

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro

KAREN SILVA LUKO

INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO NA
MOBILIDADE DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Rio Claro, SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro

KAREN SILVA LUKO

INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO NA
MOBILIDADE DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos obtenção do título de Doutor em em Geociências e Meio Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Rio Claro, SP

2020

L954i

Luko, Karen Silva

Influência de hidrocarbonetos do petróleo na mobilidade de arsênio em solos tropicais / Karen Silva Luko. -- Rio Claro, 2020

108 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro

Orientador: Amauri Antonio Menegário

1. Biogeoquímica. 2. Química Ambiental. 3. Contaminação do solo por petróleo. 4. Elementos traço no solo. 5. Solos poluição. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

KAREN SILVA LUKO

INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO NA
MOBILIDADE DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos obtenção do título de Doutor em em Geociências e Meio Ambiente.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Prof^a. Dr^a. Anne Hélène Fostier

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Prof. Dr. Marcelo Loureiro Garcia

Prof^a. Dr^a. Vania Silvia Rosolen

Resultado: Aprovada.

Rio Claro/SP, 13 de maio de 2020

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

A Capes e CNPq, pelo apoio financeiro essencial para realização deste trabalho.

À UNESP, por ser minha casa desde 2007 e por todas as experiências me proporcionadas.

Ao Prof. Amauri e ao grupo GEMB pelo conhecimento compartilhado, pelo tempo e paciência dispendidos e pela estrutura disponibilizada durante o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Anne Hélène Fostier, Ederio Dino Bidoia, Marcelo Loureiro Garcia e Vania Silvia Rosolen, por participarem de minha banca, contribuindo para a melhora deste trabalho e para meu crescimento acadêmico.

À Rô por todo suporte e atenção que sempre me proporcionou.

Aos funcionários do CEA, Amanda, Eleni, Gleide, Jorbson, Lu e Miriã, pelo apoio pessoal, técnico e administrativo, essenciais para cumprimento em cada etapa deste processo.

Ao Marcos Cururu, pelo grande suporte nas coletas.

A Alexandre Oliveira e a CIEM, Kadu, Hendryk, Lucas e Siomara, pela ajuda nas coletas.

A meus pais, Tereza e Pedro, pela compreensão e apoio que sempre me ofereceram e que me fizeram chegar até aqui, e por terem me inspirado, desde de muito criança, a seguir o caminho da Ciência.

Às minhas irmãs, Cecília e Cibele, por me apoiarem e sempre terem sido grande exemplo, facilitando minha caminhada.

Ao Everton, por ser um grande exemplo de seriedade e que tanto contribuiu para este trabalho e para que eu chegasse até aqui.

À minha família de acolhimento, Rosa, Vail, Karina, Gilson e Henrique por todo apoio e torcida.

A Carol, Joyce e Lucia, que tanto contribuíram para este trabalho, tanto pela enorme quantidade de horas que disponibilizaram para me ajudar a realizar os testes e coletas, quanto pelo apoio e confiança que sempre me fizeram querer ir além.

A Raiza e Ana Marta por todo apoio e pelas muitas parcerias ao longo de todos esses anos.

A Juliana e Lauren, pela confiança, pelo grande apoio e por tanto terem se esforçado para o crescimento de seus colegas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo n 140625/2017-8)

Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.
Sócrates

INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO NA MOBILIDADE DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS

Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da contaminação por gasolina e diesel na mobilidade das espécies inorgânicas de arsênio no solo. Para tanto, amostras de solo ($n = 25$) foram coletadas em uma área de mineração, uma área de cobertura vegetal e uma área agrícola, e foram contaminadas em laboratório. Foram coletados os extratos de saturação para as amostras dos três tratamentos (controle, gasolina e diesel) e os resultados de arsênio no extrato de saturação obtidos foram comparados através de testes estatísticos não paramétricos e análise multivariada de dados. Foi realizada análise de especiação redox para todas as amostras e o fracionamento químico do arsênio no extrato de saturação do solo para amostras selecionadas através da técnica Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração. As concentrações de arsênio também foram comparadas quanto a parâmetros físicos, químicos e quanto à presença de sete genes funcionais relativos ao metabolismo de arsênio (resistência, oxidação, respiração e metilação) em microorganismos. A adição de gasolina e de diesel resultou no aumento das concentrações de arsênio extraível em água nos solos. O aumento da mobilidade do arsênio em solo na presença dos contaminantes, apesar de significativo, foi menos expressivo quando comparado a outros sistemas (*e.g.* aquífero e áreas úmidas) e outras fontes de matéria orgânica (*e.g.* biocarvão e serapilheira) reportados na literatura. As concentrações de As(III) foram menores em solos urbanos, quando comparadas às obtidas para solos rurais e com cobertura vegetal, possivelmente devida a uma menor atividade microbiológica nos solos urbanos. A respiração basal do solo foi a principal variável de influência na mobilidade de As(III). Uma taxa de biodegradação estimada em aproximadamente 7% foi o suficiente para extrair frações de As(III), antes imobilizadas pela fase sólida, para 60% dos solos estudados. A metilação, importante fator de regulação da concentração de As(III) nos solos não contaminados, não foi significativa quando gasolina ou diesel foram adicionados ao sistema. A relação entre o teor de Mn no solo e As solúvel pode indicar a ocorrência de um mecanismo de reoxidação abiótica de As(III). A adição de gasolina ou diesel aos solos aumentou a fração de arsênio extraível em água em até 20 vezes, porém a adição destes contaminantes não influenciou a fração lábil de arsênio, sendo esta relacionada ao carbono orgânico dissolvido do solo natural do solo.

Palavras-chave: Labilidade. Análise de especiação. Contaminantes orgânicos. Gasolina. Diesel. DGT.

INFLUENCE OF PETROLEUM HYDROCARBONS ON ARSENE MOBILITY IN TROPICAL SOILS

Abstract

The aim of this work was to investigate the influence of gasoline and diesel contamination on the mobility of inorganic arsenic species in soil samples. Soil samples (n = 25) were collected in a mining area, in an area characterized by natural vegetation cover and in an agricultural area. The soil samples were contaminated in laboratory with gasoline and diesel. Saturation extracts were collected from soil subsamples of the three treatments (control, gasoline and diesel) and the results of arsenic concentration in the extracts were analyzed by non-parametric statistical tests and multivariate data analysis. Redox speciation analysis for all samples and chemical fractionation of arsenic were performed in some of the water extracts samples by Diffusive Gradients in Thin Films technique. Arsenic concentrations were compared to physical and chemical parameters as well as to the presence of seven functional genes related to arsenic microbial metabolism (resistance, oxidation, respiration and methylation). The addition of gasoline and diesel to surface soils resulted in an increase in the water extractable arsenic in surface soils. The increased mobility of arsenic in the presence of contaminants, although significant, was less expressive than what has been reported for other systems (e.g. aquifers and wetlands) and other sources of organic materials (e.g. litter and biochar). As(III) concentrations were lower in urban soils when compared to agricultural and vegetation cover soils, possibly due to a less expressive microbiologic activity in urban soils. Basal soil respiration was the main variable influencing As(III) mobility. An estimated biodegradation rate of approximately 7% was sufficient to make As(III) fractions, previously immobilized by solid phase, present in the solution for 60% of the studied soils. Methylation, an important factor in controlling the As(III) concentration in uncontaminated soils, was not significant when gasoline or diesel were introduced in the system. As(III) in the solution was negatively related to the content of Mn in the soil which may indicate an occurrence of an important mechanism of abiotic reoxidation of As (III). The addition of gasoline or diesel to the soils increased the fraction of arsenic extractable in water up to 20-fold. However, the addition of these contaminants did not influence the labile fraction of arsenic, which was strongly influenced by the soil dissolved organic carbon, naturally occurring in soils.

Keywords: Lability. Speciation analysis. Organic contaminants. Gasoline. Diesel. DGT.

Sumário

1	Introdução.....	15
1.2	Objetivo.....	16
1.2.1	Objetivo geral	16
1.2.2	Objetivos específicos	16
2	Revisão Bibliográfica	17
2.1	Comportamento biogeoquímico do arsênio	17
2.2	Conceitos.....	18
2.2.1	Biodisponibilidade	18
2.2.2	Labilidade.....	19
2.2.3	Especiação.....	19
2.2.4	Mobilidade.....	20
2.3	Influência da contaminação por hidrocarbonetos do petróleo na concentração de arsênio.....	21
2.4	Hidrocarbonetos do petróleo.....	24
3	Área de estudo	26
3.1	Vale do Ribeira (SP).....	26
3.1.1	Arsênio no Vale do Ribeira.....	27
4	Material e Métodos	29
4.1	Material.....	30
4.2	Representatividade do método de amostragem	31
4.3	Uso do solo.....	33
4.4	Preparo das amostras de solo	33
4.5	Caracterização das amostras	34
4.5.1	Descontaminação dos materiais para análise de arsênio e metais.....	34
4.5.2	Teor total de metais.....	34
4.5.3	Fator de enriquecimento	35
4.5.4	Carbono Orgânico Total.....	36
4.5.5	Carbono Orgânico Dissolvido.....	37
4.5.6	Análises físicas.....	38
4.6	Contaminação com hidrocarbonetos do petróleo	39
4.6.1	Esterilização dos frascos para contaminação	39
4.6.2	Testes preliminares	40
4.6.3	Tratamentos	41
4.6.4	Especiação de arsênio extraível em água.....	42
4.7	Difusão em filmes finos por gradiente de concentração	44
4.7.1	Fundamentos da DGT.....	45
4.7.2	Dinâmica de reposição.....	46
4.7.3	Montagem dos dispositivos	47
4.7.4	Imersão dos dispositivos	48
4.7.5	Eluição	48
4.7.6	Cálculos	48
4.8	Biodegradação.....	49
4.8.1	Esterilização das amostras para a caracterização microbiológica.....	49
4.8.2	Qualidade do solo	49
4.8.3	Umidade gravimétrica	51
4.8.4	Temperatura.....	52
4.8.5	Monitoramento da biodegradação.....	52

4.8.6 Biologia Molecular.....	54
4.9 Parâmetros de Qualidade da Análise e Tratamento Estatístico	59
4.9.1 Geração de hidretos.....	59
4.9.2 Espectrometria de fluorescência atômica.....	59
4.9.3 Controle de qualidade da análise.....	60
5 Resultados.....	62
5.1 Teste preliminar	62
5.2 Caracterização das amostras	64
5.3 Mobilidade do arsênio em função da contaminação por gasolina e diesel	71
5.4 Concentração de arsênio nas campanhas.....	74
5.5 Concentração de arsênio extraível em função do uso do solo e origem do arsênio.....	77
5.6 Fracionamento do arsênio extraível (DGT).....	82
5.7 Influência da microbiota do solo	85
5.8 Análise multivariada (PCA).....	89
5.9 Expressão de genes funcionais.....	94
6 Conclusão.....	101
Referências.....	103

Lista de Figuras

Figura 1. Representação de um diagrama Eh-pH contendo exemplos de alguns corpos d'água.	23
Figura 2. Mapa com a localização dos pontos de coleta georreferenciados.	26
Figura 3. Esquema contendo a síntese dos parâmetros abordados no presente estudo.	29
Figura 4. Locais de coleta.	32
Figura 5. Detalhe dos pontos de coleta dos solos superficiais.	33
Figura 6. Representação esquemática do teste preliminar.	40
Figura 7. Frascos com as amostras de solo dos três tratamentos (controle, contaminada - gasolina e contaminada - diesel).	42
Figura 8. Cartuchos artesanais para a especiação redox de arsênio.	44
Figura 9. Dispositivos DGT montados.	48
Figura 10. Estrutura para oxidação em sistema de refluxo.	51
Figura 11. Extração de DNA.	56
Figura 12. Concentrações de arsênio extraível em água ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas no teste preliminar.	63
Figura 13. Triângulo textural das amostras.	67
Figura 14. Carbono orgânico total por período de coleta.	68
Figura 15. Carbono orgânico dissolvido por período de coleta.	70
Figura 16. <i>Boxplot</i> com as medianas das concentrações de As(III) em função do tratamento e campanha.	74
Figura 17. <i>Boxplot</i> com as medianas das concentrações de As(V) em função do tratamento e campanha.	75
Figura 18. Variação da razão As(III)/As(V) (redução) em função da campanha de coleta das amostras.	76
Figura 19. Concentração de As(III) (estação seca) nos tratamentos em função do uso do solo.	77
Figura 20. Concentração de As(V) (estação seca) nos tratamentos em função do uso do solo.	78
Figura 21. Concentração das espécies inorgânicas de arsênio em função da origem do arsênio.	80

Figura 22. Concentração das espécies inorgânicas de arsênio em função da origem do arsênio.....	81
Figura 23. Concentração lábil de arsênio (C_{DGT}) em função do COD.....	83
Figura 24. Biomassa microbiana do solo por campanha.....	85
Figura 25. Respiração Basal do Solo inicial por campanha.....	86
Figura 26. Respiração basal do solo em função do uso do solo (Estação seca).....	87
Figura 27. Respiração basal do solo em função do uso do solo (Estação chuvosa).....	87
Figura 28. Dinâmica da degradação dos contaminantes gasolina e diesel por campanha, estimados a partir do modelo exponencial.....	88
Figura 29. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(III) no tratamento gasolina (Estação seca).....	90
Figura 30. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(III) no tratamento diesel (Estação seca).....	91
Figura 31. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(V) no tratamento gasolina (Estação seca).....	92
Figura 32. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(V) no tratamento diesel (Estação seca).....	93
Figura 33. Gel com os produtos de PCR para o gene <i>ArsB</i>	95
Figura 34. Gel com os produtos de PCR para o gene <i>Arc3.1</i>	96
Figura 35. Gel com os produtos de PCR para o gene <i>aoxB</i>	97
Figura 36. Gel com os produtos de PCR para o gene <i>arrAb</i>	98
Figura 37. Gel com os produtos de PCR para o gene <i>arsM</i>	99
Figura 38. Concentração das espécies de arsênio em função da expressão do gene <i>ArsM</i> nos três tratamentos.....	100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Recuperações da digestões semi-totais	35
Tabela 2. Atributos dos solos usados no teste preliminar.....	40
Tabela 3. Concentrações semi-totais dos elementos (média ± desvio padrão, n=2)	64
Tabela 4. Fatores de enriquecimento do arsênio usando o Mn e Fe como elemento de referência.....	65
Tabela 5. Parâmetros físicos das amostras.....	66
Tabela 6. Carbono orgânico total (%) das amostras.....	68
Tabela 7. COD (mg kg ⁻¹) das amostras (média ± desvio padrão, n=2).....	69
Tabela 8. Concentrações (ng L ⁻¹) das espécies inorgânicas de arsênio na solução do solo para os três tratamentos (média ± desvio padrão, n=3) - Estação seca	72
Tabela 9. Concentrações (ng L ⁻¹) das espécies inorgânicas de arsênio na solução do solo para os três tratamentos (média ± desvio padrão, n=3) - Estação chuvosa	73
Tabela 10. Comparação das concentrações das espécies e frações de As (média ± desvio padrão, n=3) e COD (média ± desvio padrão, n=2)	82
Tabela 11. Comparação das concentrações das espécies e frações de As (média ± desvio padrão, n=3) nos tratamentos	84

Lista de abreviaturas e siglas

Ácido monometilarsônico (MMA)
Ácido dimetilarsônico (DMA)
Ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*)
Biomassa microbiana do solo (BMS)
Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno (BTEX)
Carbono orgânico dissolvido (COD)
Carbono orgânico total (COT)
Carbono total biodegradado (CTB)
Coeficiente metabólico do solo (qCO_2)
Condutividade elétrica (CE)
Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP)
Diffusive boundary layer (DBL)
Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração (DGT)
Eficiência de biodegradação (EB)
Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)
Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Hidretos (HG-AFS)
Fase líquida não aquosa (NAPL, do inglês *non-aqueous solid phase*)
Fator de enriquecimento geoquímico (EF)
Hidrocarbonetos do petróleo totais (HPT)
International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)
Limite de detecção (LD)
Limite de quantificação (LQ)
Matéria orgânica do solo (SOM, do inglês *soil organic matter*)
Parque Estadual Turístico Alto do Ribeira (PETAR)
Polimerase reação em cadeia (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*)
Análise das componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*)
Respiração Basal do Solo (RBS)
Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS)
Terra fina seca ao ar (TFSA)
Tris-acetato-EDTA (TAE)
United States Environmental Protection Agency (EPA)

1 INTRODUÇÃO

Os metais e semimetais presentes no solo podem ser de origem litogênica ou antropogênica. Os primeiros advêm de fontes geológicas, principalmente de rochas, pela ação do intemperismo. Os segundos resultam de atividades humanas, principalmente da agricultura (e.g. agrotóxicos e fertilizantes) e mineração (ALLOWAY, 1995).

O arsênio é um semimetal encontrado no ar, solo e água, sendo as rochas seu principal reservatório natural. Antes da utilização dos compostos organoclorados, compostos de arsênio foram amplamente empregados na fabricação de pesticidas (CHATTERJEE; MUKHERJEE, 1999), sendo os arsenatos empregados em inseticidas e, arsenitos, em herbicidas. A concentração de arsênio em insumos agrícolas varia de 2 a 4950 mg kg⁻¹, sendo que os valores mais altos são encontrados em fertilizantes inorgânicos, aproximadamente 170 vezes maior que os valores máximos para esterco bovino, de granja e lodo de esgoto (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Uma vez que elementos traço no ambiente podem existir em uma variedade de espécies com mobilidades diferentes, a compreensão tanto da distribuição destas espécies, quanto dos fatores controladores desta distribuição é essencial. Apenas algumas destas espécies são biodisponíveis, sendo portanto fundamental o enfoque na avaliação das suas formas lábeis (PYRZYŃSKA; WIERZBICKI, 2004). O estudo da mobilidade de metais é muito importante para prever em que situações a fração adsorvida ao sedimento poderá tornar-se solúvel e causar problemas ambientais.

Em relação aos perfis do solo, a camada superficial frequentemente apresenta os teores mais elevados de arsênio, reflexo da deposição de frações do elemento provenientes da atmosfera e a ciclagem de plantas (ALLOWAY, 1995). No entanto, segundo Gomez-Camino et al. (2001), as interações entre arsênio e a fração mineral do solo e de aquíferos é dominante quando comparada com as interações do elemento com a matéria orgânica, sendo a principal forma de interação do arsênio com a matéria orgânica do solo através das interações da última com a superfície de minerais.

Muitas espécies de micro-organismos, incluindo leveduras, bactérias e cianobactérias são capazes de usar hidrocarbonetos como fonte de carbono, sendo utilizadas como biorremediadores. Micro-organismos presentes no solo são capazes

de utilizar processos químicos, como redução e oxidação, para transformar metais, muitas vezes alterando sua toxicidade, por meio da alteração do estado de oxidação, metilação, etc. Alguns organismos presentes no solo são capazes de converter As(V) e As(III) a formas reduzidas, principalmente arsinas metiladas, que são voláteis (GOMEZ-CAMINERO, A et al., 2001).

Ainda que um contaminante orgânico, como por exemplo hidrocarbonetos do petróleo, não apresente uma concentração significativa de um metal ou semimetal, a introdução deste composto exógeno pode acarretar em modificações nas propriedades do solo e na comunidade de micro-organismos, alterando indiretamente a biogeo-disponibilidade de elementos já presentes no meio (PINTO et al., 2014).

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de gasolina e diesel na labilidade de arsênio no solo e na mobilidade das espécies deste elemento da fase sólida para a água intersticial do solo em curto período.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a dinâmica e a extensão da especiação redox de arsênio após a introdução dos contaminantes orgânicos estudados no sistema, em comparação com outras fontes de carbono orgânico e outras matrizes já estudadas e reportadas na literatura;
2. Avaliar a influência de parâmetros físico-químicos e da expressão de genes funcionais associados a transformação microbológica de arsênio na dinâmica da concentração de arsênio na solução dos solos após a introdução dos contaminantes gasolina e diesel;
3. Avaliação da influência das características da área de estudo (período de coleta, uso do solo e origem do arsênio).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Comportamento biogeoquímico do arsênio

As concentrações dos elementos no solo podem apresentar grande variação, mesmo sem influência antrópica. Um dos fatores predominantes para esta variação é da composição da rocha-mãe, assim como os processos pedogenéticos aos quais esta é submetida. Desta forma, é comum a existência de locais naturalmente enriquecidos em alguns elementos, dada a rocha de origem ou ao transporte de sedimentos alóctones (*e.g.* rios e cinzas vulcânicas) e principalmente dada a liberação, mobilidade e concentração destes elementos nos perfis de alteração e a pedogênese (MANDAL, 2002).

A concentração basal (*baseline*) de arsênio em solos frequentemente reportada é de 5 a 10 mg kg⁻¹ (GOMEZ-CAMINERO, A et al., 2001). Mas uma faixa mais ampla para a concentração basal de arsênio no solo também pode ser encontrada, sendo reportadas concentrações entre 1 e 20 mg kg⁻¹ em solos naturais e 0,1 e 50 mg kg⁻¹ em solos agrícolas. No estado de São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (RUBY et al., 2011), através da análise de solos de diferentes classes e profundidades, reportou a concentração de arsênio de 3,5 mg kg⁻¹ como valor de referência para o estado.

O arsênio ainda está presente em diversos depósitos de minérios e carvão, sendo liberado durante a extração ou queima destes. Assim, o material particulado emitido nestes dois processos segue caminho para solos e águas (MANDAL, 2002). O arsênio está presente em altas concentrações (até 200 mg kg⁻¹) em minerais de apatita (GOMEZ-CAMINERO et al., 2001), principal matéria-prima para produção de fertilizantes no Brasil (SOUZA, 2001).

Após a ação do intemperismo, visto que metais e semimetais possuem características diferentes, como níveis de eletronegatividade e estados de oxidação, estes podem passar por processos também diferentes, como precipitação, adsorção, complexação ou lixiviação, interagindo de maneiras distintas com os minerais e matéria orgânica presentes no solo. Desta forma, podem estar presentes na fração solúvel, lábil, inerte (forte adsorção com minerais ou precipitados com outros componentes), complexados com a matéria orgânica ou podem estar assimilados pela biomassa.

Os teores de óxidos de ferro, óxidos de alumínio e de argilominerais em uma região é um fator determinante para a adsorção de arsênio na fração mineral do solo (LIU et al., 2001), sendo que a adsorção de arsênio a óxidos de ferro foi reportada como menos estável quando comparada à adsorção a óxidos de alumínio em condições ácidas de pH (<5,75) (HALTER; PFEIFER, 2001). Em solos ácidos, o arsênio estará ligado ao ferro e alumínio, enquanto em solos alcalinos esta ligação ocorrerá com cálcio. Dada a similaridade química entre fosfato e arsênio, no solo, ambos competirão pelos mesmos sítios de adsorção e apresentarão as mesmas interações, formando complexos insolúveis com alumínio, ferro e cálcio (SADIQ, 1997). Assim, a quantidade de arsênio adsorvido da água intersticial do solo aumenta com o aumento de óxidos de ferro, manganês e alumínio livres e do aumento da fração argilosa do solo (GOMEZ-CAMINERO et al., 2001).

A precipitação é um dos principais mecanismos de imobilização de arsênio do solo. Em solos oxigenados, arsenatos de ferro podem controlar a solubilidade de arsênio, enquanto que em solos anóxicos, sulfetos de arsênio controlam a concentração de arsênio dissolvido. A precipitação de arsenatos de ferro e cálcio e de sulfetos de arsênio podem limitar as concentrações de arsênio na água intersticial do solo (SADIQ, 1997).

Além do pH, o tempo de contato do elemento com a fração adsortiva e a presença de ligantes orgânicos e inorgânicos são fatores influentes na labilidade de arsênio e na sua movimentação entre os perfis do solo (LIU et al., 2001). A mobilidade do arsênio será controlada pelo tipo de argila presente no meio, bem como sua quantidade, presença de matéria orgânica e outros íons. A mobilidade de arsênio juntamente com a água percolante para as camadas subjacentes é reduzida pela presença da camada de húmus, que atua como uma barreira, onde este elemento se acumula. Analogamente, em solos ricos em carbono, pode ser observado grande acúmulo do semimetal, dada a forte interação entre eles (MATSCHULLAT, 2000).

2.2 Conceitos

2.2.1 Biodisponibilidade

Bioacessibilidade é a capacidade de uma substância de entrar em contato com um organismo vivo, podendo ou não interagir e sofrer absorção por este. Desta

forma, substâncias aprisionadas no interior de partículas insolúveis não estarão bioacessíveis. Por sua vez, biodisponibilidade refere-se ao potencial que um organismo apresenta de absorver uma substância. Tanto a bioacessibilidade quanto a biodisponibilidade dependem da especiação química e de parâmetros biológicos, visto que mesmo quando uma substância encontra-se adsorvida à superfície de minerais, esta pode não ser bioacessível e, conseqüentemente, esta não será biodisponível se o organismo tiver a capacidade de absorver apenas aquelas substâncias presentes em solução (DUFFUS et al., 2017).

2.2.2 Labilidade

O termo lábil refere-se a uma fração do teor total de um elemento em uma solução, fração esta livre ou fracamente complexada com ligantes inertes. Está intrinsecamente relacionado ao conceito de fracionamento, que baseia-se na classificação de um analito segundo suas propriedades físicas (tamanho) ou químicas (orgânico ou inorgânico, inerte ou lábil) (TEMPLETON et al., 2000).

