813	0,000	0,000	0,620
	AC-	0,129	0,270	4309,990	0,000	184,484	167,557	19,858	0,301	0,000	0,000	0,845
	AC+	0,346	0,570	4699,931	0,000	158,005	163,614	39,334	0,732	0,000	0,000	0,324
	LV-	0,285	0,806	4513,019	0,000	189,995	166,224	33,830	0,475	0,000	0,000	0,449
	LV+	0,041	0,145	4708,904	0,000	188,578	182,095	12,466	0,369	0,000	0,000	0,118
30 dias	FC-	0,229	0,128	4177,920	0,000	150,313	177,090	20,794	0,405	0,000	0,000	0,301
	FC+	0,074	0,523	4864,065	0,000	193,795	182,298	10,862	0,655	0,000	0,000	0,237
	AC-	0,735	0,077	4791,992	0,000	195,663	183,718	16,588	0,257	0,000	0,000	0,727
	AC+	0,353	0,255	4342,024	0,000	183,107	199,009	30,565	0,502	0,000	0,000	0,138
	LV-	0,790	0,396	11891,642	0,000	402,983	178,798	32,512	0,734	0,000	0,000	0,280
	LV+	0,460	0,606	9198,399	0,000	344,603	153,741	33,474	0,802	0,000	0,000	0,304
60 dias	FC-	0,131	0,809	4151,323	0,000	170,652	179,793	10,056	0,622	0,000	0,000	0,193
	FC+	0,840	0,160	4325,352	0,000	181,678	162,264	27,734	0,306	0,000	0,000	0,305
	AC-	0,040	0,514	4428,844	0,000	181,923	153,116	35,761	0,200	0,000	0,000	0,212
	AC+	0,353	0,470	4367,991	0,000	176,264	183,033	39,671	0,498	0,000	0,000	0,259
	LV-	0,054	0,750	19603,724	0,000	818,912	163,118	16,963	0,690	0,000	0,000	0,874
	LV+	0,106	0,679	19832,276	0,000	644,493	154,481	23,858	0,612	0,000	0,000	0,096
90 dias	FC-	0,621	0,335	4091,927	0,000	179,903	173,079	11,098	0,142	0,000	0,000	0,370
	FC+	0,323	0,206	4566,020	0,000	182,891	158,837	34,603	0,089	0,000	0,000	0,838
	AC-	0,125	0,499	8970,903	0,000	390,951	186,215	31,562	0,035	0,000	0,000	0,221
	AC+	0,576	0,813	8525,133	0,000	391,930	194,249	16,094	0,199	0,000	0,000	0,796
	LV-	0,480	0,117	27464,057	0,000	1250,129	166,600	22,379	0,018	0,000	0,000	0,148
	LV+	0,235	0,130	26361,268	0,000	1138,143	151,092	13,514	0,681	0,000	0,000	0,652

(Elaborado pelo autor)

Tabela A2 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF Ansul (Continuação)

Amostra		9:1:2 FtB	EtFOSA	EtFOSAA	EtFOSE	FHxSA	FOSA	PFBA	PFBS	PFBSaAm	PFBSaAmA	PFDA
Tempo inicial	FC-	0,015	0,000	0,000	0,000	0,311	0,000	0,036	0,617	0,743	0,763	0,202
	FC+	0,070	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,007	0,894	0,125	0,151	0,463
	AC-	0,077	0,000	0,000	0,000	0,236	0,000	0,082	0,545	0,172	0,750	0,258
	AC+	0,062	0,000	0,000	0,000	0,320	0,000	0,034	0,266	0,647	0,365	0,156
	LV-	0,018	0,000	0,000	0,000	0,808	0,000	0,087	0,623	0,110	0,478	0,798
	LV+	0,084	0,000	0,000	0,000	0,156	0,000	0,027	0,021	0,782	0,404	0,087
30 dias	FC-	0,019	0,000	0,000	0,000	0,363	0,000	0,002	0,523	0,818	0,376	0,403
	FC+	0,068	0,000	0,000	0,000	0,720	0,000	0,030	0,130	0,544	0,745	0,333
	AC-	0,005	0,000	0,000	0,000	0,630	0,000	0,087	0,533	0,595	0,156	0,011
	AC+	0,087	0,000	0,000	0,000	0,373	0,000	0,049	0,682	0,748	0,291	0,702
	LV-	0,012	0,000	0,000	0,000	0,811	0,000	0,051	0,037	0,338	0,610	0,429
	LV+	0,066	0,000	0,000	0,000	0,753	0,000	0,062	0,057	0,564	0,888	0,123
60 dias	FC-	0,072	0,000	0,000	0,000	0,251	0,000	0,046	0,436	0,748	0,122	0,536
	FC+	0,042	0,000	0,000	0,000	0,415	0,000	0,015	0,275	0,848	0,790	0,229
	AC-	0,038	0,000	0,000	0,000	0,619	0,000	0,055	0,445	0,446	0,271	0,302
	AC+	0,052	0,000	0,000	0,000	0,896	0,000	0,069	0,036	0,614	0,482	0,045
	LV-	0,070	0,000	0,000	0,000	0,415	0,000	0,004	0,303	0,367	0,655	0,716
	LV+	0,009	0,000	0,000	0,000	0,273	0,000	0,024	0,047	0,655	0,526	0,408
90 dias	FC-	0,070	0,000	0,000	0,000	0,357	0,000	0,053	0,323	0,328	0,043	0,284
	FC+	0,005	0,000	0,000	0,000	0,283	0,000	0,077	0,821	0,852	0,663	0,262
	AC-	0,051	0,000	0,000	0,000	0,526	0,000	0,072	0,133	0,441	0,443	0,585
	AC+	0,032	0,000	0,000	0,000	0,448	0,000	0,042	0,405	0,768	0,210	0,817
	LV-	0,032	0,000	0,000	0,000	0,240	0,000	0,031	0,622	0,502	0,169	0,671
	LV+	0,052	0,000	0,000	0,000	0,320	0,000	0,026	0,689	0,246	0,097	0,018

(Elaborado pelo autor)

Tabela A2 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) em experimentos piloto com AFFF Ansul (Continuação)

Amostra		PFDS	PFDoA	PFHpA	PFHpS	PFHxA	PFHxS	PFHxSaAm	PFHxSaAmA	PFNA	PFTeDA	PFOA	PFOS
Tempo inicial	FC-	0,037	0,064	0,527	17,513	38,245	315,720	12,397	19,414	0,002	0,083	33,396	357,312
	FC+	0,084	0,079	0,884	18,016	31,174	311,670	13,245	14,687	0,001	0,011	38,414	380,414
	AC-	0,058	0,017	0,207	16,354	32,219	369,493	17,715	11,017	0,001	0,019	34,087	333,094
	AC+	0,063	0,010	0,130	10,542	33,423	382,893	18,010	17,403	0,003	0,086	33,238	372,606
	LV-	0,078	0,047	0,369	15,008	39,429	330,602	15,314	10,035	0,003	0,010	35,918	347,929
	LV+	0,073	0,030	0,727	13,333	32,140	312,710	18,484	17,093	0,003	0,076	32,204	364,470
30 dias	FC-	0,071	0,060	0,045	17,800	39,329	370,569	10,588	18,653	0,002	0,019	38,601	354,481
	FC+	0,055	0,079	0,071	12,740	31,178	375,181	19,473	17,984	0,001	0,038	35,255	323,235
	AC-	0,085	0,046	0,877	10,539	37,535	326,512	10,347	17,477	0,002	0,060	33,327	360,843
	AC+	0,061	0,020	0,734	10,010	31,760	351,802	11,100	12,885	0,001	0,060	23,759	336,747
	LV-	0,010	0,073	0,250	12,936	70,001	337,721	14,052	19,875	0,002	0,040	20,486	360,812
	LV+	0,037	0,075	0,652	16,972	83,938	390,674	18,902	13,091	0,002	0,023	35,143	339,053
60 dias	FC-	0,027	0,039	0,826	14,759	32,488	397,513	13,143	13,003	0,002	0,029	30,094	303,436
	FC+	0,052	0,067	0,775	18,297	37,310	378,891	11,498	18,917	0,002	0,036	38,447	317,533
	AC-	0,046	0,045	0,458	19,845	38,870	394,991	19,230	11,899	0,001	0,025	28,478	355,217
	AC+	0,010	0,075	0,590	17,809	39,871	379,937	17,679	18,624	0,001	0,024	32,585	301,697
	LV-	0,036	0,032	0,019	12,960	120,855	367,359	19,311	17,607	0,002	0,058	30,690	326,374
	LV+	0,037	0,012	0,438	15,013	163,478	306,990	12,106	10,954	0,002	0,013	35,614	370,076
90 dias	FC-	0,055	0,053	0,578	19,653	38,007	309,403	16,086	11,395	0,001	0,086	35,556	350,832
	FC+	0,075	0,062	0,380	13,258	39,905	350,446	17,706	17,839	0,003	0,031	38,407	333,893
	AC-	0,065	0,084	0,153	16,331	79,269	365,120	10,624	19,678	0,001	0,087	28,976	391,481
	AC+	0,054	0,056	0,404	15,996	65,140	318,069	14,860	10,160	0,001	0,078	29,044	328,023
	LV-	0,012	0,020	0,834	19,556	221,685	385,453	17,016	17,748	0,002	0,018	30,781	308,936
	LV+	0,062	0,021	0,799	12,437	181,585	310,244	12,547	15,529	0,001	0,014	27,614	318,024

(Elaborado pelo autor)

Tabela A3 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) nos ensaios de anaerobiose com AFFF Ansul