2.2.3 Especiação

O conceito de especiação química, segundo a IUPAC (TEMPLETON et al., 2000), refere-se a distribuição das espécies químicas de um elemento em um sistema. No caso do arsênio, seu comportamento geoquímico, bem como sua toxicidade, está fortemente relacionado às espécies químicas presentes no meio. Em sistemas aquáticos e em solos, o arsênio se encontra predominantemente em suas formas inorgânicas: o oxiânion pentavalente arsenato (H_3AsO_4) na faixa de pH entre 0 e 2 e em condições oxidantes ($E_h > 400$ mV); e a forma neutra trivalente arsenito (H_3AsO_3), em condições alcalinas ($0 < \text{pH} < 9$) e redutoras (TAKENO, 2005). Ainda, estão presentes nestes sistemas, em menor proporção, as formas orgânicas ácido monometilarsônico (MMA) e dimetilarsônico (DMA). Devido a sua maior solubilidade, as formas inorgânicas são as mais tóxicas, sendo o As(III) o mais tóxico entre as duas espécies (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002; LEERMAKERS et al., 2006). Onishi e Sandell (2000) reportaram o arsenato, forma menos móvel de arsênio, como sendo espécie predominante de arsênio em solos, responsável por 60% entre todas as formas do elemento.

O equilíbrio entre essas espécies dependerá principalmente dos fatores do potencial de oxidação e redução (Eh) e do pH, mas também da ação de micro-organismos (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002).

2.2.4 Mobilidade

Quando o termo mobilidade é considerado, o enfoque é dado aos processos físico-químicos que influenciam na capacidade de movimentação de um composto na fase aquosa do solo após sofrer dissolução da fase mineral. Esta capacidade irá depender de interações com outros compostos químicos, como também de alterações que venha a sofrer, *e.g.* especiação. A mobilidade de metais entre as fases sólida e a água pode ser influenciada por uma variedade de fatores, como presença de matéria orgânica, pH, potencial redox (Eh), presença de sulfetos, tamanho de sedimentos e micro-organismos. Ainda, a mobilidade de elementos em sistemas aquosos é altamente influenciada pelo potencial iônico deste elemento, *i.e.* é influenciado pela razão entre estado de oxidação da espécie e o seu raio iônico. Assim, quanto maior o raio iônico apresentado por um analito, menor será sua mobilidade (RIEUWERTS et al., 1998).

No estudo da mobilidade e labilidade de elementos traço em solos, o conhecimento da distribuição das espécies presentes na fase sólida e água intersticial é imprescindível, visto que tanto a labilidade quanto a mobilidade podem variar de acordo com as formas químicas presentes no sistema (HARPER, M P et al., 1998).

Como o conhecimento do teor total de um analito não é suficiente para uma compreensão aprofundada dos mecanismos envolvidos na distribuição de um elemento nos diversos compartimentos terrestres, muitas vezes, o entendimento do comportamento biogeoquímico de um elemento é dificultado por limitações analíticas. Em solo, a mobilidade de metais tem sido estudada por extração sequencial (WEI et al., 2016) e pelo uso de colunas de solo para avaliar a lixiviação de metais (LI; CAI, 2015). A extração de arsênio da fase sólida pode ocorrer sem a alteração das espécies presentes na amostra ou com a conversão parcial entre As(III) e As(V). No estudo das espécies químicas presentes em um sistema é imprescindível que estas espécies não sofram alterações, sendo que os procedimentos de extração adotados não devem interferir no equilíbrio entre as espécies e na determinação destas através da técnica analítica adotada. Durante o armazenamento das amostras, mudanças no estado de

oxidação induzidos por atividade microbológica e pelo contanto com oxigênio, assim como perdas por volatilização ou adsorção aos frascos de armazenamento devem ser evitadas (LEERMAKERS et al., 2006).

2.3 Influência da contaminação por hidrocarbonetos do petróleo na concentração de arsênio

Mundialmente, existem muitos relatos do aumento de concentração de arsênio dissolvido em aquíferos relacionado com um aumento no aporte de matéria orgânica. Este aumento do arsênio ocorre concomitantemente ao aumento do ferro dissolvido. O aumento da matéria orgânica em um aquífero eleva as taxas de biodegradação, resultando na depleção de aceptores de elétrons e conseqüentemente na condição redutora do sistema. A redução do meio culmina na redução do Fe(III) a Fe(II), mais solúvel, liberando o As(V) adsorvido às superfícies dos óxidos de ferro para a solução. A redução do As(V) para As(III) pode ocorrer em seguida (BROWN et al., 2010).

Apesar da matéria orgânica natural ser capaz de ocasionar mudanças no potencial redox na água subterrânea, este processo pode ser intensificado por contaminantes orgânicos antropogênicos. O aumento da concentração de arsênio concomitantemente à contaminação por compostos orgânicos, como derivados do petróleo, e subsequente redução do sistema, vem sendo descrita para aquíferos livres (BROWN et al., 2010) e áreas úmidas (ZIEGLER et al., 2015), apesar do arsênio ser encontrado em níveis traço ($\mu\text{g L}^{-1}$) nestes compostos (TRINDADE et al., 2006; BECKER et al., 2012).

No entanto, apesar do solo apresentar características semelhantes às envolvidas na dinâmica de labilização do arsênio em aquíferos, como presença de óxi- e hidróxidos de ferro e uma microbiota capaz da degradação da matéria orgânica e de contaminantes orgânicos (TRINDADE et al., 2005), nenhum estudo foi encontrado na literatura abordando a mobilização do arsênio para a água intersticial do solo, considerando as especificidades da zona não-saturada.

A zona não-saturada é definida como o meio geológico da superfície do solo até o lençol freático. É composta de três fases: sólidos, *i.e.* fração mineral e matéria orgânica; líquido, água intersticial e seus solutos; e gasoso, ar, vapores e outros gases. A água é retida nas partículas do solo por forças capilares. A zona não-saturada e a

franja capilar podem ser agrupadas como zona de aeração, *i.e.* onde o ar pode ocupar os espaços porosos. Em períodos de alta precipitação, esses espaços porosos podem estar preenchidos por água. Na zona saturada, a água ocupa constantemente todos os espaços porosos (ARORA et al., 2019).

Os trabalhos encontrados na literatura para aquíferos envolvem grandes programas de monitoramento *in situ* de áreas contaminadas, como o caso de uma área contaminada em Minnesota, EUA (COZZARELLI et al., 2016), amplamente estudada quanto a contaminação por arsênio.

A zona não-saturada é frequentemente abordada em trabalhos que visam avaliar os riscos de contaminação da água subterrânea e como área de atenuação da contaminação da água subterrânea. No entanto, estes ambientes necessitam de atenção e enfoque de maneiras distintas, visto que diferenças nas condições físicas e químicas e, conseqüentemente, microbiológicas, levam a diferenças no comportamento de contaminantes, principalmente quanto sua toxicidade (SHEEHAN et al., 2003).

McGuire et al. (2005) avaliaram o impacto da precipitação meteorológica no potencial redox de um aquífero arenoso não-confinado contaminado por hidrocarbonetos do petróleo. Segundo os autores, os efeitos da recarga na disponibilidade dos aceptores de elétrons foram observados principalmente na interface entre a área de infiltração e o aquífero, não sendo observada na porção média deste. Ainda, na interface entre o lençol freático e zona não-saturada foi reportada uma redução de cerca de 10 vezes no número de bactérias heterotróficas aeróbicas e protozoários em relação ao número destes organismos encontrado para os solos da superfície (DODDS et al., 1996).

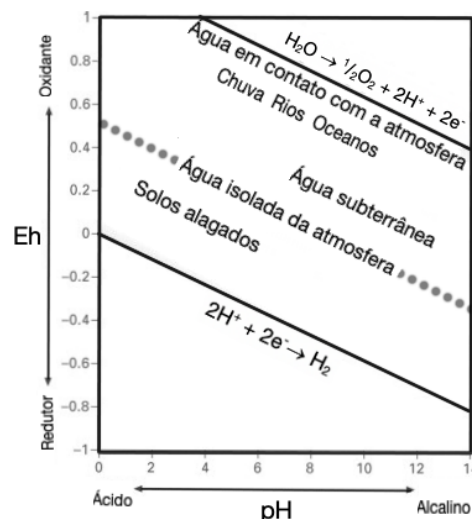
Ainda, a zona não-saturada apresenta uma característica que pode afetar completamente a solubilização de compostos: a transiência. Visto que, ao contrário da zona saturada, os poros na zona não-saturada permanecem a maior parte do tempo não totalmente preenchidos por água, o tempo de contato da água subterrânea com a fase sólida é significativamente menor, permitindo menor tempo para a solubilização dos compostos orgânicos para que sejam degradados e menos tempo para que a mobilização do arsênio ocorra, sendo importantes a realização de trabalhos que abordem a cinética desta reação.

Quando o derramamento do petróleo ocorre em grandes concentrações na zona não-saturada, ocorre uma migração descendente dos compostos não retidos na

fase sólida do solo ou não dissolvidos na água intersticial, visto que a capacidade de retenção foi ultrapassada. Desta forma, quando a zona saturada é atingida, forma-se uma fase separada, conhecida como fase líquida não aquosa (NAPL, do inglês *non-aqueous phase liquid*) (BALSEIRO-ROMERO et al., 2018). Neste ponto, a biodisponibilidade dos contaminantes é regulada pela solubilidade destes na interface entre a água e a NAPL (JONGE et al., 2012). Por sua vez, NAPL não é formada quando o derramamento ocorre em baixa concentração, sendo que a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos será determinada pelos processos de adsorção e dessorção pela fase sólida (GARCÍA-DELGADO et al., 2020).

Quando comparados com sistemas aquáticos, a biodegradação no solo tem algumas vantagens. Primeiro, dada a estrutura do solo, hidrocarbonetos de baixo peso molecular tenderão a migrar para camada mais profundas do solo, o que irá minimizar a evaporação de compostos voláteis. Assim, biodegradação ao invés de evaporação será o principal mecanismo de remoção enquanto houver oxigênio disponível. Ainda, o solo apresenta capacidade de adsorver compostos tanto polares quanto apolares e, desta forma, a toxicidade efetiva destes compostos tende a ser reduzida (RONALD, 1981). A eficiência de biodegradação na zona não-saturada também é superior à da zona saturada (MCKEE et al., 1972). No entanto, conforme observado na figura 1, águas de solos alagados e águas subterrâneas são naturalmente mais propensas à condição redutora que águas que apresentam contato direto com a atmosfera (NEUMANN, 2012).

Figura 1. Representação de um diagrama Eh-pH contendo exemplos de alguns corpos d'água.



Fonte: Adaptado de NEUMANN (2012).

2.4 Hidrocarbonetos do petróleo

Os combustíveis atualmente utilizados são obtidos a partir de frações do petróleo destiladas, sendo classificadas segundo o número de carbono em suas moléculas. Assim, a gasolina apresenta de 4 a 12 átomos de carbono e óleos combustíveis, 14 ou mais átomos de carbonos em sua composição (GROYSMAN, 2014).

Em trabalhos que visam avaliar os impactos de hidrocarbonetos do petróleo presente em uma dada amostra ambiental, o termo hidrocarbonetos do petróleo totais (HPT) é frequentemente utilizado. Os HPT correspondem a uma ampla família de centenas de compostos químicos que têm sua origem no petróleo bruto (PINEDO et al., 2013).

A gasolina é uma mistura complexa, podendo apresentar mais de 230 hidrocarbonetos, sendo que sua composição irá variar de acordo com a origem do petróleo e o processo de refinamento adotado. Dentre os compostos presentes na gasolina, o grupo de hidrocarbonetos aromáticos conhecido como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) são os que apresentam maior risco ambiental, uma vez que são os mais solúveis em água (COUNCIL, 2003).

Com o intuito de diminuir as emissões de monóxido de carbono para a atmosfera, é exigência no Brasil que a gasolina comercial apresente etanol em sua composição em uma faixa de 20 a 25%. Ainda, a adição de etanol aumenta a octanagem da gasolina, ou seja, sua resistência à detonação, o que melhora o desempenho deste combustível e diminui o desgaste do motor. No entanto, dado a alta solubilidade do etanol em água, esta adição aumenta o impacto da contaminação por gasolina no caso de um vazamento, visto que aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos presentes na gasolina pelo fenômeno de co-solvência. O efeito de co-solvência é maior quanto maior a hidrofobicidade do composto (CORSEUIL; FERNANDES, 1999).

Os hidrocarbonetos que apresentam cadeia com 1 a 4 carbonos são biodegradados por poucos e específicos micro-organismos; os com 5 a 9 carbonos apresentam alta toxicidade e são altamente voláteis. Hidrocarbonetos que possuem uma cadeia com mais de 22 átomos de carbono apresentam baixa toxicidade, porém possuem baixa solubilidade em água, estando presentes geralmente no estado sólido. Dentro da faixa de hidrocarbonetos do petróleo abordada neste estudo, os compostos

com 10 a 22 carbonos são os menos tóxicos e mais biodegradados (HUESEMANN, 1995).

Segundo Baseiro-Romero et. al (2018) baseado em estimativas da *Centre of European Comission*, juntos, metais e hidrocarbonetos do petróleo perfazem aproximadamente 60% do total de contaminantes do solo. Segundo estas estimativas (PANAGOS et al., 2013), existem mais de 3,5 milhões de pontos de contaminação apenas na União Européia, sendo que mais da metade corresponde a contaminação por hidrocarbonetos do petróleo.

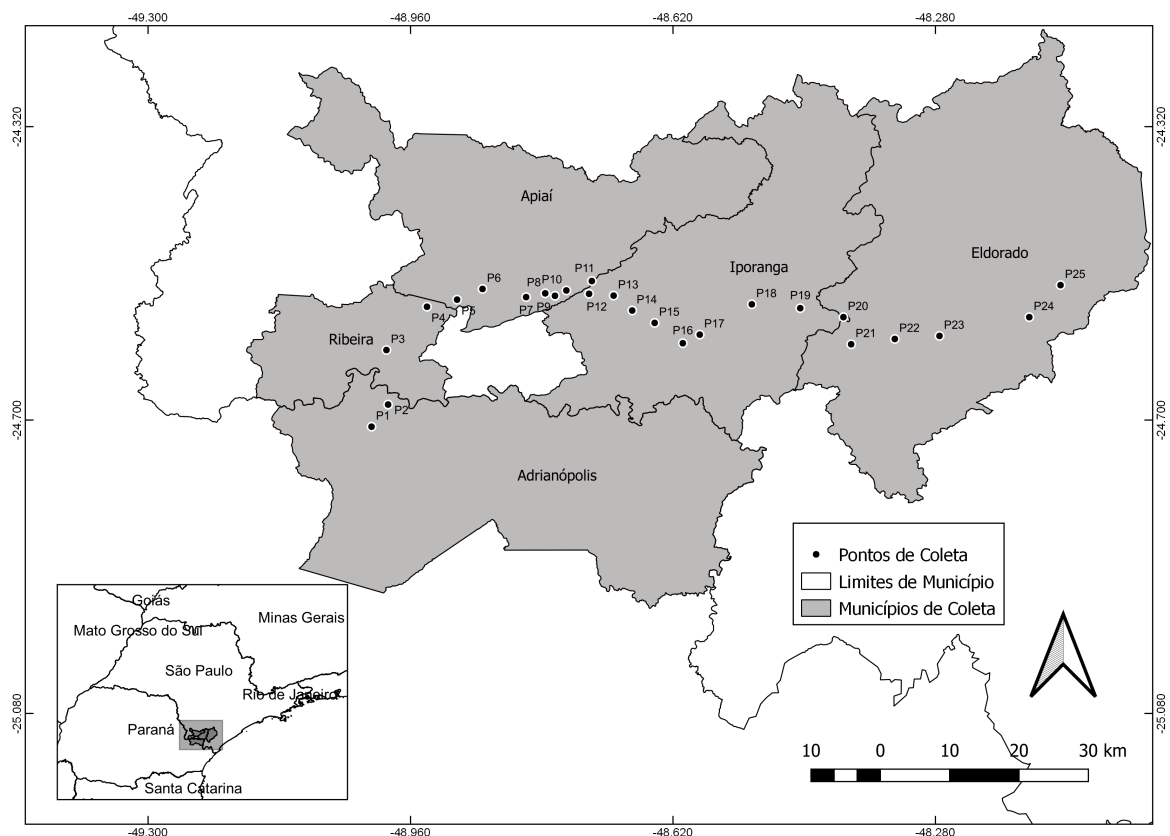
3 ÁREA DE ESTUDO

No Brasil, os estudos sobre a concentração de arsênio são escassos e restritos a poucas áreas. Altas concentrações de arsênio no solo foram reportadas em Santana (AM, água subterrânea: $2000 \mu\text{g L}^{-1}$), no Quadrilátero Ferrífero (MG, água superficial: $350 \mu\text{g L}^{-1}$) e no Vale do Ribeira (SP/PR, sedimento: $355 \mu\text{g L}^{-1}$). Nestes locais, a ocorrência natural de rochas e solos com altos teores de arsênio foi aumentada por processos antrópicos (extração de minérios de ouro e manganês), acarretando em severa contaminação (FIGUEIREDO et al., 2007).

3.1 Vale do Ribeira (SP)

A região do Vale do Ribeira (Figura 2) possui grande interesse em estudos com enfoque ambiental, visto que abriga em seu território remanescentes da Mata Atlântica e um importante reservatório de água doce, formando pelo Rio Ribeira do Iguape e afluentes.

Figura 2. Mapa com a localização dos pontos de coleta georreferenciados.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Em torno de 500.000 habitantes, caracterizados principalmente por comunidades ribeirinhas e litorâneas, se distribuem em 32 municípios dos Estados de São Paulo e Paraná, na região que apresenta um dos mais baixos indicadores de renda e desenvolvimento humano do sudeste e sul do país.

A economia da região se baseia em atividades agrícolas e de mineração. Até 1996, atividades de mineração e refino de metais estiveram presentes na região do Alto Vale do Ribeira. Após esta data, a empresa Plumbum (Adrianópolis, PR) e outras minas de Pb encerraram suas atividades (FIGUEIREDO et al., 2007).

3.1.1 Arsênio no Vale do Ribeira

As elevadas concentrações de arsênio nos solos do Vale do Ribeira devem-se a fontes geogênicas e antrópicas, sendo que, no segundo caso, destaca-se a presença da mineração de Au, Zn e Pb, responsável pela liberação de arsênio como subproduto. Décadas de atividades de mineração sem preocupação ambiental contribuíram para a poluição dos solos da região.

Concentrações de até 80 mg kg^{-1} de arsênio foram encontradas nos solos do bairro Serra, localizado no município de Iporanga (SP), em uma área em que no passado esteve presente atividades de mineração de Pb-Zn (Mina de Furnas) (FIGUEIREDO et al., 2007).

Dentre a fonte geogênica, destacam-se os veios de quartzo contendo sulfetos de Au, Cu, Pb, Zn e As, e um escudo rochoso muito alterado que, em alguns pontos, apresenta 9% de arsênio. Na região do Córrego de Piririca, uma importante anomalia de elevada ocorrência natural de arsênio foi identificada, a jusante da área de mineração. Nesta região, apesar da elevada contaminação, a vegetação está ainda preservada. Esta área é pouco povoada e os habitantes não são dependentes da água subterrânea (CPRM, 1982 APUD FIGUEIREDO et al., 2007).

A fonte primária de arsênio no Cinturão de Piririca é a arsenopirita. A partir da oxidação da arsenopirita e da galena, novos minerais são incorporados, como neominerais sulfofosfatos e sulfoarsenatos. Estes novos minerais possuem uma alta estabilidade, apesar de uma certa desestabilização já ser observada nos mesmos, dada a presença de arsênio em oxihidróxidos de Fe no local. Desta forma, enquanto as condições oxidantes estiverem presentes no meio, mesmo que ocorra desestabilização total desses neominerais, oxihidróxidos de Fe impedirão a liberação

de As para ambiente (ROSA, 1993).

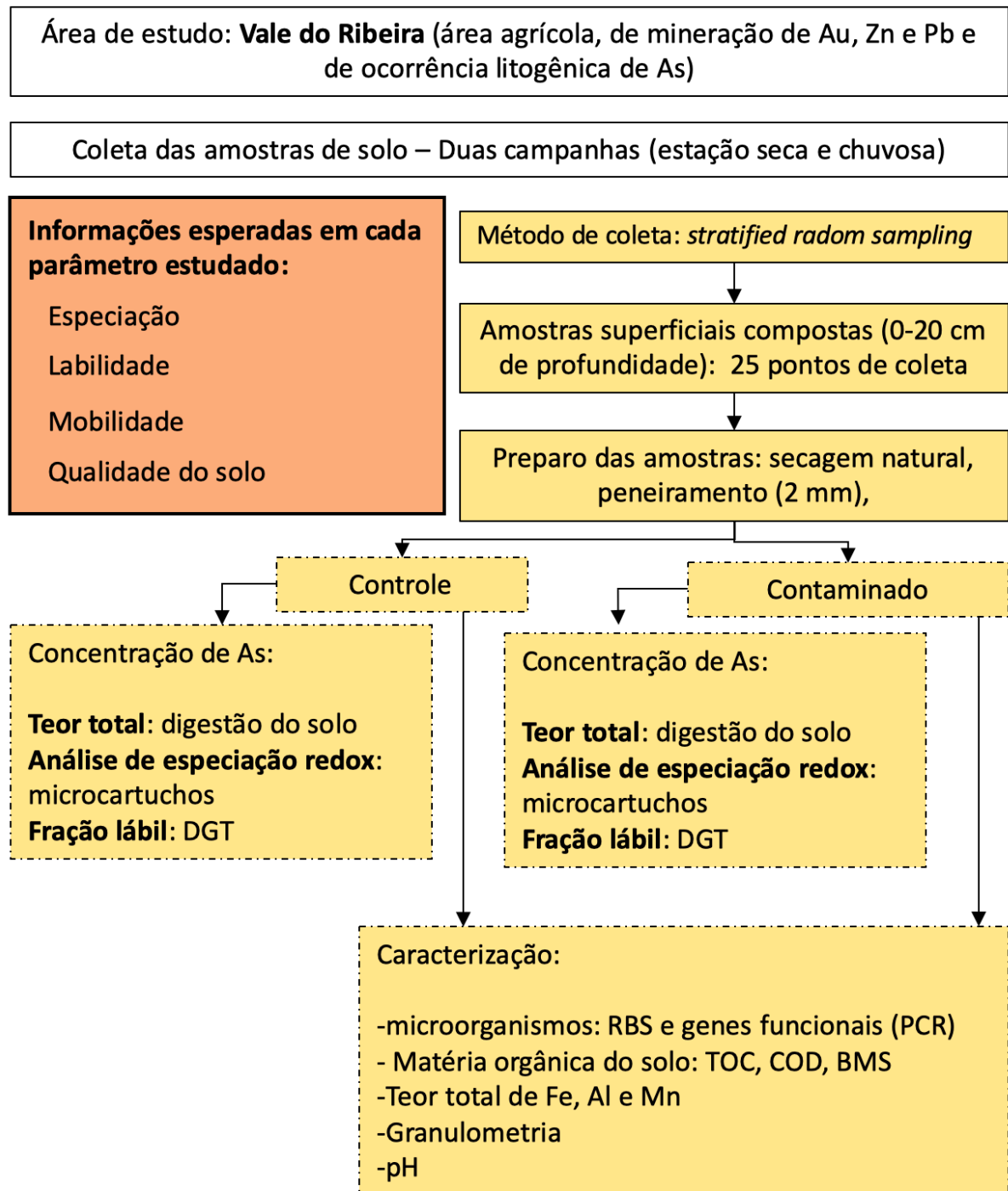
A pirita (FeS_2) é formada em condições redutoras, podendo ter arsênio incorporado a sua estrutura durante a formação, dando origem à arsenopirita (FeAsS_2). Este processo, explica a alta incidência de arsênio em ambientes redutores/anaeróbios, como lagos e oceanos (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002). O arsênio pode ser mobilizado do sedimento para a água com a ocorrência de dissolução oxidativa de sedimentos ricos em arsenopirita (MANDAL, 2002).

Apesar das altas concentrações encontradas na região, os teores de arsênio nas águas superficiais só ultrapassaram ocasionalmente os valores de referência vigentes na legislação brasileira ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), visto que a formação de solos enriquecidos de Al e Fe em climas tropicais atua como uma barreira química que impede a mobilização de arsênio para água. Ainda, o grande volume de precipitação característico do clima da região favorece a diluição das concentrações de arsênio presentes na água potável (FIGUEIREDO et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 3, observa-se um esquema com a síntese dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos considerados neste estudo, a serem detalhados neste capítulo.

Figura 3. Esquema contendo a síntese dos parâmetros abordados no presente estudo.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.1 Material

Os principais acessórios, equipamentos e reagentes que serão utilizados neste projeto são:

1. Espectromêtro de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) (PS Analytical, modelo 10.055 Millennium Excalibur);
2. Espectromêtro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Thermo Scientific);
3. Agitador orbital (Hoeter Pharmacia Biotech – modelo PR70, EUA);
4. Balança analítica (Gehaka, Brasil);
5. Dispositivos DGT (DGT Research Limited, Reino Unido);
6. Gel de poliacrilamida (DGT Research, Reino Unido);
7. Gel de ferrihidrita imobilizada em poliacrilamida (DGT Research, Reino Unido);
8. Capela de Fluxo laminar (Marconi, Brasil);
9. Geladeira (Eletrolux, Brasil);
10. Medidor de pH e condutividade (Jenway – modelo 3505, Reino Unido);
11. Pipetas automáticas (Gilson, França);
12. Sistema de purificação de água Milli-Q resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Millipore, EUA);
13. Espectrofotômetro ThermoFisher™ Nanodrop™ (Alemanha);
14. Kit de extração para DNA em solos DNeasy PowerSoil (Qiagen, Alemanha);
15. Fluorômetro Promega Quantus™;
16. Disruptor de tecidos TissueLyser II (Qiagen, Alemanha);
17. Termociclador PCR;
18. Bico de Bunsen;
19. Cuba horizontal de eletroforese;
20. Filtro de acetato de celulose (45 μm);
21. Mufla;
22. Estufa;
23. Centrífuga;
24. Vórtex;

25. Placa aquecedora;
26. Condensadores de bola, kitassato, bureta, termômetros e vidrarias de rotina de laboratório;
27. Dessecadores com sílica gel;
28. Bomba a vácuo;
29. Peneiras de 0,053 μm ;
30. Reagentes, todos de grau analítico.