Amostra		5:1:2 FtB	5:3 FtB	6:2 FtTAoS	62Z-FAS	6:2 FtS	6:2 FtSaB	6:2 FtTHN+	7:1:2 FtB	7:3 FtB	82Z-FAS	8:2 FtS
Tempo inicial	FC-	0,354	0,680	4481,810	0,000	152,281	176,268	34,659	0,235	0,000	0,000	0,071
	FC+	0,380	0,526	4902,141	0,000	159,100	188,990	35,464	0,103	0,000	0,000	0,343
	AC-	0,285	0,370	4256,045	0,000	175,657	182,313	35,472	0,553	0,000	0,000	0,629
	AC+	0,682	0,546	4325,219	0,000	156,815	190,871	21,737	0,592	0,000	0,000	0,579
	LV-	0,641	0,375	4446,465	0,000	199,411	158,480	15,084	0,197	0,000	0,000	0,502
	LV+	0,421	0,169	4587,526	0,000	161,833	161,029	24,094	0,025	0,000	0,000	0,065
30 dias	FC-	0,037	0,896	4520,892	0,000	186,974	168,491	16,714	0,730	0,000	0,000	0,422
	FC+	0,202	0,247	4983,144	0,000	152,878	165,139	18,435	0,380	0,000	0,000	0,102
	AC-	0,858	0,407	4072,854	0,000	183,740	170,081	29,518	0,798	0,000	0,000	0,132
	AC+	0,370	0,130	4094,522	0,000	179,346	185,635	39,976	0,180	0,000	0,000	0,079
	LV-	0,146	0,856	4937,255	0,000	174,059	164,576	35,896	0,296	0,000	0,000	0,751
	LV+	0,130	0,461	4112,133	0,000	150,515	190,549	19,926	0,477	0,000	0,000	0,442
60 dias	FC-	0,424	0,060	4112,233	0,000	177,858	165,840	25,928	0,793	0,000	0,000	0,110
	FC+	0,092	0,459	4577,153	0,000	176,939	174,800	11,721	0,830	0,000	0,000	0,332
	AC-	0,849	0,499	4087,181	0,000	165,662	197,078	32,817	0,290	0,000	0,000	0,738
	AC+	0,702	0,126	4627,628	0,000	198,721	163,418	21,824	0,127	0,000	0,000	0,036
	LV-	0,590	0,654	4790,601	0,000	163,778	192,813	16,462	0,417	0,000	0,000	0,320
	LV+	0,073	0,293	4724,535	0,000	176,300	168,732	18,814	0,178	0,000	0,000	0,470
90 dias	FC-	0,286	0,238	4049,501	0,000	171,320	193,300	18,005	0,492	0,000	0,000	0,597
	FC+	0,528	0,451	4625,230	0,000	182,133	164,893	14,895	0,638	0,000	0,000	0,615
	AC-	0,065	0,083	4595,418	0,000	182,440	181,404	17,132	0,612	0,000	0,000	0,857
	AC+	0,460	0,294	4712,821	0,000	174,373	171,217	15,290	0,171	0,000	0,000	0,402
	LV-	0,399	0,386	4857,848	0,000	167,152	168,333	35,464	0,286	0,000	0,000	0,070
	LV+	0,851	0,611	4948,144	0,000	191,712	152,731	32,065	0,380	0,000	0,000	0,364

(Elaborado pelo autor)

Tabela A3 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) nos ensaios de anaerobiose com AFFF Ansul (Continuação)

Amostra		9:1:2 FtB	EtFOSA	EtFOSAA	EtFOSE	FHxSA	FOSA	PFBA	PFBS	PFBSaAm	PFBSaAmA	PFDA
Tempo inicial	FC-	0,057	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,024	0,537	0,878	0,016	0,350
	FC+	0,086	0,000	0,000	0,000	0,733	0,000	0,017	0,780	0,123	0,677	0,020
	AC-	0,052	0,000	0,000	0,000	0,869	0,000	0,001	0,737	0,197	0,529	0,080
	AC+	0,067	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,090	0,800	0,609	0,672	0,795
	LV-	0,066	0,000	0,000	0,000	0,379	0,000	0,025	0,241	0,435	0,458	0,685
	LV+	0,033	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,067	0,410	0,705	0,327	0,134
30 dias	FC-	0,018	0,000	0,000	0,000	0,866	0,000	0,080	0,471	0,372	0,583	0,254
	FC+	0,047	0,000	0,000	0,000	0,578	0,000	0,079	0,653	0,758	0,860	0,320
	AC-	0,063	0,000	0,000	0,000	0,332	0,000	0,019	0,586	0,614	0,188	0,347
	AC+	0,051	0,000	0,000	0,000	0,339	0,000	0,045	0,750	0,173	0,645	0,044
	LV-	0,058	0,000	0,000	0,000	0,523	0,000	0,074	0,267	0,584	0,456	0,847
	LV+	0,087	0,000	0,000	0,000	0,684	0,000	0,064	0,476	0,878	0,584	0,884
60 dias	FC-	0,087	0,000	0,000	0,000	0,191	0,000	0,039	0,053	0,323	0,373	0,837
	FC+	0,089	0,000	0,000	0,000	0,245	0,000	0,053	0,277	0,018	0,737	0,356
	AC-	0,003	0,000	0,000	0,000	0,662	0,000	0,057	0,137	0,312	0,558	0,599
	AC+	0,018	0,000	0,000	0,000	0,089	0,000	0,029	0,164	0,366	0,677	0,321
	LV-	0,018	0,000	0,000	0,000	0,545	0,000	0,060	0,670	0,898	0,502	0,672
	LV+	0,080	0,000	0,000	0,000	0,819	0,000	0,014	0,047	0,528	0,213	0,487
90 dias	FC-	0,018	0,000	0,000	0,000	0,243	0,000	0,023	0,564	0,589	0,474	0,495
	FC+	0,056	0,000	0,000	0,000	0,464	0,000	0,027	0,425	0,887	0,639	0,605
	AC-	0,043	0,000	0,000	0,000	0,680	0,000	0,016	0,166	0,488	0,865	0,782
	AC+	0,085	0,000	0,000	0,000	0,328	0,000	0,029	0,865	0,614	0,708	0,234
	LV-	0,075	0,000	0,000	0,000	0,845	0,000	0,012	0,458	0,330	0,338	0,393
	LV+	0,057	0,000	0,000	0,000	0,307	0,000	0,020	0,162	0,192	0,667	0,426

(Elaborado pelo autor)

Tabela A3 – Concentração de PFCs (μg.L^{-1}) nos ensaios de anaerobiose com AFFF Ansul (Continuação)

Amostra		PFDS	PFDoA	PFHpA	PFHpS	PFHxA	PFHxS	PFHxSaAm	PFHxSaAmA	PFNA	PFTeDA	PFOA	PFOS
Tempo inicial	FC-	0,039	0,003	0,177	13,815	39,875	353,854	16,065	18,852	0,002	0,067	21,064	374,857
	FC+	0,017	0,003	0,419	15,964	33,428	328,965	18,175	14,419	0,002	0,011	20,998	323,515
	AC-	0,005	0,046	0,454	13,106	33,710	367,347	18,753	17,161	0,003	0,071	21,923	304,942
	AC+	0,078	0,052	0,255	14,981	30,739	336,676	17,162	16,267	0,002	0,027	33,975	316,003
	LV-	0,089	0,088	0,724	14,499	35,910	379,480	17,818	15,126	0,002	0,089	30,826	315,078
	LV+	0,041	0,039	0,437	13,966	39,843	329,964	19,367	19,500	0,002	0,082	30,030	350,555
30 dias	FC-	0,084	0,005	0,859	19,525	36,342	365,263	17,788	10,598	0,002	0,062	20,117	341,220
	FC+	0,081	0,083	0,431	19,788	30,450	325,693	10,566	14,284	0,001	0,073	22,407	386,696
	AC-	0,063	0,071	0,806	10,281	33,824	394,690	10,781	15,564	0,001	0,036	38,078	341,211
	AC+	0,072	0,043	0,440	15,120	30,508	358,783	13,853	13,419	0,003	0,024	21,154	319,828
	LV-	0,028	0,035	0,391	11,296	33,434	372,374	12,615	12,367	0,003	0,046	38,973	334,652
	LV+	0,062	0,015	0,771	14,776	32,284	364,729	15,732	19,063	0,001	0,047	34,174	342,335
60 dias	FC-	0,024	0,042	0,343	11,451	32,656	358,878	10,192	11,894	0,001	0,032	23,302	336,524
	FC+	0,076	0,058	0,236	18,592	37,419	378,991	10,766	11,580	0,002	0,086	32,976	398,993
	AC-	0,051	0,086	0,824	16,120	36,261	309,446	18,970	17,689	0,002	0,035	26,675	324,444
	AC+	0,020	0,023	0,514	12,019	36,426	379,182	11,580	19,621	0,002	0,031	22,852	303,146
	LV-	0,031	0,002	0,674	17,589	33,877	319,803	10,085	12,372	0,003	0,011	37,695	374,035
	LV+	0,047	0,063	0,310	14,408	36,338	311,171	10,741	12,280	0,003	0,044	38,205	303,336
90 dias	FC-	0,010	0,035	0,854	18,113	32,192	308,552	12,088	11,148	0,001	0,076	22,337	370,417
	FC+	0,082	0,010	0,684	11,562	35,722	346,515	16,899	15,310	0,002	0,056	30,392	377,755
	AC-	0,026	0,041	0,313	14,162	33,979	386,040	17,914	16,456	0,003	0,014	20,410	391,530
	AC+	0,063	0,078	0,579	11,692	30,760	353,427	19,367	10,226	0,003	0,017	39,576	348,469
	LV-	0,046	0,085	0,667	18,554	38,509	394,191	15,379	13,401	0,002	0,084	36,510	322,743
	LV+	0,055	0,019	0,458	10,635	38,818	321,712	17,633	16,432	0,003	0,064	21,589	350,841