4.2 Representatividade do método de amostragem

As amostras foram coletadas em duas campanhas, uma na estação seca (agosto/2017) e outra na estação chuvosa (fevereiro/2018) através do método *stratified random sampling*, em que uma área de amostragem é dividida em subáreas menores, considerando a heterogeneidade do local, buscando representar variedade de habitats e padrões de uso do solo. Desta forma, três áreas foram selecionadas para a coleta das amostras, tendo em vista os diferentes usos do solo da região, ao longo da margem do Rio Ribeira do Iguape, sendo uma inserida dentro de uma unidade de conservação, o Parque Estadual Turístico Alto do Ribeira (Figura 4, a e b), uma pertencente a área de mineração de Au, Zn e Pb (Figura 4, c e d) e um pertencente a área agrícola (Figura 4, e e f), onde também se insere uma área de ocorrência litogênica de As, a unidade geológica da Faixa do Piririca.

Em agosto de 2018, uma nova campanha foi realizada, desta vez, para a coleta de um volume menor de amostra, destinados aos estudos de Biologia Molecular.

Figura 4. Locais de coleta: a e b) pontos inseridos dentro dos limites do PETAR; c e d) pontos localizados entre as cidades de Apiaí, Ribeira e Adrianópolis, próximos a antigas áreas de mineração; e e f) pontos localizados entre as cidades de Iporanga e Eldorado.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Um total de 25 pontos de coleta foram amostrados somando todas as três áreas. Em cada um dos pontos amostrados, três sub-amostras, de 2 kg cada, foram coletadas na camada superficial do solo (0-20 cm), selecionadas por caminhamento aleatório em *zigue-zague*. O solo foi exposto e raízes maiores foram removidas com o auxílio de uma enxada (Figura 5). A partir de cada amostra composta coletada por ponto, uma pequena alíquota (aproximadamente 200g) foi retirada e armazenada

separadamente, dentro de uma caixa de isopor, sendo destinada aos testes de caracterização da qualidade do solo.

Figura 5. Detalhe dos pontos de coleta dos solos superficiais.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.3 Uso do solo

Os pontos de coleta foram divididos em três categorias, conforme observações registradas em campo: rural, urbano e natural (cobertura vegetal). Os critérios adotados para classificar uma paisagem como rural, neste trabalho, foi predomínio de pastos ou áreas de cultivo (*Pinus* sp, eucalipto e banana) no local. Áreas urbanas foram consideradas como aquelas próximas a cidades, indústrias ou que a coleta foi realizada em uma estrada altamente urbanizada. Por sua vez, como área natural foram considerados os locais com predomínio de cobertura vegetal ou próximas à rios, principalmente localizados dentro do perímetro do PETAR.

4.4 Preparo das amostras de solo

As amostras coletadas foram submetidas ao procedimento de catação para retirada de cascalhos, pedaços de raízes, folhas e macrofauna. Uma alíquota de 3 kg de cada amostra foi retirada e armazenada a -20 °C, segundo recomendado na ISO

18400-206 (ISO, 2018), com intuito de minimizar alterações na comunidade microbiológica devidas a armazenamentos por longos períodos em condições diferentes das autóctones. O restante do solo não congelado foi destinado a caracterização física do solo (granulometria e capacidade de campo).

Previamente ao peneiramento, as amostras de solo foram secas ao ar, a partir do espalhamento de todo conteúdo das amostras em bandejas plásticas de aproximadamente 60x40x15 cm, sendo possíveis torrões quebrados manualmente antes da secagem. As amostras foram então homogeneizadas, maceradas, quando necessário, e passadas por peneira de *nylon* de 2 mm, com o intuito de evitar uma possível contaminação por metais pelo uso de peneiras de ferro. Para se evitar a contaminação tanto biológica quanto química entre uma amostra e outra, o primeiro centímetro de solo peneirado foi descartado a cada peneiramento, conforme recomendado em EMBRAPA (1997).

4.5 Caracterização das amostras

4.5.1 Descontaminação dos materiais para análise de arsênio e metais

Antes de sua utilização, todo material envolvido no preparo e acondicionamento de soluções, como vidrarias e tubos de centrífuga, bem como os dispositivos DGT, seringas e filtros membranas foram descontaminados por meio da imersão em HCl 20% (v v⁻¹) por quatro horas e posterior lavagem com água deionizada (7 vezes) e água ultrapura (3 vezes).

4.5.2 Teor total de metais

O método de digestão para a determinação do teor total de arsênio e outros elementos (Al, Fe e Mn) foi realizado segundo descrito em MCGRATH e CUNLIFFE (1985), com o intuito de obter-se a concentração de elementos correspondente a somatória das frações lábeis, na fase trocável, complexados com a matéria orgânica, óxidos, adsorvidos a argilominerais e precipitados. O método consistiu na digestão ácida do solo em sistema aberto a partir da adição de 2 mL de HNO₃ concentrado (65%, v v⁻¹) e 8 mL de HCl concentrado (35%, v v⁻¹) ao frasco de vidro contendo 0,5 g de amostra previamente seca em estufa. O conteúdo foi deixado reagindo por um período

de duas horas, sendo então aquecido em placa de digestão com temperatura controlada entre 90-100 °C. A digestão foi realizada até a evaporação da solução. Após o resfriamento, foram adicionados 12,5 mL de HCl 20% (v v⁻¹) e a mistura foi reaquecida a 80 °C por 20 minutos. O digerido foi transferido quantitativamente para um tubo de centrifuga e avolumado para 50 mL.

A determinação do teor total de Fe, Al, Mn e As foi realizada através da espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Para garantir a qualidade do método de digestão, foi realizada a digestão também para o padrão de amostra de solo certificado IAEA Soil-7 (PSZONICKI et al., 2000). Na tabela 1 são apresentadas as recuperações obtidas no procedimento de digestão.

Tabela 1. Recuperações da digestões semi-totais

	Al (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	As (mg kg ⁻¹)
Valor de referência	47000	25700	631	13,4
Concentração obtida	34354	23731	630,	11,3
Recuperação (%)	73,1	92,3	99,9	83,5

4.5.3 Fator de enriquecimento

A partir dos resultados do teor total de Al, Fe, Mn e As, obtidos por meio dos procedimentos descritos acima, o fator de enriquecimento (FE) foi calculado para cada amostras de solo. O FE é um indicador usado para avaliar a natureza e a intensidade da contaminação do solo superficial por elementos químicos. A concentração de um elemento no solo é normalizada em relação à concentração de um elemento de referência (ER), que deve ser estável no solo, *i.e.* não apresentar mobilidade vertical, sofrer degradação ou ter sua concentração alterada por contaminação antrópica. Além disto, o ER deve estar associado a partículas mais finas do solo. Os elementos mais utilizados em estudos são Al, Fe, Mn e Rb.

O fator de enriquecimento é expresso da seguinte forma:

$$FE = \frac{(analito/ER)_{solo}}{(analito/ER)_{crosta}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo $(analito/ER)_{solo}$ = razão entre o analito e o ER no solo estudado

$(\text{analito/ER})_{\text{crosta}}$ = razão entre o analito e o ER em valores de referência para a crosta ou tipo de litologia da região.

Os elementos Mn e Fe foram selecionados como elementos de referência neste trabalho. Os valores do analito e dos elementos de referência na crosta foram obtidos a partir do Índice de Taylor (*Taylor Index*) (FRIEDMAN; O'NIEL, 1977). A interpretação dos valores diferem na literatura. Comumente, sugere-se que quando $FE \leq 1,5$ a concentração do analito advém de processos naturais de intemperismo. Para valores $FE > 1,5$ assume-se que uma porção significativa do analito provém de outras fontes além da geogênica (BARBIERI, 2016). Para Sutherland (2000), valores de 1,5 ainda podem abranger analitos de origem litogênica, sendo que o autor sugere cinco categorias de enriquecimento em função do valor obtido: depleção ou origem litogênica ($FE < 2$), enriquecimento moderado ($2 < FE < 5$), enriquecimento significativo ($5 < FE < 20$), enriquecimento elevado ($20 < FE < 40$), enriquecimento muito elevado ($FE > 40$). Neste trabalho, a interpretação dos valores de FE foi realizada segundo sugerido por Sutherland (2000).

4.5.4 Carbono Orgânico Total

Compostos orgânicos de baixa polaridade permanecem adsorvidos a matéria orgânica do solo (GOSS; SCHWARZENBACH, 2003). A adsorção de compostos hidrofóbicos em contaminantes orgânicos retarda o processo de biodegradação, visto que decresce a biodisponibilidade do contaminante (JØRGENSEN et al., 2000).

A matéria orgânica do solo foi determinada a partir do método de perda por ignição, em que 10 g dos solos, previamente secos em estufa a 105 °C por 24 h, foram adicionados em cadinhos e levados à mufla a 550 °C por 6 horas. Após o resfriamento, os cadinhos foram mantidos em um dessecador para a realização da pesagem da massa de solo após a combustão da matéria orgânica. A matéria orgânica do solo foi assumida como a diferença entre a massa de solo antes e depois da combustão. O carbono orgânico total do solo foi calculado assumindo-se o valor de 58% do conteúdo de carbono na matéria orgânica do solo.

É importante ressaltar que o método de combustão por ignição provê uma estimativa da matéria orgânica do solo, pois, mesmo com a temperatura de 550 °C,

indicada para garantir a combustão apenas da matéria orgânica, é possível que perdas de outros elementos do solo ocorra, como água presente nos argilominerais e carbono inorgânico. Sendo a região de coleta das amostras uma região com alta concentração de cavernas do tipo cárstico, o ataque do solo com HCl 10% (v v⁻¹) foi realizado com o intuito de identificar as amostras com grande teor de CaCO₃, a partir da presença de efervescência. As amostras P5, P8, P12, P14 e P15 apresentaram efervescência. No entanto, quando avaliados os resultados destas amostras em relação às demais, a variação do conjunto das amostras foi pouco acentuada (desvio padrão relativo de 19,45%) e próxima a variação do conjunto quando as amostras que apresentaram efervescência foram desconsideradas (desvio padrão relativo de 19,37%), evidenciando que as perdas de carbono inorgânico não foram significativas nas estimativas das amostras estudadas.

4.5.5 Carbono Orgânico Dissolvido

A matéria orgânica dissolvida do solo é operacionalmente definida como a fração que passa por filtros de 0,4 a 0,6 µm. A coleta realizada com lisímetros amostra seletivamente apenas a fração da matéria orgânica dissolvida presente em macroporos. Por sua vez, como no processo de obtenção da matéria orgânica dissolvida extraível em água ou em uma solução salina fraca ocorre por agitação do solo com a solução, a matéria orgânica dissolvida presente em micro e mesoporos também é amostrada. Assim sendo, a matéria orgânica extraível em água ou solução salina costuma apresentar valores mais altos que aquela extraída por meio de lisímetros (ZSOLNAY, 2003).

Neste estudo, a matéria orgânica dissolvida do solo é importante pois é capaz de aumentar solubilidade e diminuir a volatilização de contaminantes orgânicos (DEB; SHUKLA, 2011), influenciando no processo de degradação dos mesmo.

O carbono orgânico dissolvido foi obtido a partir dos resultados de carbono orgânico total nos extratos (0,5 K₂SO₄) não fumigados no método para determinação da Biomassa Microbiana do Solo (JONES; WILLETT, 2006).

4.5.6 Análises físicas

4.5.6.1 Potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica do solo

O potencial hidrogeniônico (pH) do solo é um dos principais fatores na especiação redox do arsênio, sendo fundamental para a capacidade de adsorção para As(III) e As(V), visto que o aumento do pH aumenta a disponibilidade de As(V) e diminui a do As(III). A oxidação de As(III) já foi demonstrada como sendo mais lenta na faixa de pH ligeiramente ácida, ao redor de 5 (EARLY; SCHRAMKE, 1990).

O pH das amostras foi obtido de acordo com protocolo EMBRAPA (1997), utilizando a solução de KCl 1 mol L⁻¹ (relação 1:2,5), para evitar possíveis interferências quanto a salinidade do solo (VASCONCELOS, 1986) ou conteúdo de matéria orgânica (PLIESKI et al., 2004) nos valores obtidos.

Foram pesados 10 g de cada amostra de solo (terra fina seca ao ar, TFSA) e depositados em tubo de centrífuga de 50 mL, sendo acrescentado de 25 mL da solução de KCl. Após 15 minutos de agitação constante, a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos e, em seguida, a leitura do pH do sobrenadante foi realizada, utilizando medidor de pH devidamente calibrado.

A leitura da condutividade elétrica da solução do solo foi realizada na mistura do solo TFSA com água deionizada na relação 1:5, após 12 horas da homogeneização, com condutímetro previamente calibrado (EMBRAPA, 1997).

4.5.6.2 Textura do solo

A classificação do solo quanto a sua textura fornece uma análise qualitativa, muito utilizada para a sua caracterização. A textura do solo tem grande influência na retenção de arsênio, sendo os solos argilosos e siltosos aqueles que apresentam maior superfície de adsorção e, conseqüentemente, maior capacidade adsorptiva do elemento (CHEN et al., 1999). Por este motivo, a concentração tóxica de arsênio total no solo para plantas depende da textura do solo, sendo maior para solos argilosos (200 mg kg⁻¹) que arenosos (40 mg kg⁻¹) (SHEPPARD, 1992).

A separação das frações do solo foi realizada segundo o método da pipeta descrito em EMBRAPA (1997). Inicialmente, os solos que apresentaram teor de matéria orgânica maior que 5% (m m⁻¹) ou apresentaram efervescência quando atacados com HCl 10% (v v⁻¹) foram tratados com H₂O₂ e HCl, respectivamente,

sendo, em seguida, lavados com água deionizada em papel de filtro qualitativo, para quebrar agregados que pudessem dificultar o processo de dispersão, conforme recomendado no método. Foram pesados 20 g de solo seco em estufa para cada amostra, sendo adicionados 10 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e 100 mL de água e, após homogeneização, foram deixados em descanso por 12 horas. O conteúdo, acrescido de 300 mL de água deionizada, foi submetido a agitação magnética por 15 minutos. O conteúdo foi então passado através de peneira de malha 0,053 mm, sendo o material lavado recolhido em uma proveta de 1000 mL. Foi assegurado que o volume final da mistura fosse 1000 mL. Após a homogeneização da mistura, a temperatura foi aferida para o cálculo do tempo de sedimentação da fração silte, segundo a Lei de Stokes. Passado o período calculado, 50 mL da mistura foi retirada com o auxílio de uma pipeta volumétrica posicionada na profundidade de 5 cm, sendo o volume transferido a um frasco de tara conhecida e levado a estufa até completa secagem. O conteúdo retido na peneira, correspondente a fração areia, também foi seco em estufa. O mesmo processo foi repetido para uma prova em branco. Após a secagem, os conteúdos correspondentes às frações argila e areia foram deixados esfriar até temperatura ambiente em um dessecador, sendo pesados para o cálculo da porcentagem destas frações. A porcentagem da fração silte foi calculada por diferença.

Os solos foram classificados segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS), e plotados em um triângulo textural (Figura 4) com auxílio do pacote *soiltexture* disponível na linguagem R (MOEYS, 2014).

4.6 Contaminação com hidrocarbonetos do petróleo

4.6.1 Esterilização dos frascos para contaminação

Os frascos lavados com detergente foram submetidos a banho com hipoclorito de sódio e enxague com água deionizada. Após este procedimento, os frascos foram deixados em banho ácido com HCl 20% (v v⁻¹) por 4 horas, depois enxaguados sete vezes com água deionizada e três vezes com água ultrapura, sendo secos fechados em estufa por 24 horas. Uma vez secos, os frascos foram abertos em capela de fluxo laminar previamente esterilizada - álcool 70% (v v⁻¹) e banho UV por 15 minutos - e submetidos a irradiação UV por 15 min.

4.6.2 Testes preliminares

Duas concentrações (30 e 500 mg kg⁻¹) dos dois contaminantes de interesse neste estudo (gasolina e diesel) e o tempo de exposição no solo (7 e 21 dias), necessários para que ocorresse a mobilização do arsênio, foram testados. Ainda, a influência da adição de ureia 0,01% (presença/ausência) nas amostras também foi avaliada.

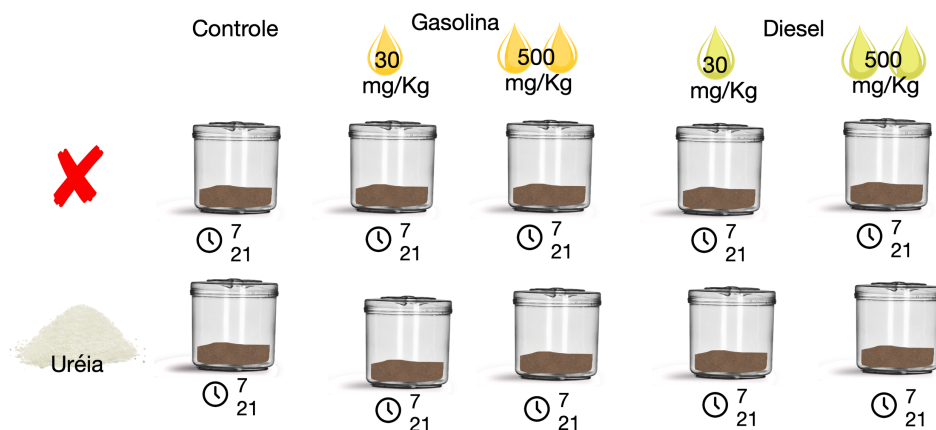
Para realização deste teste, três solos foram testados, sendo as características físico-químicas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Atributos dos solos usados no teste preliminar

	%areia	%silte	%argila	COT
P7	25,95	53,5	20,55	8,35
P12	52,6	34,09	13,31	3,36
P20	27,75	54,99	17,26	4,06

Cada solo foi dividido em alíquotas de 200 g e armazenados em frascos de polietileno de 500 mL fechados, sendo cada alíquota destinada a um tratamento (eg. Contaminante gasolina 30 mg kg⁻¹ com presença de ureia), conforme observado na Figura 6. Os frascos foram mantidos no escuro, contendo um tubo com água deionizada, para manutenção da umidade, e uma amostra de 10 g de solo foi coletada após os períodos de 7 e 21 dias. O teor de arsênio foi extraído segundo procedimento baseado no método de GONZAGA et al. (2012), em que a relação de solo: água deionizada utilizados foi 1:10, o tempo de agitação 16 horas e centrifugação de 3500 rpm por 15 minutos.

Figura 6. Representação esquemática do teste preliminar.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.6.3 Tratamentos

A partir dos dados obtidos nos teste preliminares para determinação da concentração e do tempo de contaminação, foi adicionada uma concentração de 500 mg de gasolina ou de diesel por kg de solo para cada amostra (n = 25), visando-se, desta forma, abranger toda a fração de hidrocarbonetos do petróleo, desde de mais baixo peso molecular (gasolina) até os com mais alto (diesel).

Amostras de um litro de gasolina e de diesel comum foram adquiridas no posto *Shell* localizado na cidade de Rio Claro, em no máximo 24 horas antes de cada procedimento contaminação. Os contaminantes foram armazenados em frascos limpos de polietileno e, imediatamente após a compra, foram levados ao Centro de Estudos Ambientais (UNESP, Rio Claro – SP) e foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo, para remoção de impurezas e micro-organismos, sendo então armazenadas em frascos de vidros vedados, no escuro, até que o processo de contaminação das amostras fosse finalizado.

As contaminações foram realizadas nas amostras armazenadas no *freezer* (- 20 °C), segundo recomendado na ISO 18400-206 (ISO, 2018), para coleta e armazenamento de amostras de solos aeróbicos para preservação da microbiota. Após descongeladas, as amostras foram passadas em peneiras de *nylon* (<2 mm). Com intuito de evitar contaminação entre as amostras, o primeiro centímetro de solo peneirados foi descartado.

Cada amostra (n=25) foi dividida em três alíquotas (700 g cada), cada uma, correspondendo a um dos tratamentos (controle, contaminado - gasolina e contaminado - diesel), e colocadas em frascos de polipropileno, previamente descontaminados (Figura 7). Um tubo de centrífuga de 15 mL com água ultrapura foi inserido no interior do frasco para que as condições de umidade no interior dos microcosmos fossem mantidas, por meio de equilíbrio, ao longo de todo o período de incubação. Previamente a contaminação, as amostras permaneceram em temperatura ambiente, em pré-incubação no escuro por um período de 7 dias antes do início dos testes.

Com o intuito de garantir o suprimento de nutrientes para o adequado crescimento microbiano, foi adicionada ureia aos três tratamentos das amostras para uma concentração final de 0,01% (m v⁻¹). Para se garantir as condições para um máximo desenvolvimento da microbiota é necessária a presença dos elementos C, N

e P, numa proporção de 100000:1000:1. A adição de P foi evitada dada a semelhança do íon fosfato com os arsenatos, podendo ocorrer uma liberação de arsênio dos sítios ligantes na fase sólida do solo devido a competição com o fosfato.

Após o período de estabilização, foi realizada a contaminação das amostras, para uma concentração de 500 mg kg^{-1} . As amostras foram mantidas no escuro por 21 dias, sendo homogeneizadas duas vezes por semana, baseado no método descrito por (HESNAWI; ADBEIB, 2013).

Figura 7. Frascos com as amostras de solo dos três tratamentos (controle, contaminada - gasolina e contaminada - diesel).



Fonte: Elaborado para este estudo.

Alíquotas de 45 g de cada tratamento de cada amostra foram coletadas, em triplicata, para a obtenção do extrato de saturação do solo. Para cada replicata, foi adicionado o volume máximo de água ultrapura para saturação do solo. O extrato de saturação coletado foi forçado através de cartuchos artesanais, conforme descrito no item 4.6.4, para a realização da especiação redox do arsênio.

4.6.4 Especiação de arsênio extraível em água

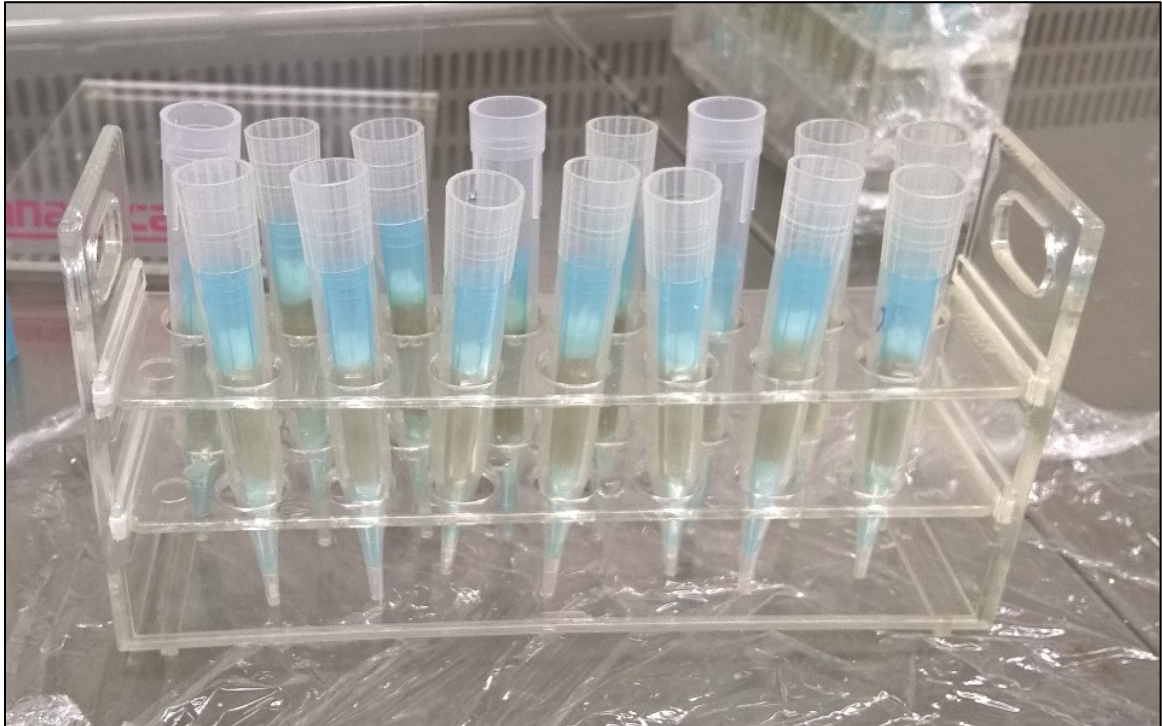
A especiação redox de arsênio foi realizada nos extratos de saturação coletados para cada amostra. Proposto inicialmente por RICHARDS (1954, página 84), o método da pasta de saturação do solo consiste na adição cautelosa do volume máximo de água a uma massa de solo, para promover a saturação, até a obtenção

de uma pasta brilhante, que deslize da espátula. Este método baseia-se na premissa de que a concentração do analito adsorvida a fase sólida e a dissolvida permanecerão em equilíbrio químico, desde que a separação em duas fases, ou seja, formação de uma fase líquida, não ocorra. Este método é muito utilizado em estudos de solos sujeitos a contaminação, sendo um método de referência, principalmente para a calibração de outros métodos. No entanto, este apresenta alguns pontos negativos, como a destruição das amostras e extração lenta (MEERS et al., 2006), sendo apenas a concentração de arsênio extraível em água, ou fração solúvel, amostrada. Neste trabalho, este método foi adotado para facilitar a comparação com as demais técnicas empregadas (*i.e.* DGT) e para que a fração solúvel do arsênio fosse o mais próxima da obtida nas condições *in situ*, apesar do teor de arsênio no extrato de saturação do solo ser menor que o obtido para o arsênio extraível em água em métodos que envolvem agitação (SZÁKOVÁ et al., 2009).