(Elaborado pelo autor)

Apêndice B – Dados de GC-FID

Tabela A4 – Concentração de benzeno (mM) em experimentos piloto com AFFF 3M

Tempo	MC+	FC+	AC+	SC+	LV+
Inicial	1,46	1,54	1,41	1,64	1,75
7	1,57	1,67	1,55	0,63	0,41
14	1,67	1,50	1,70	0,20	0,10
21	3,52	3,45	3,70	1,55	1,63
28	3,09	4,15	4,30	0,54	0,40
35	3,12	2,99	2,97	0,16	0,21
42	4,93	5,03	4,41	1,55	1,74
49	4,81	5,05	4,64	0,10	0,21
56	4,74	4,56	4,47	0,93	0,84
63	5,24	5,93	5,02	0,09	0,10
70	5,10	5,19	5,08	0,93	0,97
77	6,25	6,26	6,23	0,14	0,01
84	6,35	6,23	6,31	0,14	0,06

(Elaborado pelo autor)

Tabela A5 – Concentração de benzeno (mM) em ensaios de aerobiose com AFFF Ansul

Tempo	MC+	FC+	AC+	SCA+	SCB+	LVA+	LVB+
Inicial	1,41	1,61	1,58	1,76	1,76	1,40	1,66
7	1,68	1,62	1,46	0,80	0,68	0,75	0,87
14	1,56	1,49	1,59	0,16	0,24	0,24	0,20
21	3,67	3,50	4,03	1,55	1,55	1,40	1,71
28	3,51	3,29	3,42	0,81	0,60	0,61	0,43
35	3,40	3,78	3,03	0,15	0,12	0,13	0,21
42	4,71	4,54	4,59	1,60	1,68	1,67	1,50
49	4,83	4,80	5,04	0,11	0,18	0,17	0,25
56	5,03	4,90	4,79	0,88	0,90	0,92	0,91
63	6,11	5,93	6,02	0,07	0,09	0,13	0,08
70	5,76	5,79	5,56	0,86	0,93	0,94	0,88
77	6,26	6,39	6,23	0,03	0,05	0,10	0,09
84	6,20	6,20	6,30	0,05	0,01	0,03	0,03

(Elaborado pelo autor)

Tabela A6 – Concentração de tolueno (mM) em ensaios de aerobiose com AFFF Ansul

Tempo	MC+	FC+	AC+	SCA+	SCB+	LVA+	LVB+
Inicial	1,45	1,40	1,51	1,69	1,64	1,52	1,58
7	1,54	1,61	1,43	0,69	0,84	0,57	0,45
14	1,56	1,40	1,57	0,15	0,10	0,12	0,10
21	3,04	4,27	3,84	1,44	1,60	1,73	1,52
28	4,37	3,89	2,95	0,70	0,46	0,51	0,58
35	4,12	4,22	3,78	0,22	0,17	0,16	0,22
42	4,46	4,63	5,03	1,76	1,69	1,68	1,41
49	4,84	4,54	4,53	0,10	0,19	0,10	0,16
56	4,66	4,53	4,78	0,83	0,81	1,00	0,98
63	5,67	5,18	6,05	0,03	0,03	0,01	0,02
70	5,13	5,14	5,85	0,92	0,85	0,85	0,94
77	6,38	6,29	6,21	0,10	0,07	0,07	0,12
84	6,33	6,38	6,30	0,11	0,04	0,11	0,09

(Elaborado pelo autor)

Tabela A7 – Concentração de etil-benzeno (mM) em ensaios de aerobiose com AFFF Ansul

Tempo	MC+	FC+	AC+	SCA+	SCB+	LVA+	LVB+
Inicial	1,61	1,52	1,57	1,47	1,56	1,72	1,75
7	1,67	1,67	1,69	0,77	0,63	0,53	0,57
14	1,55	1,60	1,55	0,14	0,13	0,12	0,14
21	3,19	3,22	3,44	1,43	1,65	1,42	1,75
28	3,51	3,52	3,62	0,72	0,92	0,99	0,79
35	3,41	3,92	3,40	0,12	0,19	0,23	0,14
42	4,49	4,66	4,77	1,64	1,80	1,64	1,79
49	4,55	4,90	5,07	0,11	0,10	0,15	0,18
56	4,87	4,87	4,52	0,96	0,84	0,95	0,93
63	6,14	5,69	5,15	0,03	0,01	0,06	0,12
70	5,55	5,45	5,49	0,86	0,89	0,99	0,88
77	6,21	6,21	6,26	0,11	0,05	0,10	0,15
84	6,21	6,24	6,20	0,03	0,02	0,04	0,01

(Elaborado pelo autor)

Tabela A8 – Concentração de o-xileno (mM) em ensaios de aerobiose com AFFF Ansul

Tempo	MC+	FC+	AC+	SCA+	SCB+	LVA+	LVB+
Inicial	1,50	1,60	1,63	1,66	1,76	1,54	1,73
7	1,40	1,54	1,55	0,60	0,62	0,53	0,72
14	1,44	1,50	1,49	0,14	0,22	0,19	0,23
21	3,85	3,42	3,83	1,73	1,55	1,53	1,74
28	3,78	3,77	3,58	0,73	0,45	0,54	0,68
35	3,48	3,49	3,71	0,25	0,21	0,10	0,25
42	4,80	4,73	4,96	1,44	1,46	1,66	1,58
49	4,49	4,80	4,95	0,12	0,22	0,13	0,13
56	4,56	4,78	4,69	0,81	0,94	0,89	0,82
63	5,98	5,43	5,40	0,02	0,02	0,07	0,02
70	5,44	5,28	5,95	0,81	0,83	0,94	0,85
77	6,28	6,22	6,40	0,06	0,01	0,05	0,05
84	6,29	6,27	6,27	0,03	0,04	0,04	0,02

(Elaborado pelo autor)

Tabela A9 – Concentração de benzeno (mM) nos ensaios de anaerobiose com AFFF Ansul

Tempo	MC+	FC+	AC+	SCA+	SCB+	LVA+	LVB+
Inicial	1,46	1,55	1,42	1,56	1,40	1,45	1,52
7	1,46	1,59	1,51	1,60	1,51	1,54	1,53
14	1,44	1,48	1,50	1,49	1,44	1,53	1,48
21	1,44	1,51	1,52	1,46	1,53	1,49	1,59
28	1,42	1,41	1,45	1,43	1,54	1,59	1,52
35	1,46	1,58	1,40	1,41	1,60	1,43	1,60
42	1,55	1,49	1,49	1,49	1,55	1,59	1,59
49	1,43	1,50	1,54	1,55	1,54	1,53	1,60
56	1,45	1,53	1,55	1,59	1,58	1,42	1,40
63	1,53	1,46	1,43	1,40	1,40	1,55	1,50
70	1,36	1,36	1,28	1,33	1,34	1,33	1,33
77	1,38	1,28	1,40	1,36	1,39	1,40	1,36
84	1,34	1,31	1,36	1,25	1,35	1,32	1,28

(Elaborado pelo autor)

Apêndice C – Dados de respirometria

Tabela A10 – Produção semanal de CO_2 medida por titulação (mg.semana^{-1}) e condutividade (µmol.semana^{-1})

Tempo	Controle		AFFF		Gasolina		Biodegradação	
	µmol	mg	µmol	mg	µmol	mg	µmol	mg
1	30,63232	1,747822	19,78337	2,270468	25,52693	1,523185	24,25059	2,267026
7	45,31031	3,493653	204,2155	9,785481	269,6282	12,86364	144,5463	6,660035
14	52,17067	2,795509	313,5027	14,19412	489,3194	23,33005	200,7055	9,731043
21	59,03103	3,697365	390,8812	17,39877	613,2846	28,98452	575,9514	26,14186
28	48,18209	2,720012	399,4965	18,87785	232,2951	10,92098	724,3267	32,97038
35	47,70346	3,898952	357,5366	17,43161	98,75732	5,545322	595,2562	27,09127
42	47,22483	3,377892	315,5767	14,58538	92,85422	5,385586	604,0311	27,97737
49	23,29333	---	198,4719	---	65,41277	---	631,5984	---
56	20,262	---	174,0618	---	59,82875	---	482,1063	---
63	20,262	---	174,0618	---	59,82875	---	514,015	---
70	17,23068	---	117,743	---	54,24473	---	428,3402	---
77	38,2904	---	90,9397	---	59,66921	---	291,7711	---
84	30,15369	---	84,23888	---	59,03103	---	231,3042	---
91	30,15369	---	84,23888	---	59,03103	---	295,1215	---
98	22,01698	---	77,53806	---	58,39286	---	102,7459	---
105	26,80328	---	57,4356	---	57,4356	---	84,55797	---

(Elaborado pelo autor)

Apêndice D – Dados de fito-toxicidade

Tabela A11 – Germinação de alface (%) em diferentes concentrações de AFFF

Tempo (dias) / AFFF	0	60	120
0	95	85	90
0,1	30	55	65
1	45	80	70
10	5	5	35

(Elaborado pelo autor)

Tabela A12 – Germinação de rúcula (%) em diferentes concentrações de AFFF

Tempo (dias) / AFFF	0	60	120
0	100	95	90
0,1	20	40	55
1	40	40	60
10	5	5	0

(Elaborado pelo autor)

Anexo

Especificação técnica da AFFF pelo fabricante:

- Ansul
- Sintex

gifel®
engenharia de incêndio
Certificada ISO 9001

ANSULITE 3% AFFF

DESCRIÇÃO

O concentrado ANSULITE 3% AFFF é um líquido sintético, não-tóxico, não-corrosivo, biodegradável, formulado a partir de surfactantes fluorados e hidrocarbonados.