A pasta formada foi mantida em uma bandeja vedada e com um frasco contendo água em seu interior, para evitar evaporações, sendo deixada em repouso por 24 horas. Depois deste período, a pasta foi transferida para tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e, em seguida, a 4000 rpm por 20 minutos.

Após a centrifugação da pasta de saturação, o sobrenadante foi forçado através de cartuchos artesanais confeccionados conforme descrito por (MORENO-JIME et al., 2013). Os cartuchos foram montados no laboratório a partir da inserção de 0,40 g da resina de troca aniônica Dowex 1-x8 em uma ponteira de 1 mL, entre duas camadas de lã de vidro, sendo todo o conteúdo posicionado em uma ponteira de 5 mL (Figura 8). Previamente ao uso, os cartuchos foram condicionados com 2 mL de CaCl_2 $0,002 \text{ mmol L}^{-1}$. Todo o volume do extrato de saturação obtido após a centrifugação (em média, 3 mL) foi adicionado ao cartucho, sendo forçado a uma pressão constante, com o auxílio de uma micropipeta de 5 mL. Com este procedimento, visa-se que o As(V) presente na solução seja retido pela resina, enquanto o As(III) passe livremente pelo cartucho e seja coletado em um tubo de centrífuga de 15 mL. Em seguida, o As(V) retido na resina foi eluído com solução de 4 mL de NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. As amostras foram acidificadas com HCl para uma concentração final de $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, para preservação do analito até a quantificação.

Figura 8. Cartuchos artesanais para a especiação redox de arsênio.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.7 Difusão em filmes finos por gradiente de concentração

A técnica difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT, do inglês *diffusive gradients in thin films*) foi inicialmente empregada para a amostragem passiva de metais em águas, a partir do acúmulo constante de formas lábeis em um ligante, por meio da imersão de um dispositivo em sistemas aquáticos (DAVISON; ZHANG, 1994). No entanto, em poucos anos, suas possibilidades de uso foram ampliadas, sendo que sua aplicabilidade se estende para diversos meios e objetivos, desde que observadas algumas condições (HARPER. et al., 1998).

A DGT já foi utilizada para especiação de diversos metais e semimetais (ROLISOLA et al., 2014; TAFURT-CARDONA et al., 2015), para pré-concentrar a forma lábil de metais que se encontram em níveis de traços e ultra traços em água de rio (ÖSTERLUND et al., 2010) e em água do mar (PANTHER et al., 2014), fracionamento de metais inorgânicos e complexados com moléculas orgânicas (LUCAS et al., 2014), biodisponibilidade de metais em solo (LUCAS et al., 2014) e vem sendo aprimorada para sua utilização em água subterrânea (LUCAS et al., 2014).

Técnicas tradicionais de extração de elementos abrangem as concentrações totais de analitos extraíveis, o que geralmente inclui algumas frações biologicamente

indisponíveis de espécies orgânicas inertes e grandes colóides (DIVIŠ et al., 2005; LI et al., 2019). Na técnica DGT, apenas a fração lábil de um elemento é amostrada (DAVISON; ZHANG, 2012). A técnica DGT foi reportada como sendo a técnica mais adequada para estimar a fração biodisponível de arsênio em solos, utilizando a tecidos vegetais de uva como modelo biológico (WANG et al., 2014).

4.7.1 Fundamentos da DGT

A técnica difusão em filmes finos por gradientes de concentração se baseia na imersão de um dispositivo contendo duas fases distintas em um sistema aquático. Neste dispositivo, ocorre o transporte de íons em direção a um ligante pelo qual têm afinidade e em que serão acumulados. O ponto central da técnica está no uso de uma camada difusiva responsável por garantir que o transporte de íons em direção ao ligante ocorra exclusivamente por difusão molecular, pois, desta forma, é possível utilizar a 1ª Lei de Fick para os cálculos da concentração da solução.

Para que os íons cheguem ao ligante, estes precisam atravessar a camada difusiva - de espessura (Δg , em cm) e área (A , em cm^2) conhecidas - que os separa, a uma taxa característica para cada íon, denominada coeficiente de difusão (D , em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), que deve ser semelhante ao transporte dos mesmos na água. Assim, conhecendo-se a massa do íon (M , em ng) acumulada no agente ligante, o tempo de imersão e o coeficiente de difusão, pode-se determinar a concentração do íon em solução (C_s , em ng mL^{-1}).

Sendo o fluxo de íons (F):

$$F = D C_s \Delta g^{-1} \text{ (equação 2)}$$

Ainda, o fluxo pode ser determinado em função da massa de íons que atravessam a área do gel em um intervalo de tempo (t , em segundos):

$$F = M (A t)^{-1} \text{ (equação 3)}$$

A partir das duas equações descritas acima, determina-se a concentração do analito na solução:

$$C_s = M \Delta g (D t A)^{-1} \text{ (equação 4)}$$

A massa do íon acumulado no agente ligante é obtida, através da eluição do ligante e subsequente determinação da concentração do eluído (C_e , ng mL⁻¹) por uma técnica analítica apropriada. Neste trabalho, foi utilizada a HG-AFS.

A partir do valor da massa do íon retido pelo agente ligante, obtém-se a concentração dos íons em solução (C_s) utilizando-se a equação 4.

4.7.2 Dinâmica de reposição

Para o estudo da mobilidade de metais em solo HARPER et al. (1998) propuseram o modelo denominado DIFS (*DGT Induced Fluxes in Soils*), baseado no conceito de que a imersão de dispositivos DGT gera um fluxo de íons da fase sólida para a aquosa no solo.

Os íons presentes na água intersticial são removidos quando dispositivos DGT são imersos em um local, sendo em seguida repostos pela fase sólida do solo, para que o equilíbrio seja mantido. O fluxo gerado pela diferença de concentração pode ser parcial ou máximo. Assim sendo, este fluxo de íons poderia ocorrer de maneira diferente em diferentes situações.

Na primeira delas, quando a reposição de íons da fase sólida para solução é rápida e ocorre a uma taxa constante, pode-se determinar a concentração dos íons através da equação 3, a partir da massa retida no agente ligante da DGT. Esta situação é conhecida como Suprimento Total ou Constante dos íons da fase sólida para a solução.

Quando não ocorre fluxo contínuo da fase sólida para a água intersticial, a concentração obtida por DGT costuma cair com o avanço no período de imersão, pois a concentração do metal na interface sedimento-DGT tende a diminuir. Neste caso, a concentração inicial é calculada a partir da massa acumulada na resina do DGT. Esta situação é denominada Sem Reposição de íons a partir da fase sólida.

O fluxo de íons determinado pela DGT pode ainda ser próximo aquele encontrado *in situ*, semelhante ao fluxo máximo. No entanto, a reposição de íons para a fase aquosa ocorre parcialmente, não sendo suficiente para manter a concentração inicial constante.

Nos três casos, o perfil do fluxo de íons pode ser identificado pela comparação das concentrações dos íons na solução do solo obtidas pela técnica DGT e a fração trocável do elemento obtido por métodos convencionais. Quando a concentração da

solução obtida pela DGT é igual à concentração da solução obtida por outra técnica, então a concentração dos íons na solução do solo é mantida por uma completa reposição dos mesmos a partir da fase sólida. Por outro lado, quando a concentração dada pela DGT é menor, a reposição de íons é parcial e, em casos em que esta concentração equivale a menos de 10% do valor obtido por outras técnicas, a reposição dos íons não ocorre e a concentração dos mesmos decresce (ZHANG et al., 1998).

O conteúdo de arsênio obtido a partir do extrato de saturação do solo refere-se à concentração imediatamente disponível no solo, mas não provê nenhuma informação sobre a dinâmica de reposição do analito da fase sólida para a água intersticial do solo. Para a avaliação da possibilidade de hidrocarbonetos de petróleo alterarem esta dinâmica de reposição, amostras de solo também foram avaliadas a partir da técnica Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração

4.7.3 Montagem dos dispositivos

Foi utilizado o filtro de acetato de celulose comercializado na forma de discos de 2,5 cm de diâmetro, porosidade de 0,45 μm e espessura variando entre 115-145 μm .

Estes discos foram descontaminados a partir da imersão em solução de HNO_3 10% (v v⁻¹) por 12 h, sendo então lavados com água ultrapura até que o pH da solução de lavagem alcançasse pH maior que 5. Os discos descontaminados foram armazenados, em geladeira, em recipientes fechados contendo água ultrapura.

Como camada difusiva e camada ligante, foram utilizadas discos de poliacrilamida 1,5% (m v⁻¹) e ferrihidrita imobilizada em poliacrilamida 3% (m v⁻¹) respectivamente, comercializadas em formato de fitas de aproximadamente 10x30 cm (DGTResearch, Reino Unido), sendo os discos cortados em laboratório, em capela de fluxo laminar, e armazenados em solução de NaCl 0,03 mol L⁻¹ (discos difusivos) ou em água ultrapura (camada ligante). Os dispositivos de polipropileno foram obtidos na DGTResearch.

As montagens dos dispositivos foram realizadas com material descontaminado e em capela de fluxo laminar. Sobre o pistão de polipropileno foi adicionado, na seguinte ordem: um disco de ferrihidrita, um disco de poliacrilamida 1,5% (m/v) e um disco de filtro de acetato de celulose (Figura 9).

Figura 9. Dispositivos DGT montados.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.7.4 Imersão dos dispositivos

Alíquotas de 50 g de solo foram transferidas para placas de petri plásticas e hidratadas até a saturação. As placas com as amostras foram colocadas em uma bandeja plástica contendo um frasco com água, sendo vedadas, para evitar perda de umidade. Previamente à imersão, as amostras saturadas com águas ficaram em repouso por um período de 24 horas para permitir que ocorresse o equilíbrio de íons entre a solução e a fase sólida. Após este período, os dispositivos DGT foram imersos nas amostras posicionando o suporte com a abertura da janela virada para a pasta de solo, por um período de 48 horas. Para cada amostra, foram coletadas alíquotas do extrato de saturação dos solos, sendo estes transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL e sendo submetidas a centrifugação (10 min a 2000 rpm e 20 min a 4000 rpm) e acidificação com HCl.

4.7.5 Eluição

Após a imersão, os dispositivos foram retirados, lavados com água ultrapura e desmontados em capela de fluxo laminar, sendo os discos de ferrihidrita transferidos para tubos de polipropileno de 15 mL, para serem eluídos, com 2 mL de HCl 1,2 mol L⁻¹.

4.7.6 Cálculos

A DBL (do inglês, *Diffusive boundary layer*) é descrita como uma camada virtual formada entre a solução e a camada difusiva, em que o transporte de íons também

ocorre exclusivamente por difusão, gerando uma incerteza quanto a espessura da camada difusiva, o que pode levar a erros na determinação da concentração do metal. Em soluções com fluxo contínuo, a DBL é negligenciável, desde que se respeite uma espessura ótima (0,8 mm) da camada difusiva. No entanto, em amostras quiescentes, contornar o efeito da DBL é imprescindível, podendo-se aumentar a espessura da camada difusiva, para que o efeito da DBL se torne proporcionalmente desprezível, ou estimar a espessura da DBL, para a correção nos cálculos. No presente estudo, o valor da DBL foi assumido como 0,39 mm, sendo acrescido a espessura da camada difusiva para cada amostra (DAVISON; ZHANG, 2012; LUCAS et al., 2014).

O coeficiente de difusão adotado foi de $6,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, valor obtido a partir da média de coeficientes de difusão aparentes reportados para As(V) e As(III) na literatura em estudos em que ferrihidrita e poliacrilamida foram utilizados como agente ligantes e difusivos, respectivamente (ÖSTERLUND et al., 2010; LUO et al., 2010; MORENO-JIME et al., 2013; PANTHER et al., 2014).

4.8 Biodegradação

4.8.1 Esterilização das amostras para a caracterização microbiológica

Os frascos utilizados para a incubação dos solos foram previamente lavados com água de torneira e detergente, seguido de banho em hipoclorito de sódio 2% (v v⁻¹) e enxague com água deionizada por cinco vezes. Em seguida, os frascos foram secos através da ventilação em capela fluxo laminar previamente esterilizada (Álcool etílico 70% e banho de luz UV por 15 minutos) e submetidos a banho de luz UV por 15 minutos.

4.8.2 Qualidade do solo

Segundo PARR et al. (1992), um solo saudável funciona similarmente ao um tampão em relação a nutrientes e contaminante através dos mecanismos de adsorção e dessorção à argilominerais e matéria orgânica. Para o estudo da saúde do solo, micro-organismos apresentam atributos que os colocam como uma importante ferramenta para este aspecto, visto que respondem rapidamente a variações no meio e fornecem uma avaliação complexa da saúde do solo, de forma que parâmetros

químicos e físicos não são capazes de fornecer (PANKHURST et al., 1995).

4.8.2.1 Quociente metabólico do solo

A qualidade das amostras de solo para sustentar a microbiota foi obtida a partir do quociente metabólico do solo (qCO_2) (SILVA et al., 2007), calculado a partir da razão entre a Respiração Basal do Solo (RBS) e a Biomassa Microbiana do Solo (BMS), realizados segundo procedimento descrito em EMBRAPA (1997). Tanto a RBS quanto a BMS foram determinadas imediatamente após a chegada das amostras no laboratório nas alíquotas coletadas e transportadas em caixa de isopor (referência), para se minimizar as alterações sofridas na comunidade microbiana devido as mudanças nas condições de temperatura e umidade durante o transporte e armazenamento das amostras. Os dois testes foram realizados em duplicata para cada amostra de solo.

4.3.2.2 Respiração Basal do Solo

A Respiração Basal do Solo (RBS) foi determinada a partir da incubação de um frasco contendo amostras de solo (20 g) juntamente com um frasco contendo NaOH (10 mL, 1 mol L^{-1}). Os dois frascos foram incubados em um recipiente hermeticamente fechado de 1,7 L, por um período de 8 a 10 dias, no escuro. De acordo com o recomendado no método, a umidade das amostras foi ajustada para aproximadamente 60% da umidade na capacidade de campo. Após esse período, o NaOH foi retirado da incubação, sendo o conteúdo trapeado de CO_2 precipitado com $BaCl_2$ e o consumo de NaOH determinado a partir de titulação de neutralização com HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). O cálculo da quantidade de CO_2 produzida é realizado a partir do volume de HCl consumido na titulação e após ser descontado o volume de HCl consumido nos brancos.

4.8.2.3 Biomassa Microbiana do Solo

A Biomassa Microbiana do Solo (BMS) foi obtida a partir da determinação do carbono orgânico total (COT) em extratos (K_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) de amostras de solo fumigadas com clorofórmio isento de etanol e dos extratos das mesmas amostras não fumigadas. A determinação do COT foi realizada a partir da oxidação com dicromato

de potássio em meio fortemente ácido em sistema de refluxo (Figura 10), sendo o consumo de dicromato de potássio determinado a partir da titulação com sulfato de ferro e amônia. O cálculo do BMS ($\text{mg de C kg de solo}^{-1}$) foi realizado pela diferença do COT determinado nas amostras fumigadas e não fumigadas.

Figura 10. Estrutura para oxidação em sistema de refluxo.



Fonte: Elaborado para este estudo.

4.8.3 Umidade gravimétrica

A determinação do teor de umidade das amostras de solo foi realizada segundo protocolo descrito em EMBRAPA (1997). Desta forma, após a chegada em laboratório, alíquotas de aproximadamente 10 g das amostras, armazenadas em sacos plásticos vedados, foram transferidas para placas petri de vidro e levadas à estufa a 105 °C por 24 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para dessecadores até o resfriamento e foram novamente pesadas, sendo a umidade gravimétrica calculada

a partir da diferença entre o peso úmido e seco das amostras sobre o peso da amostra úmida.

Shewfelt et al. (2005) estudaram a influência da umidade relativa a capacidade de campo do solo na eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo totais. Para a umidade na faixa de 18 a 25% (50% a capacidade de campo), em um período de 30 dias, foi observada uma redução de 75 a 88% dos hidrocarbonetos do petróleo totais, quando realizada adição de fonte adicional de carbono e nitrogênio.

Neste trabalho, as incubações foram realizadas com as amostras em aproximadamente 60% sua capacidade de campo.

4.8.4 Temperatura

A temperatura tem efeito tanto na solubilidade do contaminante quanto diretamente no processo de biodegradação. Comunidades de micro-organismos estabelecidas em diferentes estações do ano estão sujeitas a diferentes respostas a contaminação por hidrocarbonetos, dependendo da temperatura a que estão submetidas (RONALD, 1981).

As incubações foram realizadas em uma sala com temperatura monitorada (26 ± 2 °C), no escuro.

4.8.5 Monitoramento da biodegradação

4.8.5.1 Respiração Basal do Solo

A determinação da produção de CO₂ do solo foi realizada antes (t=0) e imediatamente após o período de incubação (t=21), segundo o método descrito no item 4.3.2.2. A dinâmica de degradação da matéria orgânica foi calculada segundo o modelo exponencial simples (Equação 5), adotado por sua simplicidade e por ser amplamente empregado para estimar a degradação da matéria orgânica ou contaminantes orgânicos, tendo sido reportado como o modelo mais adequado para estimar a dinâmica de decomposição de composto orgânicos não recalcitrantes, a curto prazo (ZHOU et al., 2017).

$$RBS_t = RBS_i e^{-kt} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde RBS_t é a RBS no tempo t

RBS_i é a RBS inicial, antes da contaminação.

k é a constante de decaimento da matéria orgânica

t é o tempo, em dias

A constante de decaimento da matéria orgânica foi calculada, segundo proposto por ZHOU et al. (2017), conforme a Equação 6:

$$k = \ln\left(\frac{RBS_i}{RBS_f}\right) / tRBS_f \quad (\text{Equação 6})$$

Os cálculos foram realizados a partir dos valores de $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo dia}^{-1}$, obtidos para $t=0$ e $t=29$ (considerando os 8 dias de incubação do teste). O tempo de adaptação dos microrganismos às mudanças de condições (e.g. introdução de um contaminante no meio) antes de começar o processo de biodegradação, conhecido como *lag phase*, foi assumido como nove dias.

Foi assumido que, para cada dois moles de carbono produzidos no processo de biodegradação, um mol é incorporado a biomassa microbiana e apenas um mol sofre liberação sob a forma de CO_2 , segundo sugerido por Trindade (2005), com base no metabolismo aeróbio dos micro-organismos heterótrofos do solo. Esta premissa é válida tanto para a degradação do carbono introduzidos pela contaminação quanto para carbono da matéria orgânica do solo. Desta forma, o carbono total biodegradado (CTB) foi calculado como duas vezes o carbono determinado a partir do CO_2 ao longo do período de 21 dias. O CTB para os tratamentos gasolina e diesel foi calculado descontando-se o CTB da matéria orgânica natural do solo no tratamento controle. A eficiência da biodegradação (EB), foi calculada segundo a equação 7:

$$EB = \frac{CTB \times 100}{C} \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo C = carbono total na amostra calculado a partir da somatória do carbono adicionado pelos contaminantes e o carbono adicionado na uréia. O carbono orgânico total foi assumido como 85% para os contaminantes e 20% para a uréia.

4.8.5.2 Potencial hidrogeniônico

O pH é um atributo do solo que determinará quais populações de microorganismos estarão ativas no processo de degradação. A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo será mais rápida na faixa de pH do solo entre 6,5 e 8,0 (Gallego et al, 2001).

4.8.6 Biologia Molecular

As amostras destinadas ao estudo de expressão gênica foram processadas no Centro de Biologia Médica da *Queen's University Belfast*, Reino Unido no início de janeiro de 2019, sendo imediatamente processadas após a chegada.

Todos os materiais e soluções não estéreis utilizados foram previamente autoclavados e as bancadas de trabalho esterilizadas com uso de álcool etílico 70% (v v⁻¹). Todos os procedimentos foram realizados próximos a chama do Bico de Bunsen, para evitar contaminação microbiológica.

4.8.6.1 Preparo de reagentes

Tampão de corrida (Loading buffer) (6X)

Durante o carregamento das amostras no gel de agarose para a eletroforese, foi feita a adição do tampão de corrida para facilitar no monitoramento visual da separação das bandas durante a corrida do gel e também para facilitar a deposição e precipitação das amostras para o fundo dos poços do gel, através da presença do glicerol.

Foram adicionadas 25 mg de azul de bromofenol a 6,7 mL água deionizada, seguida de homogeneização. A adição de 25 mg de xileno cianol FF foi realizada à solução, seguida de homogeneização, e adição de 3,3 mL de glicerol. O volume total foi dividido em alíquotas de 1,5 mL mantidas envoltas por papel alumínio refrigeradas a - 20 °C.

Tampão Tris-acetato-EDTA (50X)

Durante o preparo do gel como durante a corrida do gel na eletroforese foi utilizado o tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) diluído para a concentração de 1x, para facilitar a separação dos ácidos nucleicos. O preparo foi realizado a partir da pesagem e adição de 242 g de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol em água, seguida da adição de 51,7 mL de ácido acético glacial e 100 mL solução de Na₂ EDTA 0,5 mol L⁻¹ com pH previamente ajustado para 8,0. O volume foi então ajustado para 1000 mL.

Gel para eletroforese

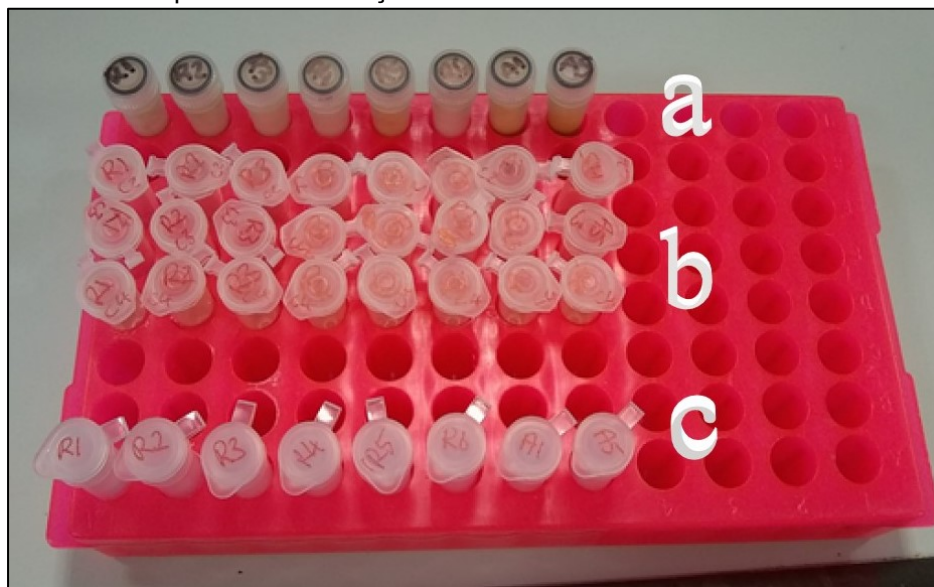
A corrida das amostras foi realizada em gel de agarose 1%, com a adição de brometo de etídeo, corante fluorescente que se intercala entre as bandas de DNA, permitindo sua visualização. Foram adicionados 1,0 g de agarose (para Biologia Molecular) uma solução contendo 98 mL de água deionizada, e 2 mL tampão Tris-acetato-EDTA (TAE). A mistura foi aquecida em micro-ondas por 30 segundos, homogeneizada e novamente aquecida por 30 segundos. Após o resfriamento, foi realizada a adição de 2,5 µL de brometo de etídio 10 mg mL⁻¹. A solução foi então despejada em um suporte para gel já selado com fita adesiva e com o molde de pentes para formação dos poços de carregamento das amostras.

4.8.6.2 Extração do DNA das amostras de solo

O DNA contido em cada amostra foi extraído a partir da utilização de Kit de extração para DNA em solos *DNeasy PowerSoil* (Qiagen, Alemanha), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante, com modificações. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente, e com o uso de tubos estéreis e com as soluções (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), fornecidos junto com o kit. Foram pesadas 0,25 g de cada amostra de solo e adicionadas aos tubos com microesferas fornecidos (Figura 11), para lise mecânica das células bacterianas, já acrescidos de 60 µL da solução C1, e homogeneizadas com vórtex. Em seguida, as amostras foram imersas em um banho com água a 60 °C por 10 minutos e foram levadas ao disruptor de tecidos Qiagen TissueLyser II por três ciclos de 3 minutos, com intervalos de 10 segundos. As

amostras foram centrifugadas a 9449 rpm por 30 segundos. O supernatante, aproximadamente 500 μ L, foi transferido para um novo tubo estéril de 2 mL, acrescido de 250 μ L da solução C2, homogeneizado com vórtex, incubado a 4 °C por 5 minutos, e centrifugado a 9449 rpm por 1 minuto. Até 600 μ L do supernatante foi transferido para um novo tubo de 2 mL, acrescido de 200 μ L da solução C3 e homogeneizado com vortex. Uma nova etapa de incubação (4 °C por 5 minutos) e centrifugação (9449 rpm, 1 minuto) foi realizada. Até 750 μ L do supernatante foi transferido para um novo tubo de 2 mL, foi acrescido de 1200 μ L da solução C4 e homogeneizado. As amostras foram carregadas nas microcolunas (MB Spin Column, figura 5) para retenção e concentração do DNA e centrifugadas (9449 rpm, 1 minuto) em três ciclos de 675 μ L, até que toda a solução fosse processada. As microcolunas foram lavadas com a adição de 500 μ L da solução C5 e centrifugação (9449 rpm, 30 segundos). Os resíduos da solução C5 foram removidos a partir de um novo ciclo de centrifugação (9449 rpm, 1 minuto). O DNA concentrado foi eluído, em um novo tubo estéril de 2 mL, com a adição de 50 μ L da solução C6 e centrifugação (9449 rpm, 30 minutos). As soluções contendo o DNA extraído das amostras foram mantidas refrigeradas a -20 °C.

Figura 11. Extração de DNA. a) tubos contendo microesferas e solução para a lise das células. b) sequência de tubos com as soluções para a extração. c) micro-colunas para a concentração de DNA.



Fonte: Elaborado para este estudo.

As concentrações de ácidos nucleicos de dupla-hélice extraída nas soluções estoque para cada amostra foram quantificadas com o uso do Fluorômetro Promega

Quantus™ e as concentrações de ácidos nucleicos e razões 230/260 (proteínas/ DNA) e 260/280 (DNA/ácidos húmicos) foram quantificadas a partir do espectrofotômetro ThermoFisher™ Nanodrop™.

4.8.6.3 Reação em cadeia polimerase

Soluções intermediárias de 20 ng μL^{-1} foram preparadas a partir da diluição das soluções com DNA extraído, para padronização das concentrações para a reação em cadeia polimerase (do inglês, *Polymerase chain reaction* - PCR).

O preparo das amostras para a realização dos PCR seguiu o protocolo descrito abaixo, alterando-se os *primers* (Quadro 1) de acordo com o gene alvo para amplificação.

1 μL da amostra de DNA, padronizado na concentração de DNA de 20 ng μL^{-1}

1 μL do *primer* direto e 1 μL do *primer* reverso

2,5 μL de desoxinucleotídeos contendo um grupo trifosfato ou dNTP

0,2 μL da enzima Taq polimerase

18,3 μL de água ultrapura

Para todos os PCR, um controle negativo foi preparado utilizando-se água ultrapura autoclavada no lugar da amostra. Para os genes marcadores de resistência ou metabolismo de arsênio, foram utilizados os *primers* descritos no Quadro 1.

O preparo da solução foi realizado em ambiente estéril e no gelo. O protocolo de aquecimento utilizado foi 3 minutos 94 °C, 35 ciclos: 45 segundos 94 °C, 1 minuto 54 °C, 1 minuto 72 °C. 10 minutos 72 °C.

4.8.6.4 Eletroforese e captura das imagens

Após realizado o PCR, os produtos foram corridos em gel de eletroforese, para verificar a eficiência da amplificação. O gel de agarose foi carregado na cuba e o tampão TAE 1X foi adicionado até o volume máximo. No primeiro e último poço foram adicionados 5 μL do padrão de corrida (*ladder*, 1kb). Para o carregamento das amostras nos poços, 5 μL de amostra foram acrescidos de 1 μL de tampão de carregamento 6X. As condições para a corrida do gel foram 100 mV por 50 minutos.

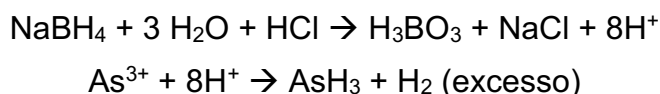
Quadro 1. Principais parâmetros influentes na PCR para os genes funcionais para arsênio.							
Genes alvos	Primers	Função	Sequência do primer	Temperatura de anelamento (°C)	T _m (°C)	Tamanho do amplicon (bp)	Ref.
arsB	AarsB1F	resistência ao arsênio	GTACACCACCAGRTACATNCC	55	54,9	≈750	(FAHY et al., 2015)
	AarsB1R		GAACATCGTCTGGAAYGCNAC		56,2		
acr3.1	Aacr1F	resistência ao arsênio	GCGATGGCCAGCTCRAARTTRTT	57 (57 decrescido de 0,5 °C a cada ciclo por 10 ciclos, após 52 °C por 30 ciclos)	59,4	≈750	(FAHY et al., 2015)
	Aacr2R		GGCCTGATCGTNATGATGTAYCC		57,3		
acr3.2	dacr5F dacr4R	resistência ao arsênio	CGGCCACGGCCAGYTCRAARAARTT TGATCTGGGTCATGATCTTCCC VATGMTGVT	52	64,1 63,5	≈750	(FAHY et al., 2015)
arrAb	ArrAUF1	respiração	GCWGCCCCAYTCVGGNGT	60	60,3	852	(DESOEUVRE et al., 2016)
	ArrAUR3		TGCAAGGHTGTACBDCHTGG		56,2		
	AS2F		GGGGTGCGGTCYTTNARYTC	55	58,5	≈630	
	AS1R		GTCCCNATBASNTGGGANRARGCNMT		62,5		
arsM	arsMF1 arsMR2	metilação do arsênio	CGWCCGCCWGGCTTWAGYACCCG TCYCTCGGCTGCGGCAAYCCVAC	61	65,2 67,4	≈350	(JIA et al., 2013)
aoxB	aoxBM1-2F aoxBM2-1R	oxidação do arsênio	CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA GGAGTTGTAGGCGGGCCKRTRTGDAT	52 (35 ciclos, 1 min 10 s tempo de alongação)	65,0 63,6	≈1100	(FAHY et al., 2015)

4.9 Parâmetros de Qualidade da Análise e Tratamento Estatístico

4.9.1 Geração de hidretos

A geração de hidretos é uma técnica empregada para elementos que podem ser separados da solução e podem formar hidretos voláteis, como As, Se e Bi, por exemplo. Desta forma, quando acoplada a uma técnica analítica, como a AFS ou ICP OES, observa-se um aumento da sensibilidade da análise e obtém-se uma redução de interferentes, o que se reflete no LD da análise.

A geração de hidretos (GH) reduz a fração inorgânica de arsênio a arsina (AsH_3) através da utilização de uma solução redutora, comumente, NaBH_4 em meio ácido (HCl) (TAKASE et al., 2002), conforme a equação abaixo:



O arsênio inorgânico está presente na fase condensada em dois estados de oxidação, como As(III) e As(V). A velocidade de redução destas espécies à arsina é diferente, sendo que durante o intervalo de análise, isto resulta em uma diferente taxa de redução entre o As(III) (100% de redução) e As(V) (40 a 60% de redução) (CAMPBELL, 1992). Para evitar que esta característica interfira na qualidade dos resultados, neste trabalho, optou-se pela adição *offline* de solução de tiourea às amostras, ao branco da análise e aos padrões da curva de calibração, no mínimo duas horas antes da análise, com o intuito de efetuar a pré-redução de As(V) a As(III). A concentração final de tiourea nas amostras antes da análise foi de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$.

4.9.2 Espectrometria de fluorescência atômica

Para a análise de rotina em amostras ambientais, o atributo de ser multielementar, com baixo consumo do volume de amostra e baixo limite de detecção são os mais procurados em uma técnica analítica. Assim, a espectrometria de massas tem preferência para a análise destas amostras. No entanto, um ponto negativo desta técnica é seu alto custo operacional e a maior susceptibilidade a interferências espectrais e de matriz.

Apesar de ser mono-elementar, a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) se equipara a espectrometria de massas quando comparadas as sensibilidades

e a extensão da faixa de calibração linear, de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} para ambas. A AFS tem ainda vantagens sobre a espectrometria de massas, *i.e.* menor custo operacional e menor influência de interferências de matriz, principalmente quando acoplada a geração de hidreto (SANCHEZ-RODAS et al., 2010).

Na HG-AFS, as espécies voláteis obtidas na geração de hidretos são isoladas em um separador gás-líquido e, em uma chama de argônio e hidrogênio, são atomizadas e excitadas. Em outras palavras, os elétrons absorvem energia e passam do estado fundamental para o excitado. Quando os elétrons retornam ao seu estado fundamental, ocorre a emissão da energia absorvida na forma de fótons, daí o nome fluorescência.

4.9.3 Controle de qualidade da análise

Para garantir a exatidão dos resultados, todos os procedimentos realizados neste trabalho foram controlados por gravimetria, utilizando balança analítica.

4.9.3.1 Limite de detecção do método

Para o cálculo do limite de detecção, em cada análise foi utilizado um branco composto pela mesma matriz das amostras, *i.e.* HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ e tioureia $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ou HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, tioureia $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, no caso dos eluídos de As(V).

O limite de detecção (LD) instrumental, ou seja, referente a quantificação direta no ICP OES e HG-AFS foi determinado de acordo recomendação da IUPAC (CURRIE, 1999), segundo a equação ($n=10$):

$$\text{LD} = 3 \sigma + |\bar{x}| \text{ (equação 9)}$$

Sendo σ = desvio padrão das leituras do branco da amostra em $\mu\text{g L}^{-1}$

$|\bar{x}|$ = média das leituras do branco da amostra em $\mu\text{g L}^{-1}$

4.9.3.2 Monitoramento da recuperação de padrão intermediário da curva de calibração

Para o monitoramento de possíveis variações no sinal do equipamento, a cada bloco de 10 amostras, foi feita a leitura de um padrão intermediário da curva de calibração (0; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e $5 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo que foi aceita a variação da recuperação de $<10\%$. Se observada variação superior a estipulada, uma nova curva de calibração era realizada.

4.9.3.3 Recuperação dos *Spikes* da análise

Além dos padrões intermediário da curva, a cada análise, ao menos uma amostra de cada tratamento (controle, contaminante - gasolina e contaminante - diesel) era selecionada, após a leitura, para a realização da adição de arsênio a uma concentração final de $\approx 1 \mu\text{g L}^{-1}$ e subsequente leitura. O intuito da realização da leitura de *spikes* é monitorar interferências que as complexas matrizes das amostras podem ter na quantificação do arsênio, desde a geração do hidreto até os processos envolvidos na detecção do analito.

A recuperação do *spike* foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = [(a - b)/c]100 \text{ (Equação 10)}$$

Sendo, a = concentração de arsênio determinada após a adição do *spike*

b = concentração de arsênio determinada antes da adição do *spike*

c = concentração de arsênio calculada (teórica) após adição do *spike*

A variação na recuperação aceita foi de <20%, ou seja, eram consideradas satisfatórias as recuperações compreendidas dentre a faixa de 80 a 120%.

4.9.4 Tratamento estatístico

As concentrações dos elementos foram expressas, neste estudo, pela média e o desvio padrão calculados para as três leituras obtidas durante a quantificação. Para a realização dos tratamentos estatísticos, os valores inferiores ao limite de quantificação foram assumidos como $LQ/2$. A normalidade dos dados foi avaliada segundo o teste Shapiro-Wilk. A comparação entre duas variáveis normais foi realizada através do teste estatístico t-*Student* pareado (*i.e.* Teste preliminar, concentração em função do tempo, $\alpha=0,05$). A comparação entre duas ou mais variáveis com distribuição não-normal foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) e, quando cabível, foi realizado o desdobramento dos resultados a partir do teste *post hoc* Student-Newmans-Keuls. Para avaliar interações entre múltiplas variáveis, as amostras também foram analisadas por meio de análise multivariada de dados, pela técnica Análise dos Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). Todos os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *Software* de domínio público R Studio.

5 RESULTADOS

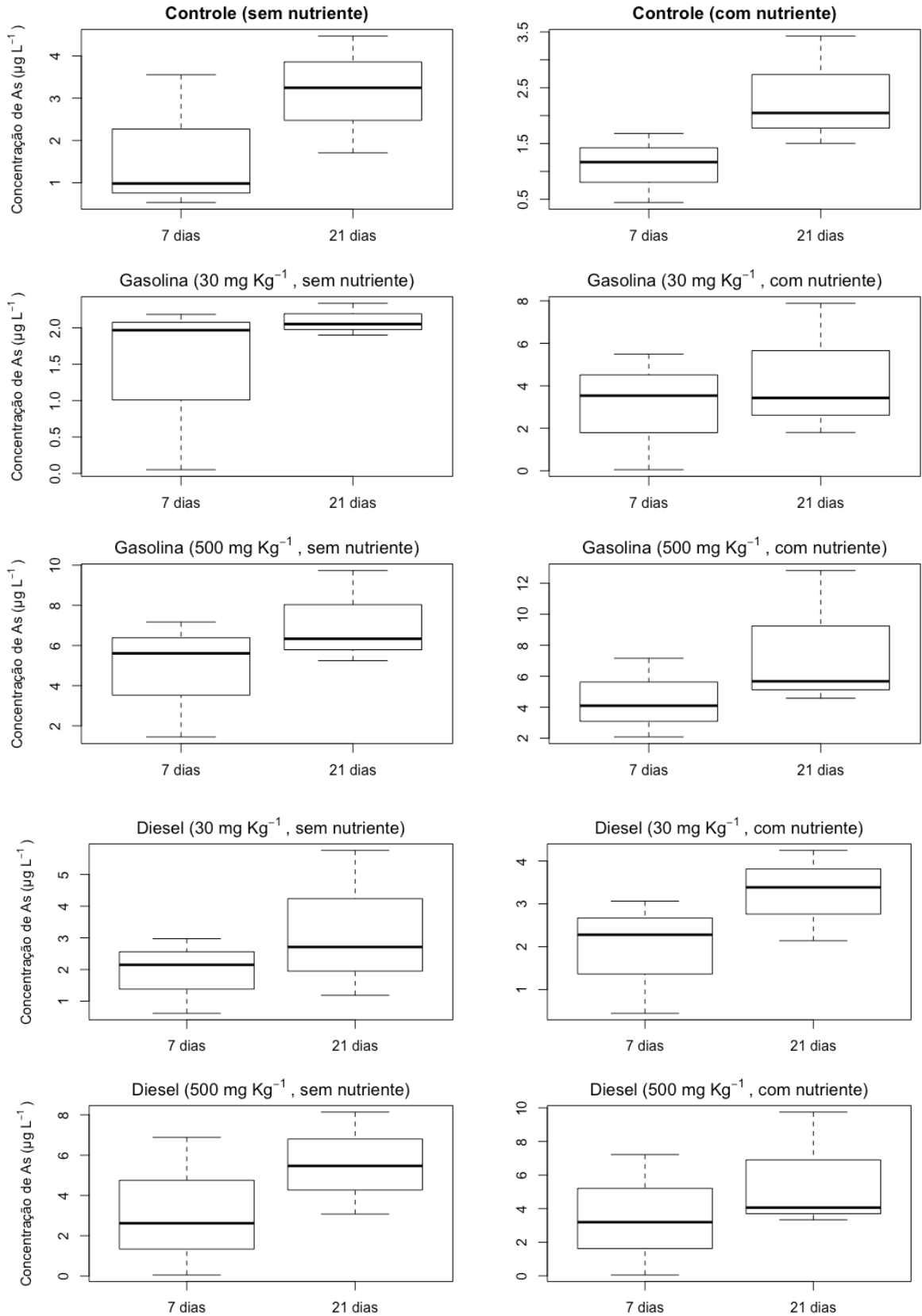
5.1 Teste preliminar

A partir do tratamento dos dados com o teste estatístico *T-student* pareado, não foi observada diferença significativa em relação ao tempo para o tratamento controle sem nutriente (p -valor=0,3196), controle com nutriente (p -valor=0,1561), gasolina sem nutriente (p -valor=0,3632), gasolina com nutriente (p -valor=0,2142), diesel sem nutriente (p -valor=0,2645) e diesel com nutriente (p -valor=0,3888). Em relação a adição de nutriente não foi encontrada diferença significativa para nenhum dos tratamentos considerados (p -valores: controle= 0,3795; gasolina-30= 0,148; gasolina-500= 0,9395; diesel-30=0,9762; diesel-500=0,2142).

Conforme observado na figura 12, nas amostras controle, a adição de ureia apresentou queda (de 11 a 36%) para todos os três solos considerados, quando comparada com as concentrações sem adição deste nutriente. Já para as amostras contaminadas com gasolina, foi observado um crescimento de 95 a 330% para a concentração de 30 mg kg⁻¹ e de 70 a 130% para a concentração do contaminante de 500 mg kg⁻¹. No caso do diesel, esse aumento variou de 70 a 180%, para as duas concentrações de contaminante. Independentemente da adição de ureia, o aumento na mobilidade do arsênio inorgânico foi de 20 e 180% para as concentrações de 30 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹ de gasolina, respectivamente; e 20 e 90% para as concentrações de 30 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹ de diesel, respectivamente.

Baseados nos resultados obtidos, e ainda que o tratamento estatístico não tenha demonstrado diferenças significativas, as contaminações seguintes foram realizadas durante um período de 21 dias de incubação. Também foi realizada a adição de ureia (0,01%, m m⁻¹) para os três tratamentos e a concentração selecionada para o prosseguimento dos testes foi de 500 mg kg⁻¹ para ambos contaminantes. Um importante fator considerado para a escolha da concentração de 500 mg kg⁻¹ para os testes foi maior viabilidade de adição e homogeneização do contaminantes nas amostras de solo, o que foi dificultado na adição de massas muito reduzidas de contaminante.

Figura 12. Concentrações de arsênio extraível em água ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas no teste preliminar.



Fonte: Elaborado para este estudo.

As concentrações de hidrocarbonetos do petróleo em solos superficiais anos após um derramamento tem sido reportadas como valores médios de 1127 mg kg⁻¹ para gasolina e 4212 mg kg⁻¹ diesel em países europeus (PINEDO et al., 2013) e de 55 a 302 mg kg⁻¹ para HPT na Nigéria (OKOP; EKPO, 2012). Assim, a concentração estudada (500 mg kg⁻¹) neste trabalho encontra-se dentro da faixa de concentração reportada na literatura para áreas contaminadas e representa uma concentração residual de hidrocarbonetos do petróleo, diferentemente de trabalhos anteriores, que abordaram plumas de contaminação (BROWN et al., 2010; COZZARELLI et al., 2016).

5.2 Caracterização das amostras

Na tabela 3, estão discriminadas as concentrações semi-totais dos elementos.

Tabela 3. Concentrações semi-totais dos elementos (média ± desvio padrão, n=2)

Amostras	Al (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	As (mg kg ⁻¹)	Uso do solo
P01	51102 ± 5408	67075 ± 5995	6297 ± 282	7,275± 0,35	urbana
P02	38091 ± 5207	40237 ± 3997	384 ± 29	9,04± 0,3	urbana
P03	46123 ± 673	46217 ± 390	1929 ± 88	0,3± 0,12	urbana
P04	62341 ± 9383	54169 ± 7510	711 ± 80	0,24± 0,22	urbana
P05	59469 ± 4713	45939 ± 1812	1616 ± 93	35± 6	urbana
P06	57634 ± 3168	52512 ± 278	4111 ± 216	14,75± 0,41	urbana
P07	99583 ± 7978	45248 ± 3192	585 ± 8	1,64± 0,48	rural
P08	38036 ± 2433	37358 ± 3460	2242 ± 126	4 ± 2	rural
P09	51187 ± 2062	61605 ± 3252	835 ± 86	4,13± 0,13	rural
P10	56256 ± 6524	48843 ± 5038	475 ± 16	5,19± 0,04	vegetação
P11	34200 ± 1305	40633 ± 1726	523 ± 114	10,8± 0,12	vegetação
P12	19411 ± 2471	35503 ± 319	459 ± 55	13,5± 0,09	rural
P13	55931 ± 4722	93268 ± 5964	1007 ± 139	6,09± 0,9	vegetação
P14	45517 ± 7158	36558 ± 5439	892 ± 106	5,32± 0,01	vegetação
P15	18395 ± 2231	27087 ± 1444	652 ± 34	6 ± 1	vegetação
P16	24192 ± 103	33050 ± 2951	390 ± 15	3,39± 0,48	rural
P17	24558 ± 2300	31796 ± 2170	1376 ± 7	6,54± 0,18	rural
P18	38084 ± 1013	41347 ± 2058	383 ± 15	6,55± 0,07	rural
P19	46699 ± 816	74679 ± 2172	5308 ± 1215	19± 5	rural
P20	80375 ± 7907	69150 ± 2901	410 ± 81	24± 2	rural
P21	62922 ± 6298	72236 ± 8173	1412 ± 310	17,07± 0,28	rural
P22	29842 ± 1329	26514 ± 441	460 ± 94	2,54± 0,62	rural
P23	30156 ± 702	35688 ± 97	706 ± 92	8,63± 0,09	rural
P24	46502 ± 3801	49352 ± 3285	1440 ± 107	6± 2	rural
P25	30469 ± 1599	22606 ± 693	325 ± 31	3,15± 0,06	urbana

As concentrações variaram consideravelmente entre as amostras. Os pontos

P19 a P21 localizam-se próximos ao Córrego do Piririca, onde foi descrita uma anomalia de arsênio, sendo observada elevada concentração de arsênio e ferro nestas amostras. As concentrações obtidas nestes pontos corroboram aquelas reportadas por Abreu e Figueiredo (2004) que encontraram concentrações de arsênio variando de 25 a 764 mg kg⁻¹ em solos superficiais (0 a 30 cm de profundidade) coletados nas proximidades da Faixa do Piririca.

A influência da anomalia também pode ser observada na tabela 4, em que são apresentados os fatores de enriquecimento para cada amostra.

Tabela 4. Fatores de enriquecimento do arsênio usando o Mn e Fe como elemento de referência

Amostras	Mn (TI)	Fe (TI)	Uso do solo
P01	3,4	0,6	urbana
P02	7,6	13,5	urbana
P03	2,4	1	urbana
P04	3,1	3,9	urbana
P05	30,9	14,8	urbana
P06	11,1	2,4	urbana
P07	1,5	1,9	rural
P08	4,6	1,3	rural
P09	2	2,5	rural
P10	4,2	7,3	vegetação
P11	9,6	12,5	vegetação
P12	17,8	23,2	rural
P13	2,5	3,9	vegetação
P14	5	3,4	vegetação
P15	8,5	5,9	vegetação
P16	3,5	5	rural
P17	7,8	3	rural
P18	5,2	9,4	rural
P19	8,6	2,4	rural
P20	12,6	35,9	rural
P21	7,6	6,6	rural
P22	4	3,9	rural
P23	8,5	7,3	rural
P24	5,2	3	rural
P25	5,5	6,5	urbana

Os resultados mostram que os solos coletados podem ser classificados desde origem litogênica até índices elevados de contaminação. Tendo em vista as particularidades da região e que os índices obtidos pelo fator de enriquecimento apresentaram divergências entre os resultados em função do elemento de referência adotado, a avaliação da origem do arsênio, natural ou antrópica, segundo o enriquecimento do elemento, foi realizada considerando-se o uso do solo na região e

também a presença da anomalia anteriormente mencionada, para a interpretação dos resultados.

A tabela 5 apresenta os dados obtidos para pH e condutividade elétrica nas duas coletas.

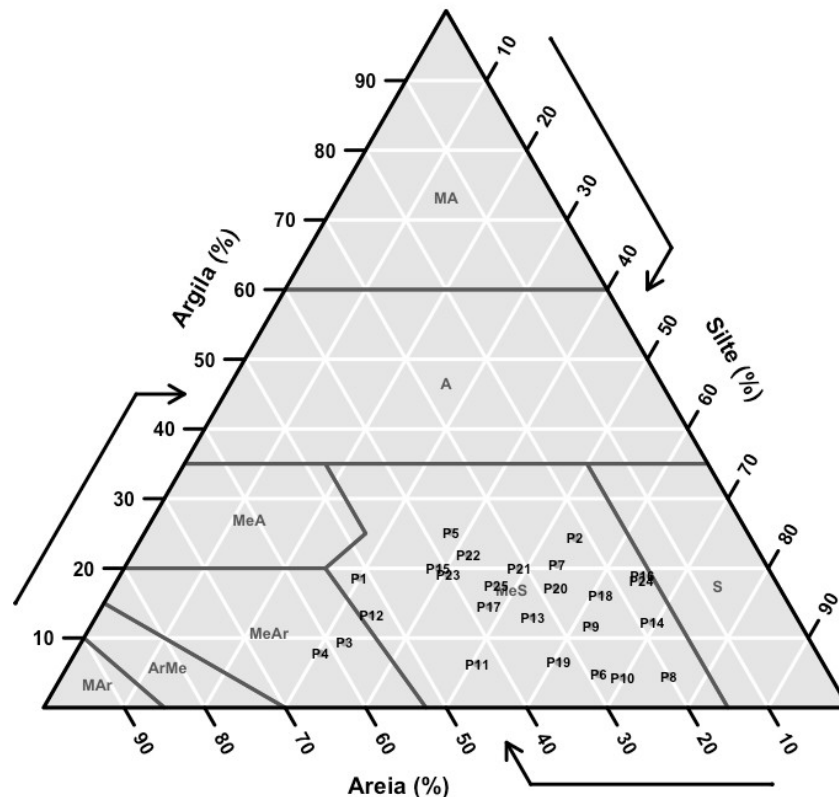
Tabela 5. Parâmetros físicos das amostras

Amostra	Coleta I. Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Coleta II. Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Coleta I. pH
P6	52,00	-	6,64
P5	133,30	-	6,56
P4	95,20	44	6,43
P3	35,20	35,3	5,67
P2	93,60	60	6,05
P1	73,70	34,3	5,04
P7	125,00	136,6	4,56
P8	104,60	139,9	5,77
P9	65,70	33,5	6,69
P10	58,10	63,5	7,52
P11	51,70	102,2	7,27
P12	143,60	155	7,33
P13	136,10	154,8	5,98
P14	84,60	35,2	7,32
P15	130,60	76,7	7,39
P16	101,70	14,41	4,91
P17	299,00	55,2	3,97
P18	21,20	62	4,61
P19	96,00	158,6	5,26
P20	11,61	65,6	3,99
P21	43,00	41,4	4,11
P22	59,40	134,2	4,62
P23	37,60	-	4,40
P24	139,20	-	4,54
P25	28,80	-	4,59

As amostras apresentam grande variação, principalmente quanto ao pH, cujos dados evidenciam a presença de alguns solos acentuadamente ácidos. A condutividade elétrica também apresentou grande variação para as amostras. Assim, estes dois parâmetros puderam ser avaliados quanto a sua influência nas concentrações de arsênio nas amostras.

A figura 13 é uma representação das classes texturais das amostras de solo.

Figura 13. Triângulo textural das amostras.



Fonte: Elaborado para este estudo.