ANSULITE 3% AFFF foi projetado para ser utilizado na proporção de 3% em água doce ou do mar, ou mesmo salobra. A dureza da água, entretanto, não deve ser superior a 500 ppm expresso em Cálcio ou Magnésio. Também pode ser armazenado como pré-mistura em água doce, para uso em extintores.

Para correta dosagem a 3%, misturar 3 partes do concentrado a 97 partes de água.

São três os mecanismos de extinção de incêndio em líquidos inflamáveis do ANSULITE 3% AFFF:

Primeiro, em derivados de petróleo (como gasolina , diesel, etc.), um filme aquoso é formado a partir da espuma, para impedir a liberação de vapores.

***Importante:* O ANSULITE 3% AFFF não deve ser utilizado em solventes polares (tais como álcools, acetonas, etc.),**

Segundo, um colchão de espuma é formado isolando o oxigênio da superfície do combustível e regenerando constantemente o filme aquoso.

Terceiro, a água existente na espuma, drena e, resfria as superfícies metálicas.

PROPRIEDADES

Expansão
Quando utilizada com água doce ou do mar, na proporção recomendada, a expansão da espuma irá variar de acordo com o equipamento utilizado. Sistemas de descarga com aspiração de ar produzem uma expansão entre 6:1 e 10:1, dependendo do sistema e da velocidade da solução.

Sistemas sem aspiração de ar, promoverão uma expansão na ordem de 2:1 a 4:1

Proporcionamento e Utilização
ANSULITE 3% AFFF pode ser facilmente proporcionado com a maioria dos sistemas de dosagem convencionais, tais como:
- Edutores de linha portáteis ou fixos;
- Tanques diafragma;
- Sistemas de pressão balanceada;
- Esguichos com proporcionadores acoplados.

As temperaturas mínima e máxima de utilização do ANSULITE 3% AFFF são 2°C e 49°C, respectivamente. A utilização do produto fora desta faixa de temperatura poderá ocasionar em alteração de sua performance.

Vida Útil
Quando armazenado em sua embalagem original, ou em recipientes adequados, a expectativa de vida útil do concentrado ANSULITE 3% AFFF é superior a vinte anos. Fatores como temperatura, condições de armazenagem, e manuseio, podem alterar esta expectativa.

Quando armazenado em tanque atmosférico, como parte de um sistema de combate a incêndio, sob nenhuma hipótese, deve-se pintar a parede interna do tanque onde será armazenado o concentrado.

ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA

CARACTERÍSTICAS

Propriedades físico-químicas (25°C)

Aparência	Líquido Amarelado
Densidade	1,011 ± 0,050 g/ml
pH	7,5
Índice de Refração	1,3640 ± 0,0020
Coeficiente de Espalhamento	5,7 ± 1,5

Compatibilidade Entre Concentrados
Em função do concentrado ANSULITE 3% AFFF possuir uma formulação especial, recomenda-se não mistura-lo com concentrados de outros fabricantes. Sob nenhuma hipótese deve-se armazenar o ANSULITE 3% AFFF misturado com concentrados de outra família (i.e. Proteínas, Fluor-proteínas, etc.)

Compatibilidade com Materiais de Construção
Testes efetuados com ANSULITE 3% AFFF demonstraram sua compatibilidade com diversos materiais de construção. Os materiais recomendados para as diversas aplicações são:
- Tanques de Armazenagem;
- Fibra de Vidro - Resina Epoxi ca ou Isoftálica;
- Polietileno de Alta Densidade;
- Aço Inox 304 ou 316;
- Aço Carbono - Sem revestimento interno;
- Tubulação para o Concentrado;
- Bronze;
- Aço Inox 304 ou 316;
- PVC;
- Fibra de Vidro;
- Aço Carbono.

Tubulações em aço galvanizado não deverão ser utilizadas. Poderá ocorrer corrosão

INSPEÇÃO
Como todo agente extintor, o concentrado ANSULITE 3% AFFF deve, independente da condição de armazenagem, ser inspecionado periodicamente a fim de garantir-se sua qualidade para uso quando necessário. É recomendado uma inspeção anual.

TESTES DE FOGO COM ANSULITE 3% AFFF

A tabela abaixo demonstra a excelente capacidade de extinção do ANSULITE 3% AFFF. Os testes foram realizados de acordo com as normas MIL-F-24385-C (Military Specification) e Underwriters Laboratories UL-162.