No presente trabalho, os solos enquadram-se na categoria de Média Siltosa (n=23) e Médio Arenosa (n=2), segundo a classificação do SiBCS (EMBRAPA, 2013). Segundo Abdel-Moghny et al. (2012), solos de textura intermediária apresentam as melhores condições para o processo de biodegradação, visto que apresentam melhores condições de aeração do solo quando comparados com solos de textura argilosa e menor migração vertical dos contaminantes em comparação com solos de textura arenosa, além de solos arenosos caracterizarem-se por baixa atividade biológica e capacidade de troca catiônica.

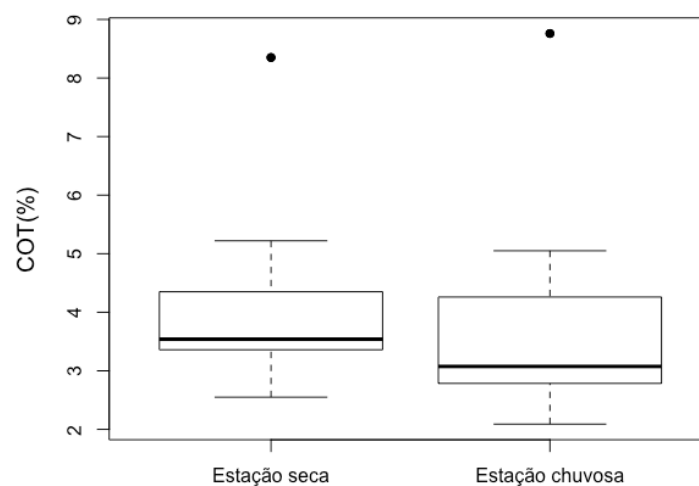
Na tabela 6, observa-se os teores de carbono orgânico das amostras por campanha.

Tabela 6. Carbono orgânico total (%) das amostras

Amostra	Estação seca	Estação chuvosa
P01	3,48	-
P02	3,31	-
P03	3,02	2,44
P04	2,61	2,90
P05	3,71	5,05
P06	3,42	4,23
P07	8,35	8,76
P08	2,55	3,13
P09	3,54	3,83
P10	3,83	3,54
P11	3,36	3,02
P12	3,36	2,73
P13	5,22	4,64
P14	3,31	2,49
P15	3,83	2,32
P16	3,48	2,84
P17	4,81	2,09
P18	4,87	4,23
P19	4,35	4,29
P20	4,06	3,02
P21	4,99	4,41
P22	3,36	2,84
P23	3,54	-
P24	5,05	-
P25	3,42	-

Comparando-se as estações seca e úmida, as amostras apresentaram uma diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p=0,00898$) quanto ao teor de COT, sendo maior na estação seca.

Figura 14. Carbono orgânico total por período de coleta.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Conforme observado na figura 14, os teores de COT apresentaram variação entre as amostras de uma mesma coleta. No entanto, esta variação é mais acentuada quando considerado o COD, conforme observado na tabela 7 e figura 15.

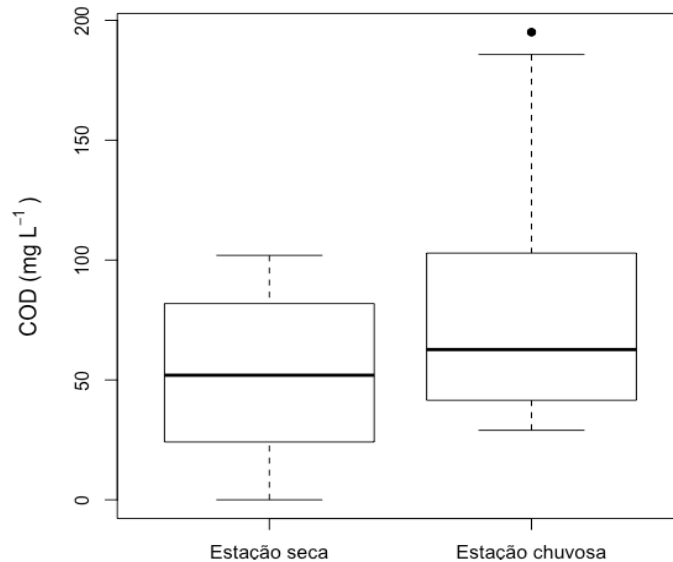
Tabela 7. COD (mg Kg^{-1}) das amostras (média \pm desvio padrão, n=2)

	Estação seca	Estação chuvosa
P01	102 \pm 36,8	ND
P02	50 \pm 48,1	ND
P03	86 \pm 2,8	86,8 \pm 12,8
P04	12 \pm 5,7	72,7 \pm 29,8
P05	ND \pm ND	167,6 \pm 14,3
P06	12 \pm 0	40,4 \pm 0,2
P07	76,2 \pm 75,8	195,1 \pm 39,6
P08	38,5 \pm 14,7	185,7 \pm 98,9
P09	40,4 \pm 11,7	57,5 \pm 19,2
P10	52 \pm 6,8	67,2 \pm 9,2
P11	12,2 \pm 7,9	173,7 \pm 54
P12	91,9 \pm 17,4	55,3 \pm 0,9
P13	77,4 \pm 52,7	119 \pm 12
P14	24,1 \pm 2,7	71,4 \pm 58,6
P15	53 \pm 11,4	42,7 \pm 5,4
P16	28,1 \pm 15,9	60,3 \pm 12,1
P17	16,4 \pm 8,7	45,4 \pm 0,2
P18	83,1 \pm 0,1	29 \pm 14,6
P19	13,1 \pm 5,3	39,8 \pm 14,9
P20	94,8 \pm 5,5	36,6 \pm 0,2
P21	73,5 \pm 15,2	65 \pm 30,5
P22	81,9 \pm 5,1	38,9 \pm 5
P23	93,8 \pm 2,6	ND
P24	65 \pm 5,9	ND
P25	34,7 \pm 10,3	ND

ND = não determinado

O COD apresentou uma diferença significativa ($p=0,00672$) entre as campanhas, sendo mais elevado na estação chuvosa, apesar do oposto ter sido observado para o COT.

Figura 15. Carbono orgânico dissolvido por período de coleta.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Essa diferença é consistente com a variação do tempo entre a estação seca e a chuvosa e já foi reportada anteriormente (DEB; SHUKLA, 2011), sendo que o aumento da temperatura e pluviosidade na estação chuvosa favorecem a lixiviação da matéria orgânica.

A matéria orgânica do solo consiste em uma mistura de produtos vegetais e animais em diferentes etapas de decomposição. Este material complexo pode ser dividido em substâncias não-húmicas e substâncias húmicas (SH). Substâncias não-húmicas compreendem compostos orgânicos relativamente simples, que são solúveis em água, como é o caso de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e de carboidratos monoméricos. Por serem solúveis, apresentam mobilidade no solo, sendo mais suscetíveis a processos como absorção, mineralização e lixiviação. Dentre as frações da matéria orgânica do solo, as SH são os compostos mais estáveis, formadas durante processo conhecido como humificação, sendo divididas em ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina, que são similares em estrutura, mas diferem quanto a solubilidade. São caracterizadas como altamente ácidas e de peso molecular relativamente alto (KLEBER; JOHNSON, 2010). Ácidos húmicos e principalmente ácidos fúlvicos apresentam importante papel na mobilização de elementos traço no solo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

5.3 Mobilidade do arsênio em função da contaminação por gasolina e diesel

Na tabela 8 observa-se as concentrações das espécies inorgânicas de arsênio no extrato de saturação das amostras de solos para os três tratamentos na estação seca. Para As(III), o tratamento controle apresentou uma faixa de concentração de 165 a 1251 ng L⁻¹, sendo as faixas de concentração de 235 a 2048 ng L⁻¹ e 112 a 2152 ng L⁻¹ para gasolina e diesel, respectivamente. Para As(V), as faixas foram 106 a 423 ng L⁻¹, 103 a 1597 ng L⁻¹ e 101 a 1882 ng L⁻¹, para controle, gasolina e diesel, respectivamente. Concentrações similares foram encontradas para água subterrânea em Minesota, EUA a 100 m do ponto de ruptura de uma tubulação de combustível (COZZARELLI et al., 2016), mas muito inferior à concentração de 84 µg L⁻¹, reportada para uma área úmida (*wetland*) após 21 dias de contaminação com BTEX (ZIEGLER et al., 2015). A maior diferença em relação a área úmida é esperada, tendo em vista seu maior conteúdo de matéria orgânica em relação aos solos do presente estudo e em águas subterrâneas. Além disso, os processos de oxid-redução por atividade biológica são altamente efetivo em áreas úmidas (BURGIN et al., 2011).

Quando comparada a outras fontes de carbono orgânico, a faixa de arsênio extraível em água neste estudo foi consideravelmente menor que a faixa de contaminação de 500 a 2000 µg L⁻¹ reportadas para um solo com elevado teor de arsênio após a adição de biocarvão (BEESLEY et al., 2013), 20 a 8810 µg L⁻¹ após 21 dias da adição de serapilheira (DRADRACH et al., 2019) e 30 a 1460 µg L⁻¹ após adição de esterco bovino, lodo de esgoto e serrapilheira (KARCZEWSKA et al., 2017). Embora inferior à mobilização relatada em muitos estudos anteriores, a adição de gasolina ou diesel ao solo superficial no presente aumentou a fração de arsênio extraível em água em até 20 vezes (concentração no tratamento com contaminante/concentração no grupo controle).

A espécie predominante neste estudo foi As(III) assim como reportado por Cozzarelli et al. (2016) e diferentemente, *i.e.* maior As(V), do que reportado para adição de serapilheira (DRADRACH et al., 2019) e para uma mistura de turfa e esterco de galinha adicionados a solos artificialmente contaminados com o conservante de madeira arsenato de cobre cromado (CCA) (DOBRAN; ZAGURY, 2006). Concentrações superiores de As(III) foram encontradas anteriormente apenas para um local contaminado com hidrocarbonetos, caracterizado por condições saturadas e anaeróbias, enquanto os demais trabalhos, avaliando o solo superficial, em condições

aeróbias, apresentaram maior teor de As(V). Esta comparação e os resultados encontrados no presente estudo sugerem que hidrocarbonetos de petróleo promovem uma redução mais expressiva de As(V) a As(III) que outras fontes de carbono orgânico, levando a cenários mais próximos aos encontrados em condições de saturação.

Em períodos de tempo semelhantes, a mobilização de arsênio no presente estudo foi inferior às anteriormente relatadas. No entanto, ressalta-se que as concentrações de arsênio nos solos anteriormente estudados eram significativamente mais elevadas que as observadas no presente estudo, chegando a ser 100 vezes superiores. Além disso, ressalta-se que, com o objetivo de avaliar apenas o impacto da biodegradação e dos parâmetros físico-químicos do solo nas condições de contaminação do presente estudo, todas as incubações foram realizadas no escuro, a fim de excluir os efeitos da fotodegradação e/ou redução foto-induzida por ferro dos contaminantes orgânicos, o que poderia aumentar a mobilização de arsênio como resultado final (KIM et al., 2019).

Tabela 8. Concentrações (ng L^{-1}) das espécies inorgânicas de arsênio na solução do solo para os três tratamentos (média \pm desvio padrão, $n=3$) - Estação seca

Amostras	As(III)			As(V)		
	Controle	Gasolina	Diesel	Controle	Gasolina	Diesel
P01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P02	<LD	<LD	112 \pm 58	<LD	<LD	<LD
P03	<LD	968 \pm 185	225 \pm 13	143 \pm 19	105 \pm 20	101 \pm 8
P04	<LD	<LD	<LD	106 \pm 8	103 \pm 3	119 \pm 27
P05	498 \pm 180	449 \pm 74	<LD	136 \pm 46	346 \pm 123	146 \pm 83
P06	194 \pm 19	455 \pm 21	<LD \pm	109 \pm 1	79 \pm 20	124 \pm 49
P07	<LD	507 \pm 113	415 \pm 100	<LD	<LD	<LD
P08	<LD	<LD	1405 \pm 827	<LD	<LD	<LD
P09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P10	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P11	<LD	541 \pm 203	457 \pm 334	<LD	<LD	<LD
P12	<LD	1872 \pm 1	1780 \pm 11	<LD	290 \pm 38	539 \pm 89
P13	<LD	391 \pm 50	489 \pm 240	120 \pm 26	125 \pm 3	236 \pm 84
P14	<LD	351 \pm 55	180 \pm 30	153 \pm 11	141 \pm 14	135 \pm 6
P15	<LD	414 \pm 130	<LD	181 \pm 7	180 \pm 10	<LD
P16	<LD	2048 \pm 431	675 \pm 144	107 \pm 29	144 \pm 8	157 \pm 9
P17	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P18	525 \pm 180	1451 \pm 450	1615 \pm 492	369 \pm 99	1597 \pm 261	1882 \pm 48
P19	1251 \pm 328	582 \pm 280	1560 \pm 175	423 \pm 148	264 \pm 133	284 \pm 15
P20	<LD	588 \pm 128	323 \pm 28	<LD	<LD	<LD
P21	165 \pm 27	625 \pm 145	177 \pm 54	<LD	<LD	<LD
P22	491 \pm 85	<LD	457 \pm 10	<LD	<LD	<LD

P23	<LD	237 ± 69	2152 ± 624	<LD	<LD	<LD
P24	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P25	230 ± 7	235 ± 19	254 ± 19	<LD	<LD	<LD

Dos 20 solos analisados na campanha da estação chuvosa, 10 apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção para todos os tratamentos e ambas espécies (Tabela 9). No entanto, as faixas de concentrações permaneceram similares para os três tratamentos e espécies estudadas.

Para ambas as espécies inorgânicas de arsênio, não foram observadas diferenças significativas entre as campanhas de amostragem (seca e chuvosa) ao comparar-se os tratamentos controle (As(III): p-valor = 0,5494; As(V): p-valor= 0,732), gasolina (As(III): p-valor = 0,1774; As(V): p-valor = 0,3762) ou diesel (As(III): p-valor = 0,1087; As(V): p-valor = 0,1597).

Tabela 9. Concentrações (ng L⁻¹) das espécies inorgânicas de arsênio na solução do solo para os três tratamentos (média ± desvio padrão, n=3) - Estação chuvosa

Amostras	As(III)			As(V)		
	Controle	Gasolina	Diesel	Controle	Gasolina	Diesel
P03	<LD	<LD	<LD	213 ± 141	194 ±	<LD
P04	<LD	726 ± 51	561 ± 31	479 ± 350	263 ± 20	<LD
P05	<LD	<LD	<LD	<LD	351 ± 43	<LD
P06	693 ± 204	1043 ± 54	201 ± 74	<LD	<LD	<LD
P07	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P08	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P10	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P11	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P12	<LD	<LD	<LD	NA	NA	NA
P13	<LD	<LD	<LD	NA	NA	NA
P14	384 ± 148	1421 ± 264	424 ± 96	NA	NA	NA
P15	<LD	<LD	<LD	NA	NA	NA
P16	<LD	<LD	<LD	NA	NA	NA
P17	<LD	37567 ± 1447	2013 ± 308	<LD	552 ± 218	<LD
P18	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
P19	151 ± 58	<LD	255 ± 20	177 ± 81	263 ± 63	319 ± 99
P20	1989 ± 822	744 ± 363	2968 ± 981	1083 ± 283	106 ± 12	312 ± 59
P21	870 ± 158	1740 ± 41	624 ± 38	1783 ± 199	2751 ± 619	312 ± 5
P22	<LD	<LD	<LD	235 ± 102	286 ± 56	155 ± 9

NA = não analisado

5.4 Concentração de arsênio nas campanhas

As concentrações das espécies inorgânicas obtidas nas amostras de solo estão apresentadas nas figura 16 e 17, e foram avaliadas segundo o teste de *Kruskal-Wallis*. Não foi observada diferença significativa nas concentrações das espécies inorgânicas de arsênio entre as campanhas de coletas (seca e chuvosa), quando comparados os tratamentos controle (As(III): p-valor=0,5494; As(V): p-valor=0,732), gasolina (As(III): p-valor=0,1774; As(V): p-valor=0,3762) ou diesel (As(III): p-valor=0,1087; As(V): p-valor=0,1597).

Figura 16. *Boxplot* com as medianas das concentrações de As(III) em função do tratamento e campanha.

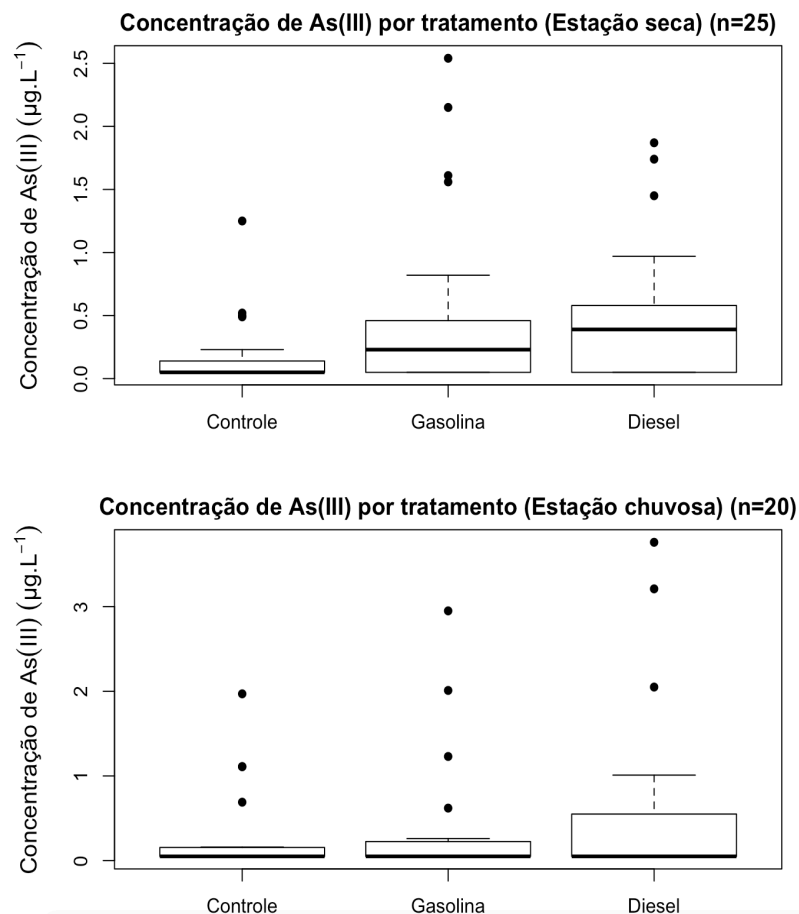
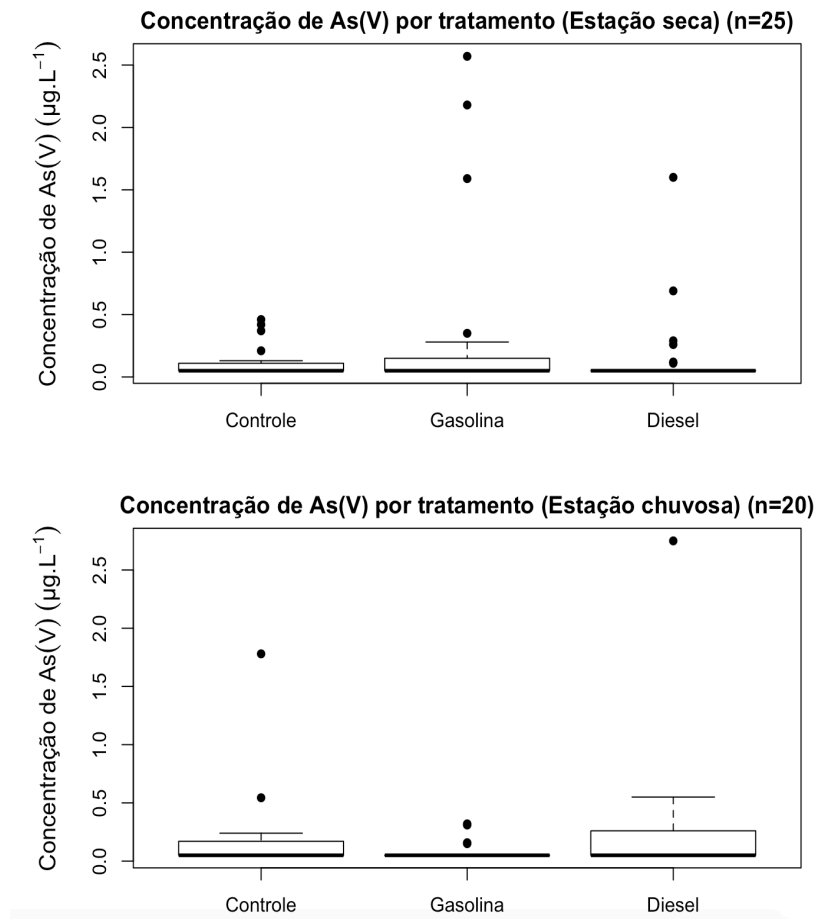


Figura 17. *Boxplot* com as medianas das concentrações de As(V) em função do tratamento e campanha.



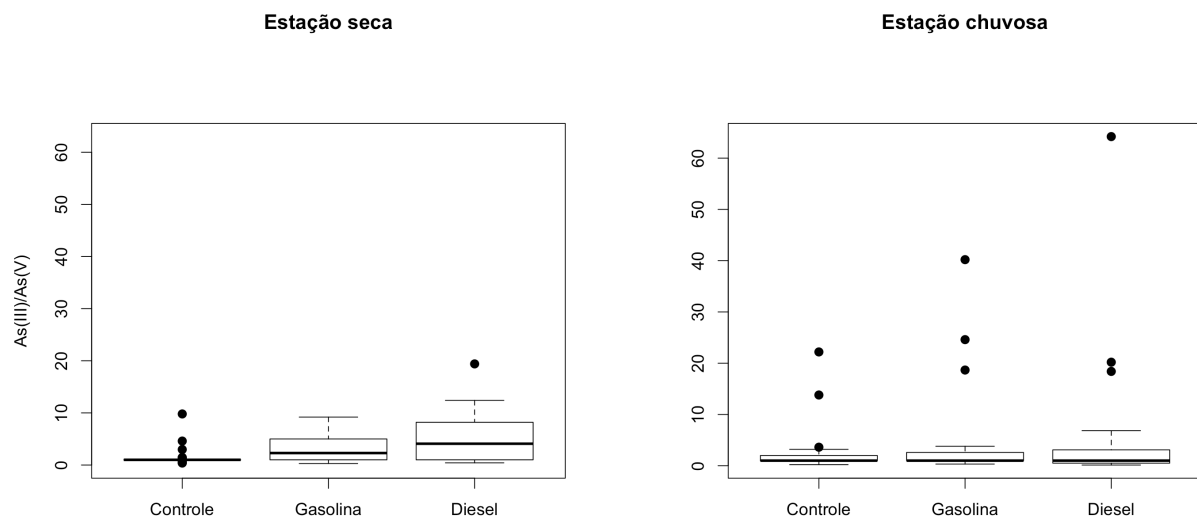
Fonte: Elaborado para este estudo.

Não houve diferença significativa para As(V) entre os tratamentos nas duas campanhas (seca: p-valor=0,4348; chuvosa: p-valor=0,4275) e para As(III) na estação chuvosa (p-valor=0,9601). Segundo o p-valor obtido (p=0,0094) para As(III) na estação seca, foi realizado o desdobramento das comparações por *Student-Newman-Keuls* dos dados e, a partir deste, infere-se que o grupo controle difere significativamente dos grupos de contaminantes, gasolina (p = 0,0081) e diesel (p = 0,0021). As concentrações dos grupos dos contaminantes não diferiram significativamente entre si (p = 0,7395). Desta forma, os dados sugerem que a introdução dos contaminantes orgânicos gasolina e diesel resultaram em um aumento na mobilidade das espécies inorgânicas de arsênio, impactando diretamente na concentração de As(III) extraível em água nas amostras, sendo que toda a faixa de hidrocarbonetos considerados neste estudo, do menor ao maior peso molecular, influenciaram nesta mobilização.

Comparando os tratamentos na estação seca, é possível observar que, para 60% dos solos estudados, as frações de As(III) previamente imobilizadas pela fase sólida (<LD no grupo controle) se tornaram solúveis após a adição de gasolina e diesel.

Apesar das faixas de concentrações das espécies inorgânicas de arsênio não apresentarem diferenças significativas entre as duas campanhas, na figura 18 é possível observar que, apesar da faixa de concentração entre campanhas ter sido similar, com acentuada variação entre as amostras, a redução do arsênio, expressa pela razão As(III)/As(V) não foi tão significativa na estação chuvosa (p-valor=0,5254) quanto na estação seca (p-valor=0,0132).

Figura 18. Variação da razão As(III)/As(V) (redução) em função da campanha de coleta das amostras.



Fonte: Elaborado para este estudo.

A avaliação dos estudos sobre os efeitos da adição carbono orgânico de diferentes origens sugerem que não apenas a quantidade, mas principalmente a natureza da fonte de carbono orgânico influencia na mobilidade do arsênio. Para compostos de biocarvão, tanto o aumento da mobilização (BEESLEY et al., 2013) quanto a imobilização (LI et al., 2018) foram relatados para o arsênio do solo. Aspecto da composição do biocarvão, o teor de lignina foi apontado como importante fator no destino do arsênio no solo (KIM et al., 2020). Além disso, a aromaticidade da matéria orgânica natural dissolvida tem sido apontada como responsável na liberação de arsênio na água intersticial (YAN et al., 2020). De acordo com Huesemann (1995), os compostos de hidrocarbonetos de petróleo com 10 a 22 carbonos são os menos

tóxicos e mais biodegradados, faixa que corresponde ao comprimento da cadeia de carbono dos compostos encontrados na gasolina (5-10) e no diesel (14-20). No presente estudo, não foi observada influência da diferença na composição das duas fontes de hidrocarbonetos do petróleo consideradas na mobilização das espécies de arsênio.

5.5 Concentração de arsênio extraível em função do uso do solo e origem do arsênio

As concentrações das espécies de arsênio (Estação seca) nas amostras foram avaliadas segundo o uso do solo na região (Figura 19 e 20).

Figura 19. Concentração de As(III) (estação seca) nos tratamentos em função do uso do solo: rural (n=13), cobertura vegetal (n=5) e urbano (n=7).

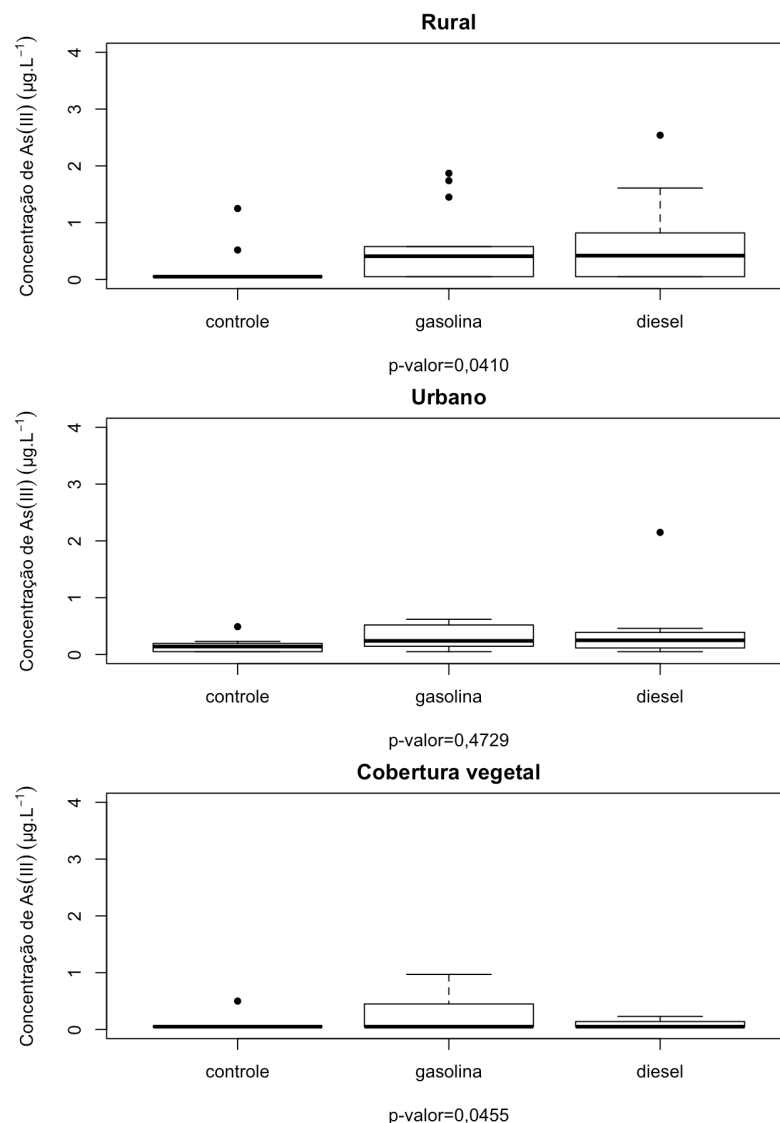
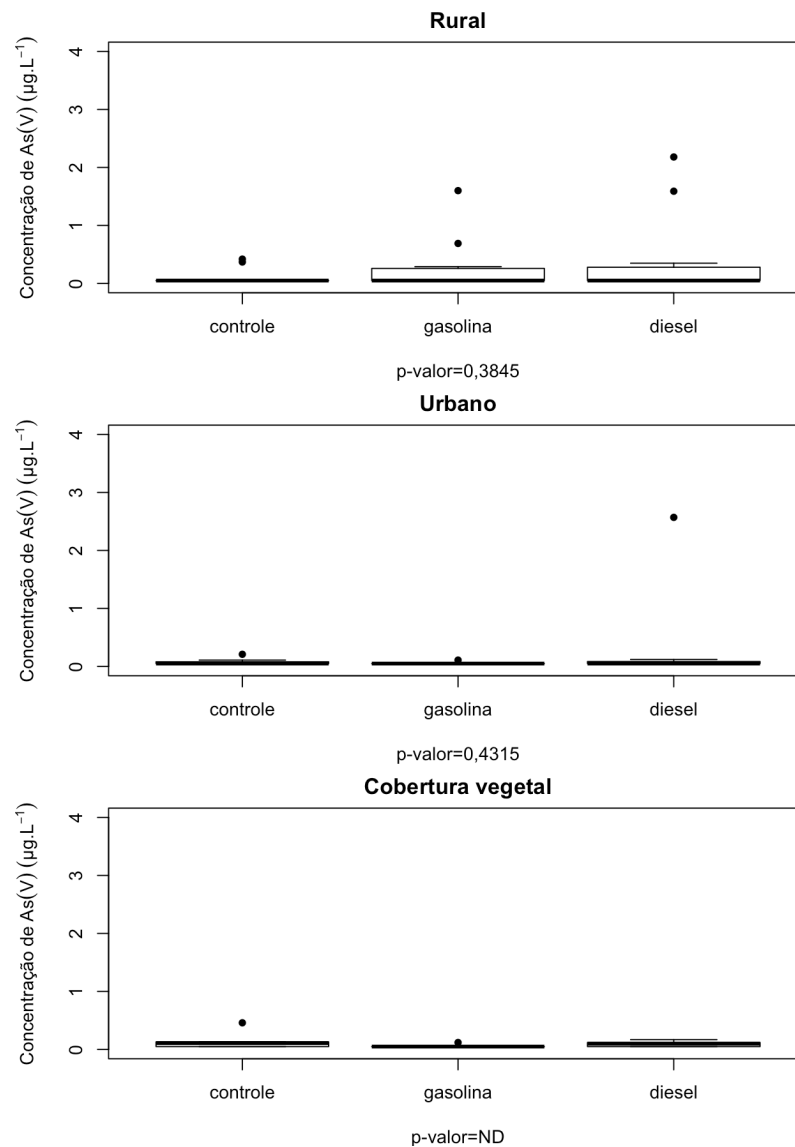


Figura 20. Concentração de As(V) (estação seca) nos tratamentos em função do uso do solo: rural (n=13), cobertura vegetal (n=5) e urbano (n=7).



Fonte: Elaborado para este estudo.

Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos para As(III) no uso rural (p-valor=0,0410) e natural (cobertura vegetal, p-valor=0,0455). Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos para As(V) em função do uso do solo. Como todas as concentrações de As(V) nos solos do uso cobertura vegetal estiveram abaixo do limite de detecção, não foi possível calcular o p-valor para esta categoria. Ressalta-se que não foi observada diferença significativa entre os tratamentos apenas nos solos urbanos. Este resultado possivelmente decorre de um empobrecimento dos solos urbanos em termos de nutrientes e de atividade

microbiológica, fazendo com que a biodegradação dos hidrocarbonetos adicionados não fosse tão expressiva.

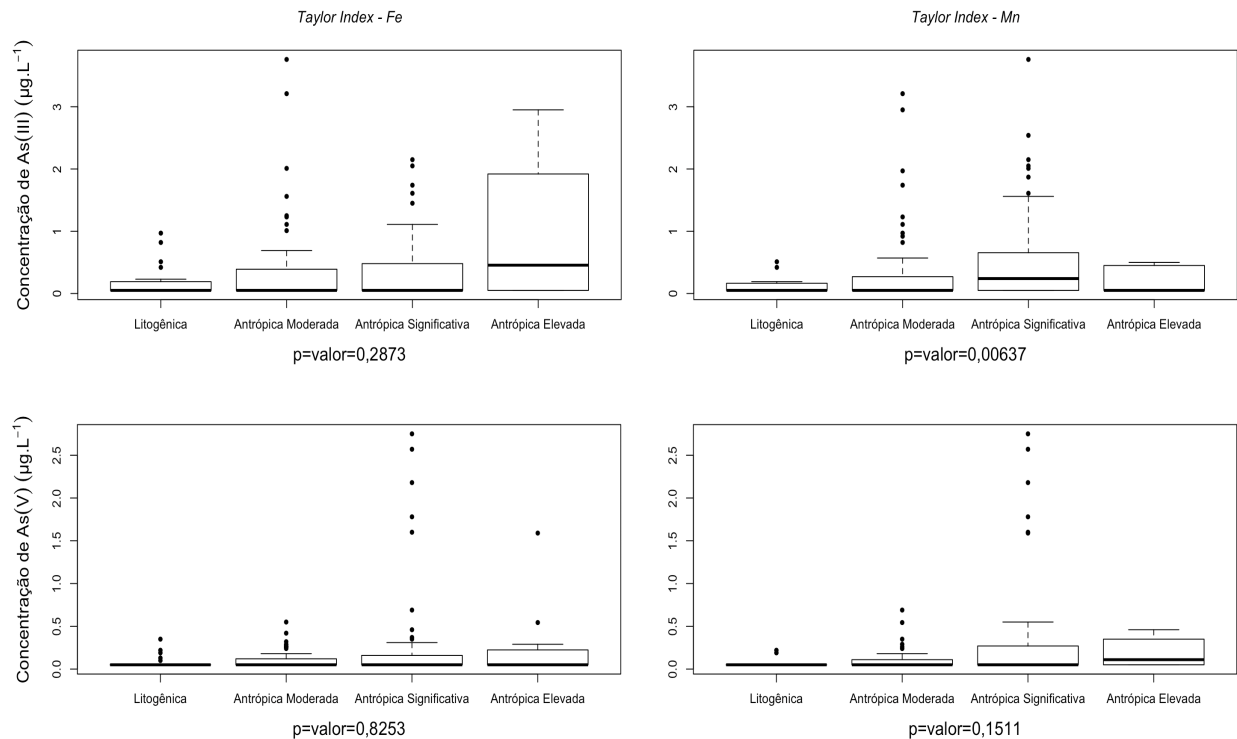
Ainda, solos urbanos estão mais propensos às fontes antrópicas de arsênio. Metais e semimetais de origem antrópica são reconhecidamente mais móveis e biodisponíveis que àqueles de origem litogênica (KAASALAINEN; YLI-HALLA, 2003; WUANA; OKIEIMEN, 2011). Após a introdução de um metal no solo, o primeiro processo a ocorrer será a adsorção, que poderá levar de dias até anos para completar-se. Após adsorvidos e sofrerem processos de precipitação, dissolução, sorção, complexação, oxidação e redução, os elementos terão sido redistribuídos em diferentes formas químicas, que apresentam biodisponibilidade, mobilidade e toxicidade diversas. Apenas uma pequena fração destes elementos estará biodisponível (WEISSMANNOVÁ; PAVLOVSKÝ, 2017). Solos com baixa poluição ou solos florestais têm sido reportados como apresentando alta estabilidade geoquímica de arsênio, sendo que arsênio de origem natural liga-se a formas altamente cristalizadas de óxidos de ferro, alumínio e manganês (DOUŠOVÁ et al., 2008). Por sua vez, arsênio de origem antropogênica, introduzido através da superfície, principalmente na forma de As(V), é pouco móvel, sendo adsorvido à matéria orgânica do solo ou óxidos e hidróxidos de ferro logo nos horizontes superficiais (BARRINGER et al., 1998, página 41). Assim, é possível que diferença significativa entre os tratamentos não tenha sido observada apenas para solos urbanos, por estes solos apresentarem concentrações elevadas de As(III) mesmo em solos não contaminados com gasolina ou diesel.

Adicionalmente, os solos rurais apresentaram as maiores faixas de concentração de arsênio após a adição de gasolina (<100 a 1870 ng L⁻¹) e diesel (<100 a 540 ng L⁻¹), em comparação com os solos com cobertura natural (gasolina: <100 a 541 ng L⁻¹, diesel: <100 a 457 ng L⁻¹) e urbana (gasolina: <100 a 970 ng L⁻¹, diesel: <100 a 250 ng L⁻¹). Os dados sugerem que a alta atividade metabólica do solo, característica de solo em áreas de cultivo, contribui para aumentar a mobilização do arsênio. Ressalta-se que a influência de agroquímicos pode contribuir direta ou indiretamente para o aumento da mobilização do arsênio, por meio de modificação na comunidade microbiana, competição por sítios de ligação no solo ou influencia em parâmetros físico-químicos do solo, sendo que estudos aprofundados em relação aos mecanismos influenciadores em solos rurais ainda são necessários.

Desta forma, a influência da origem do arsênio na mobilidade das espécies

As(III) e As(V) foi investigada (Figura 21), utilizando como critério para classificar a origem do arsênio o fator de enriquecimento geoquímico. Os elementos de referência utilizados foram Fe e Mn, conforme descrito anteriormente.

Figura 21. Concentração das espécies inorgânicas de arsênio em função da origem do arsênio obtida a partir do fator de enriquecimento do arsênio, utilizando Fe e Mn como elementos de referência.



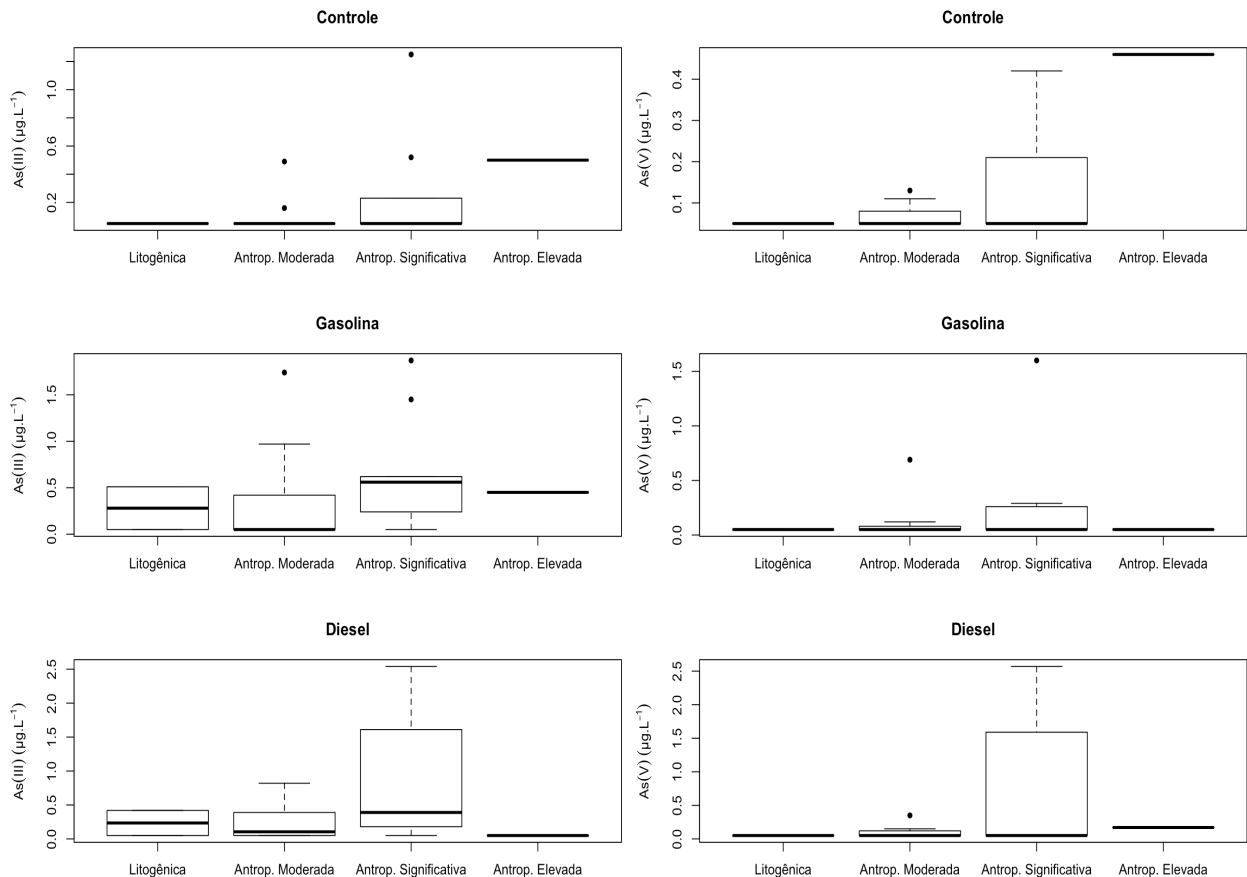
Fonte: Elaborado para este estudo.

Foi encontrada diferença significativa (p -valor=0,006) para As(III) utilizando Mn como fator de referência. A partir dos resultados apresentados nos *boxplots*, observa-se que a contaminação antrópica significativa apresentou a mediana mais elevada para o As(III), o que poderia indicar que o arsênio proveniente de fontes antrópicas possa ser o mais facilmente reduzido. Ressalta-se que os solos encontrados na Faixa do Piririca, uma anomalia natural de arsênio (P19 a P21), encontram-se como contaminação antrópica significativa quando Mn é utilizado como elemento de referência. No entanto, o local em que estes solos foram coletados, neste estudo, também caracterizavam-se por expressiva atividade agrícola. Os solos classificados dentro da contaminação antrópica significativa ($n=10$) apresentam baixo conteúdo de carbono orgânico (COT <8%), sendo dois caracterizados por predominância de cobertura vegetal (P11 e P15), dois solos urbanos (P2 e P25) e seis rurais (P12, P18-P21, P23).

Tendo em vista que a diferença significativa segundo o teste estatístico *Kruskal*

Wallis foi observada apenas para o elemento de referência Mn, este elemento também foi utilizado para avaliar a influência dos tratamentos na concentração das espécies inorgânicas de arsênio em função da origem (Figura 22).

Figura 22. Concentração das espécies inorgânicas de arsênio em função da origem do arsênio (litogênica, antrópica moderada, antrópica significativa e antrópica elevada) e dos tratamentos (controle, gasolina e diesel).



Fonte: Elaborado para este estudo.

Não foi observada diferença significativa entre os níveis de contaminação em função dos tratamentos (p -valor= 0,06 a 0,77). No entanto, a partir dos gráficos, observa-se que, no tratamento controle, as medianas das classes litogênica ($n=2$), antrópica moderada ($n=12$) e antrópica significativa ($n=10$) encontram-se muito próximas ao limite de detecção das espécies de arsênio. No entanto, na classe antrópica significativa no tratamento controle, observa-se que 50% das amostras, assim como a amostra da categoria antrópica elevada, encontram-se acima do limite de detecção para ambas espécies. A mesma tendência não foi observada para o As(III) nos tratamentos gasolina e diesel. Isto pode indicar que a menor estabilidade de arsênio de origem antrópica, especialmente a fração proveniente de contaminação recente, pode ser um fator importante para o aumento da mobilidade do arsênio nas

amostras do grupo controle, mas que, quando os contaminantes gasolina e diesel são adicionados, frações mais estáveis na estrutura mineral do solo podem passar a ser mobilizadas.

5.6 Fracionamento do arsênio extraível (DGT)

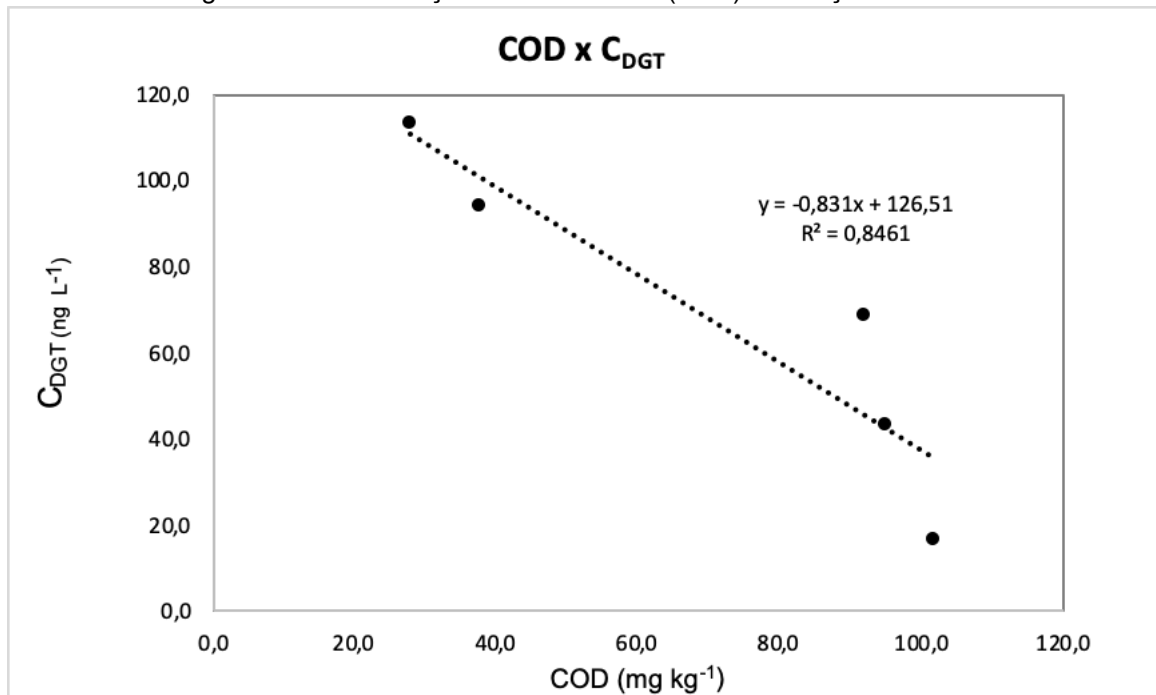
Na tabela 10, observa-se as concentrações das espécies inorgânicas de arsênio extraível em água e as concentrações de arsênio lábil obtidas a partir da técnica DGT (WILLIAMS et al., 2011) antes das contaminações das amostras com gasolina e diesel, em cinco amostras de solo. Estas amostras foram selecionadas visando-se obter representatividade de uma ampla faixa de concentração de arsênio no solo (teor pseudo-total) e de COD.

Tabela 10. Comparação das concentrações das espécies e frações de As (média \pm desvio padrão, n=3) e COD (média \pm desvio padrão, n=2)

Amostra	As Total, mg kg ⁻¹	As(III), ng L ⁻¹	As(V), ng L ⁻¹	As total, ng L ⁻¹	C _{DGT} , ng L ⁻¹	COD mg kg ⁻¹
P1	7,275 \pm 0,35	<LD	<LD	<LD	16 \pm 5	102 \pm 36,8
P8	4 \pm 2	<LD	<LD	<LD	94 \pm 23	38,5 \pm 14,7
P12	13,5 \pm 0,09	<LD	<LD	<LD	68 \pm 7	91,9 \pm 17,4
P16	3,39 \pm 0,48	<LD	181 \pm 7	181 \pm 7	113 \pm 35	28,1 \pm 15,9
P20	24 \pm 2	<LD	<LD	<LD	43 \pm 4	94,8 \pm 5,5

A quantificação do As acima dos limites de detecção (As(III): 70 ng L⁻¹; As(V):100 ng L⁻¹) foi possível apenas para a amostra P16. Nesta amostra, observa-se que as concentrações de arsênio nas duas técnicas foram semelhantes, porém menor para a técnica DGT (62%), sugerindo que apenas parte da concentração do arsênio extraído encontra-se na forma lábil.

Tendo em vista que a concentração de arsênio extraível em água foi repartida entre as duas espécies presentes, sendo a concentração de arsênio dissolvido total calculada pela somatória das duas espécies, a quantificação do arsênio dentro dos limites de detecção disponíveis não foi possível para as demais amostras. Desta forma, a técnica DGT em comparação com a concentração de arsênio extraível em água teve importante desempenho na obtenção da fração lábil do arsênio nos solos controle. A partir desta técnica, foi possível realizar a comparação da concentração lábil de arsênio e do COD do solo, conforme observado na figura 23.

Figura 23. Concentração lábil de arsênio (C_{DGT}) em função do COD.

Fonte: Elaborado para este estudo.

A concentração lábil de arsênio obtida por meio da técnica DGT apresentou correlação linear negativa ($R^2=0,8461$) com o teor de COD nas amostras, sugerindo que o COD do solo é um importante mecanismo de controle da concentração lábil de arsênio na água intersticial do solo. Os resultados obtidos corroboram dados reportados anteriormente (WILLIAMS et al., 2011). Em seu estudo, Williams et al. (2011) avaliaram a influência de complexos formados com a matéria orgânica na labilidade e biodisponibilidade de arsênio em solos alagados de plantações de arroz em Bangladesh. Os autores reportaram uma correlação linear negativa ($R^2=0,60$) entre a recuperação das espécies inorgânicas de arsênio (Σ das espécies de arsênio/arsênio total) e o COD. Ainda, por meio de uma regressão linear para prever a concentração de arsênio absorvida por grãos de arroz, foi observada uma relação negativa entre C_{DGT} e COD. Estes resultados foram atribuídos à formação de complexos As-COD e/ou As-Fe/Al-COD.

Na tabela 11, estão apresentadas as concentrações das espécies de arsênio extraíveis em água e a fração lábil obtida a partir da técnica DGT.