Método	MIL - F - 24385 - C		UL - 162	
	Teste	Limite	Teste	Limite
Área de Fogo	2,6	-	4,7	
Combustível	Gasolina	-	N-heptano	
Quantidade (litros)	38	-	240	
Taxa de Aplicação (Lpm/m²)	2,9	-	1,6	
Tempo de Aplicação (s)	90	-	180	
Tempo de Pré Queima (s)	10	-	60	
Tempo de Extinção (s)	23	<30	143	<180
Tempo de Resistência a Reignição (s)	469	>360	O.K.	Sem Reignição
Tempo de Drenagem 25% (s)	275	>150	310	>150
Taxa de Expansão	7,7:1	>6	7,4	6

(*) Taxa de projeto utiliza um fator de segurança de 5/3 relativo ao teste

APLICAÇÃO & USO

APLICAÇÃO

O concentrado ANSULITE 3% AFFF é uma espuma formadora de filme aquoso, sintética, projetada para prevenir e combater incêndios da "Classe B", em hidrocarbonetos (querosene, gasolina, diesel, xilol, toluol, etc.). Suas excelentes características de umectação, fazem-no útil também para o combate a incêndios da "Classe A" (madeira, papel, algodão, tecidos, etc.).

ANSULITE 3% AFFF deve ser misturado, com água doce ou do mar, na proporção de 3% de concentrado para 97% de água, para combate a incêndios de derivados de petróleo, podendo ser aplicado por equipamentos com ou sem aspiração de ar.

Além disto, o ANSULITE 3% AFFF é compatível com o pó químico seco, podendo ser utilizado em conjunto, aumentando assim sua capacidade extintora.

APROVAÇÕES

O concentrado ANSULITE 3% AFFF é aprovado pela Underwriters Laboratories através da norma UL-162 - Standard for Air Foam Equipment & Liquid Concentrates, tendo sido submetida a provas que incluem:
1 - Teste de Qualidade do Concentrado;
2 - Teste de Fogo com Hidrocarbonetos;
3 - Teste de identificação da Espuma;
4 - Teste de Embalagem;
5 - Teste em Sprinklers para Solventes Polares e Hidrocarbonetos;

Também atende aos parâmetros da norma MIL-F-24385 C (U.S. Military Specification).

A qualidade do ANSULITE 3% AFFF é garantida pela ISO 9002 - Lloyds Register Quality Assurance - Certificado 102.388

EMBALAGENS

Bombonas plásticas de 20 litros ou Tambores plásticos de 208 litros. Embalagens especiais poderão ser fornecidas mediante consulta.

ANSULITE 3% AFFF é Marca Registrada de ANSUL.

***OBS.:** Os dados acima poderão sofrer alterações sem prévio aviso.*

GIFEL ENGENHARIA DE INCÊNDIO LTDA
C.Postal 54 - CEP: 13315-000 - Cabreúva - S. Paulo - Brasil - Tel: 11 - 4529-7511 - Fax: 11-4529-7534 - Web: www.gifel.com.br - e-mail: gifel@gifel.com.br

Líquido Gerador de Espuma Sintex AFFF 1%

Descrição

O Sintex® AFFF 1% é um Líquido Gerador de Espuma (LGE), não tóxico e biodegradável, composto de tensoativos fluorados, hidrocarbonos, e solventes. Atende a norma ABNT NBR 15511 para tipo 1, Classe HC - para a extinção de incêndios em hidrocarbonetos. A Norma ABNT NBR 15511, em vigor desde 25/03/08, supera os requisitos da norma Petrobrás N-2142, na qual toda a Linha Sintex AFFF, fabricada pela Kidde Brasil, está aprovada. Os mecanismos de extinção de incêndios empregados pelo LGE Sintex® AFFF são:

- Primeiro: Um filme aquoso é formado para prevenir a liberação de vapores dos derivados de petróleo;
- Segundo: Um colchão de espuma exclui efetivamente o oxigênio da superfície do combustível;
- Terceiro: O líquido drenado da espuma atua resfriando as superfícies metálicas.

Propriedades à 25° C	
Aparência	Líquido transparente
Massa específica (g/ml)	1,05
pH	7,5 - 8,5
Temperatura de armazenamento mínima	2° C
Temperatura de armazenamento máxima	49° C

Aplicação

O Sintex® AFFF 1% é uma espuma formadora de filme aquoso completamente sintética, desenvolvida para prevenir e extinguir incêndios de classe B envolvendo derivados de petróleo (gasolina, querosene, óleo diesel, toluol, xilol, etc.). Suas excelentes características de umectação também o fazem útil no combate a incêndios de classe A (madeira, papel, algodão, tecidos, plásticos, etc.). Além disso, os líquidos geradores de espuma Sintex® AFFF são totalmente compatíveis com o pó químico seco, podendo ser utilizados em conjunto, aumentando assim a capacidade extintora. O LGE Sintex® AFFF 1% deve ser misturado com água doce ou do mar na proporção de 1% de LGE para 99% de água. Em função da baixa energia requerida para a formação de espuma, o Sintex® AFFF 1% pode ser usado em equipamentos com ou sem aspiração de ar.

Renato Nallin Montagnolli

Ederio Dino Bidoia