Tabela 11. Comparação das concentrações das espécies e frações de As (média \pm desvio padrão, n=3) nos tratamentos

Amostra	Tratamento	As(III), ng L ⁻¹	As(V), ng L ⁻¹	As dissolvido total ^a , ng L ⁻¹	C _{DGT} , ng L ⁻¹
P8	Controle	<LD	<LD	<LD	94 \pm 23
	Gasolina	<LD	<LD	<LD	75 \pm 9
	Diesel	1405 \pm 827	<LD	1405 \pm 827	65 \pm 11
P12	Controle	<LD	<LD	<LD	68 \pm 7
	Gasolina	1872 \pm 1	290 \pm 38	2162	70 \pm 5
	Diesel	1780 \pm 11	539 \pm 89	2319	67 \pm 8
P16	Controle	<LD	181 \pm 7	181 \pm 7	113 \pm 35
	Gasolina	414 \pm 130	180 \pm 10	594	127 \pm 25
	Diesel	<LD	<LD	<LD	112 \pm 38

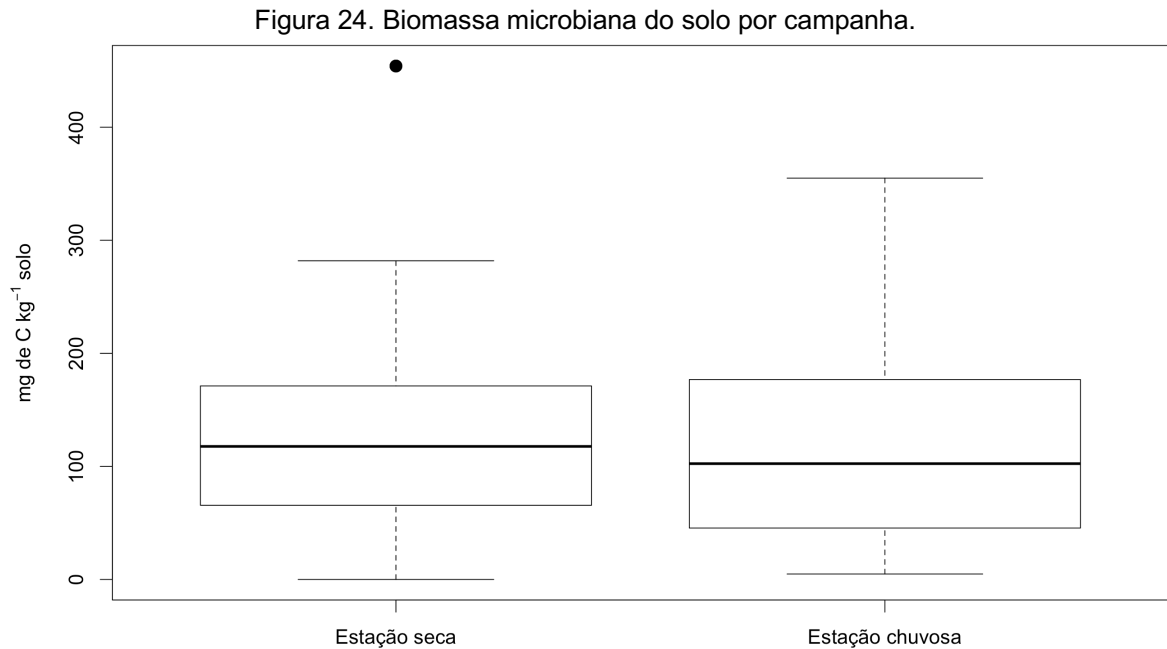
^a Calculado pela soma das concentrações de As(III) e As(V) nos extratos de saturação das amostras.

A partir dos resultados, observa-se que, apesar da concentração das espécies de arsênio ter sido significativamente maior nos tratamentos gasolina e diesel, a comparação entre as concentrações lábeis (C_{DGT}) não foi significativamente diferente entre os tratamentos (p-valor= 0,2019; 0,5611; 0,7326, para as amostras P8, P12 e P16, respectivamente). Este resultado sugere que o aumento da mobilidade do arsênio após a introdução dos contaminantes orgânicos, neste estudo, inclui majoritariamente espécies inertes e ligadas a colóides (DIVIŠ et al., 2005), não influenciando nas concentrações lábeis do elemento e, portanto, de maior interesse quando tem-se como enfoque a fração biodisponível. As frações lábeis de arsênio permaneceram controladas pelo teor de COD, naturalmente presente no solo.

Tendo em vista que não foi observada diferença na C_{DGT} entre os três tratamentos, a influência da adição dos contaminantes na dinâmica de reposição do arsênio nas amostras de solo, a partir da comparação dos valores obtidos na C_{DGT} e a fração trocável do arsênio por meio do modelo DIFS, não foi investigada.

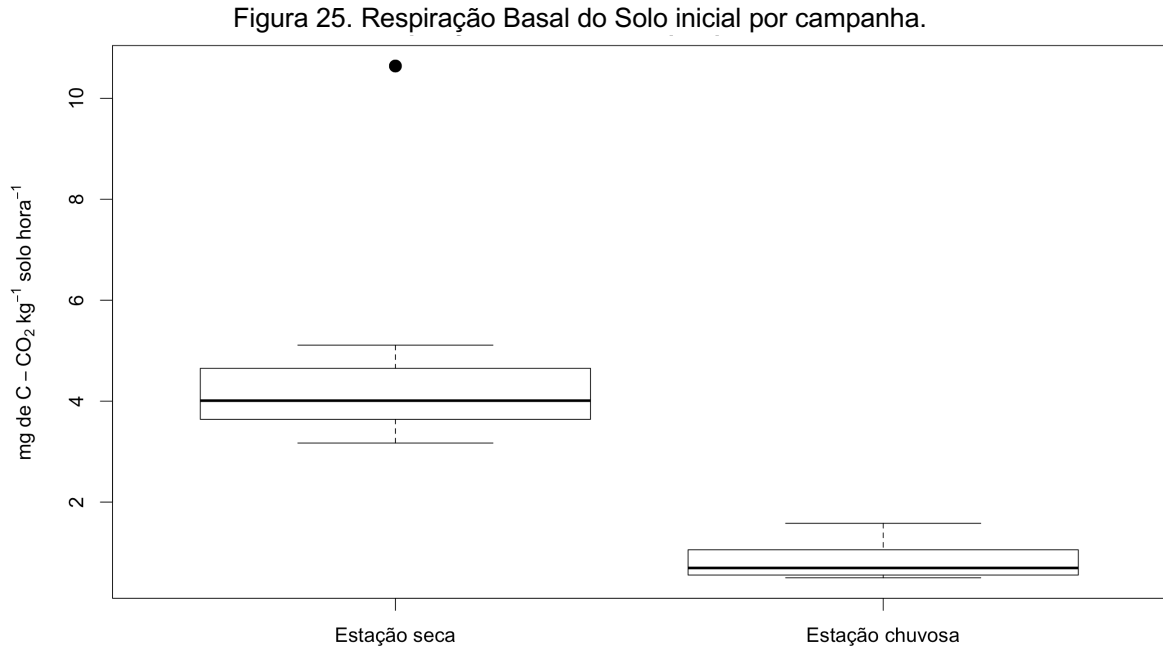
5.7 Influência da microbiota do solo

Considerando-se os efeitos que as variações sazonais podem apresentar na microbiota do solo, foi avaliada a variação da biomassa microbiana do solo nas duas estações. Não foi encontrada diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p=0,811$) entre as campanhas de coletas (Figura 24).



Fonte: Elaborado para este estudo.

Apesar do tamanho da biomassa não ter diferido entre as campanhas, quando considerada a Respiração Basal do Solo inicial (Figura 25), que reflete de maneira mais precisa o estado fisiológico dos micro-organismos do solo, a estação chuvosa apresentou valores significativamente mais baixos ($p\text{-valor}= 2 \times 10^{-16}$).



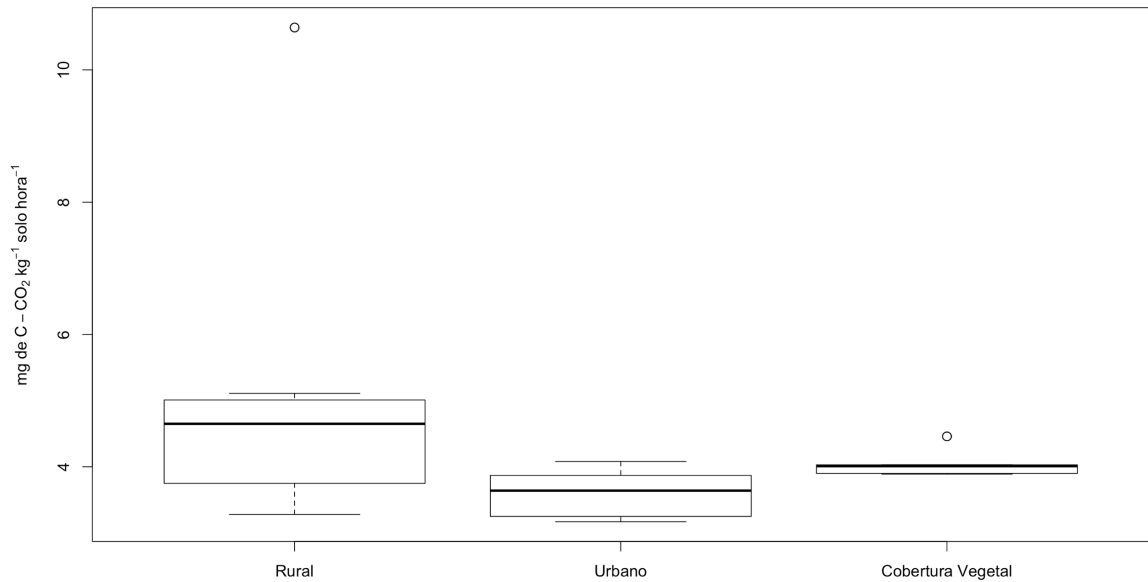
Fonte: Elaborado para este estudo.

Visto que os valores obtidos para a campanha chuvosa referentes ao COD e ao COT indicam que a degradação da matéria orgânica estava ocorrendo em um ritmo elevado, condizente com as condições de clima para a campanha, as populações de micro-organismos do solo possivelmente sofreram uma drástica redução após a coleta das amostras. Com a mudança na comunidade microbiológica entre as estações, é possível que populações mais exigentes na estação chuvosa tenham sido mais sensíveis às mudanças das condições ambientais, apesar dos cuidados no transporte e armazenamento.

Tendo em vista que tanto a RBS quanto a redução do As(V) tiveram diminuição significativa na campanha chuvosa, quando comparada com a seca e que a concentração de As(III) variou em função do uso do solo, foi avaliado a influência do uso do solo na RBS para as coletas da estação seca (Figura 26) e da estação chuvosa (Figura 27).

Foi observada diferença significativa ($p\text{-valor}=1,5 \times 10^{-15}$) entre a RBS nos três usos do solo para coleta da estação seca, sendo, assim como observado para as concentrações de As(III), inferior para os solos urbanos. Este resultado corrobora resultados reportados em estudos anteriores em que os micro-organismos são os principais responsáveis pela redução e consequente mobilização do arsênio (COZZARELLI et al., 2016; CHEN et al., 2020; XUE et al., 2020).

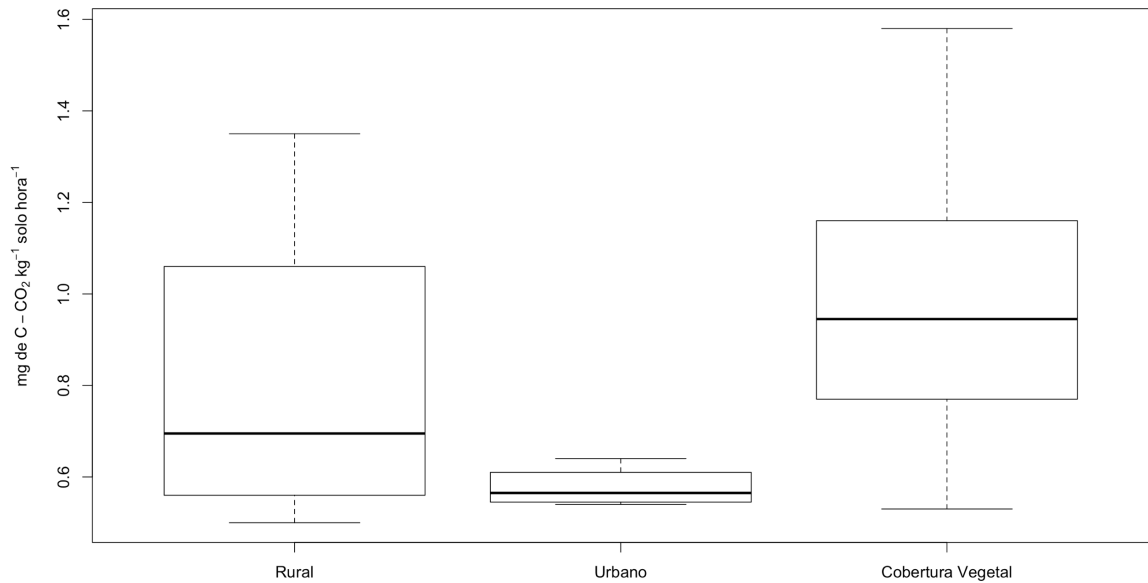
Figura 26. Respiração basal do solo em função do uso do solo (Estação seca).



Fonte: Elaborado para este estudo.

A RBS nos três usos do solo para a estação chuvosa foi significativamente diferente (p -valor= $2,5 \times 10^{-3}$) e inferior para os solos urbanos (Figura 27).

Figura 27. Respiração basal do solo em função do uso do solo (Estação chuvosa).

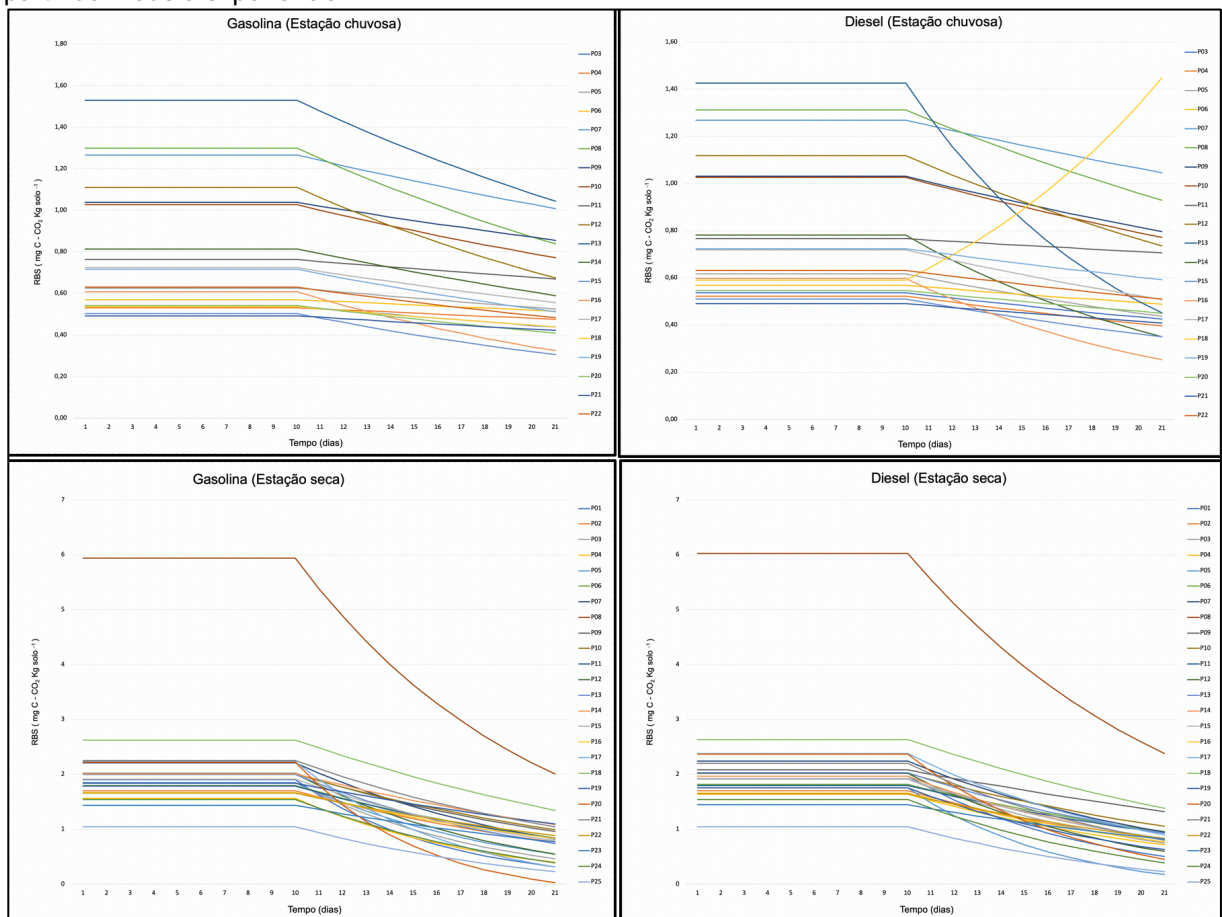


Fonte: Elaborado para este estudo.

A evolução das incubações dos três tratamentos foi monitorada através da variação do pH e da RBS após a incubação, não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos para nem um dos parâmetros (pH: p -valor= $0,8354$; RBSf: p -valor= $0,8022$). A figura 28 apresenta a dinâmica da degradação dos contaminantes gasolina e diesel, estimados a partir do modelo exponencial, para as duas campanhas. Nos dois tratamentos e campanhas, a RBS apresentou um

decréscimo após os 21 dias de incubação o que, a partir do modelo de dinâmica adotado, assumiu-se que foi gradual, visto que o modelo assume que a taxa de biodegradação é proporcional a quantidade de matéria orgânica biodisponível, diminuindo com o decaimento desta. Padrão similar foi encontrado para solos de florestas em clima tropical durante a degradação da matéria orgânica do solo (ZHOU et al., 2017).

Figura 28. Dinâmica da degradação dos contaminantes gasolina e diesel por campanha, estimados a partir do modelo exponencial.



Fonte: Elaborado para este estudo.

A partir dos modelos descritos acima, a EB média para os tratamentos foi calculada, sendo estimada em $7,01\% \pm 3,06$ para gasolina e $7,35\% \pm 3,28$ para diesel, na estação seca. A EB teve uma redução expressiva na estação chuvosa quando comparada com a estação seca, sendo $3,71\% \pm 1,37$ para gasolina e $3,68\% \pm 1,28$ para diesel. Com adição de inóculo de micro-organismos resistentes a contaminação por gasolina e umidificação do solo a cada 12 dias, Bahmani et al. (2018) obtiveram uma biodegradação de 30% da gasolina em 90 dias. Trindade et al. (2005)

observaram uma eficiência de biodegradação para solos recentemente contaminados de aproximadamente 1% para 41 dias de incubação, sem adição de micro-organismos ou nutrientes. No entanto, as autoras pontuam que a elevada concentração de hidrocarbonetos do petróleo adicionadas as amostras (6,8%), pode ter comprometido o crescimento e poder de biodegradação dos micro-organismos do solo. Visto que a eficiência de biodegradação é diferente para cada um dos compostos presentes na gasolina e diesel, em um período de 72 horas e em diversos tratamentos diferentes (com e sem inóculo de micro-organismos ou adição de nutrientes), Cunha e Ferreira Leite (2000) encontraram uma eficiência de biodegradação de até 50% para tolueno, etilbenzeno e hidrocarbonetos alifáticos de até 13 carbonos.

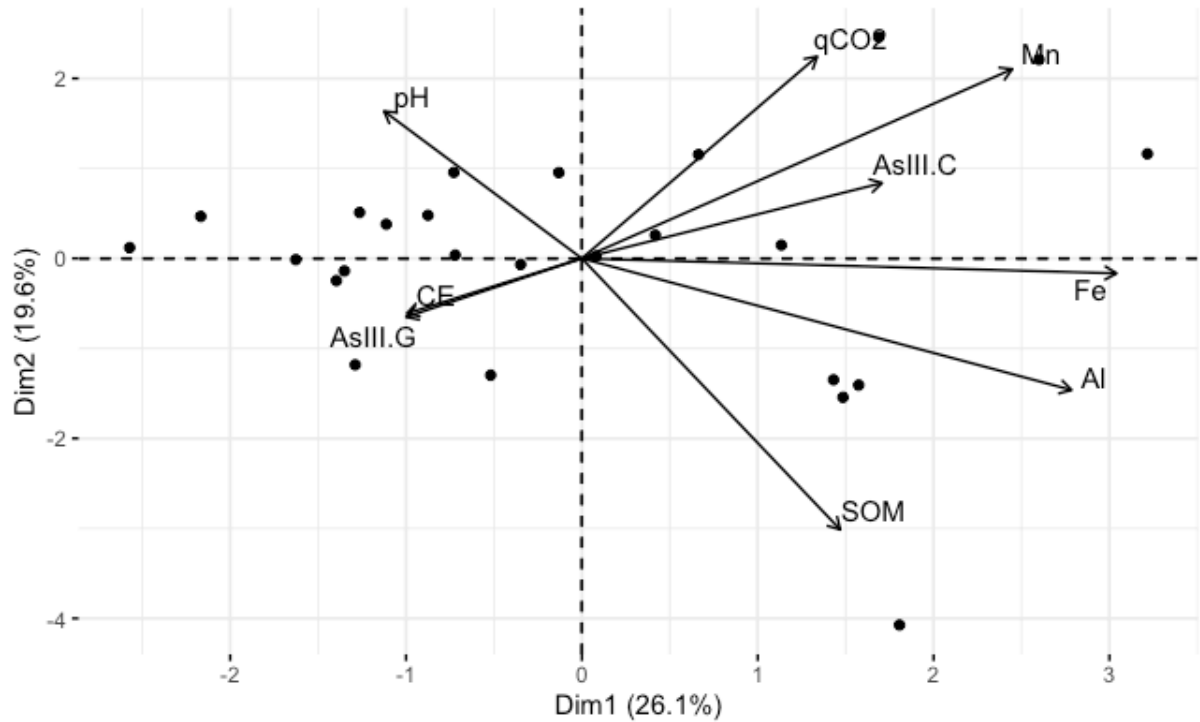
Apesar de uma estimativa, a EB calculada encontra-se dentro de uma faixa de EFB esperada para o período de tempo estudado e fornece uma dimensão da EFB em que a mobilização de arsênio pode ocorrer. O declínio nas taxas de respiração do solo após 21 dias de incubação apesar de apenas uma pequena fração total dos contaminantes orgânicos adicionados terem sido biodegradados, sugere que uma parte expressiva dos contaminantes foi retido pela matéria orgânica do solo ou fração mineral, não estando biodisponível.

5.8 Análise multivariada (PCA)

Para avaliar interações entre múltiplas variáveis, as amostras também foram analisadas por meio de análise multivariada de dados, conforme observado nos gráficos de PCA nas figuras 29, 30, 31 e 32.

Na figura 29, observa-se que a condutividade elétrica é o principal parâmetro positivamente relacionado a concentração de As(III) extraível em água no tratamento gasolina, sendo teor pseudo-total de Mn e coeficiente metabólico do solo os parâmetros negativamente relacionados à concentração de As(III) extraível em água no tratamento gasolina e positivamente relacionados à concentração de As(III) extraível em água no tratamento controle.

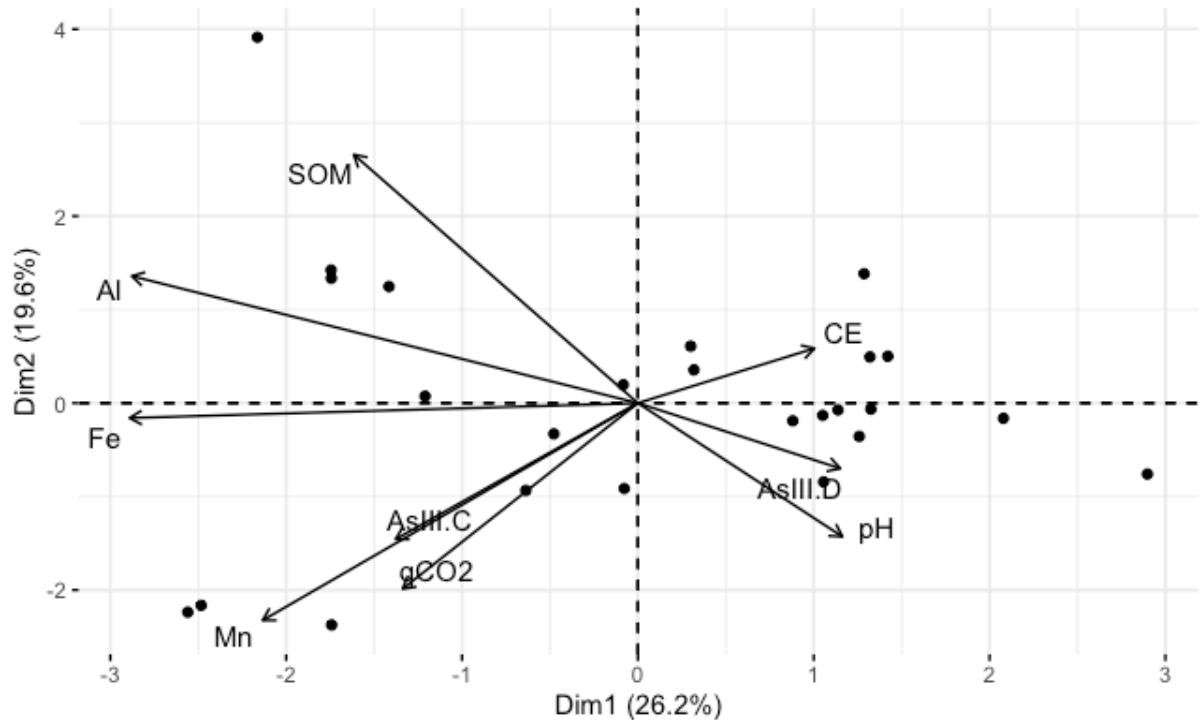
Figura 29. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(III) no tratamento gasolina (Estação seca). Parâmetros da PCA: AsIII.C: concentração de As(III) no tratamento Controle; AsIII.G: concentração de As(III) no tratamento Gasolina; SOM: matéria orgânica do solo; qCO₂: coeficiente metabólico do solo; CE: condutividade elétrica na solução do solo.



Fonte: Elaborado para este estudo.

No tratamento diesel, o pH é um importante parâmetro positivamente relacionados a concentração de As(III) extraível em água (Figura 30).

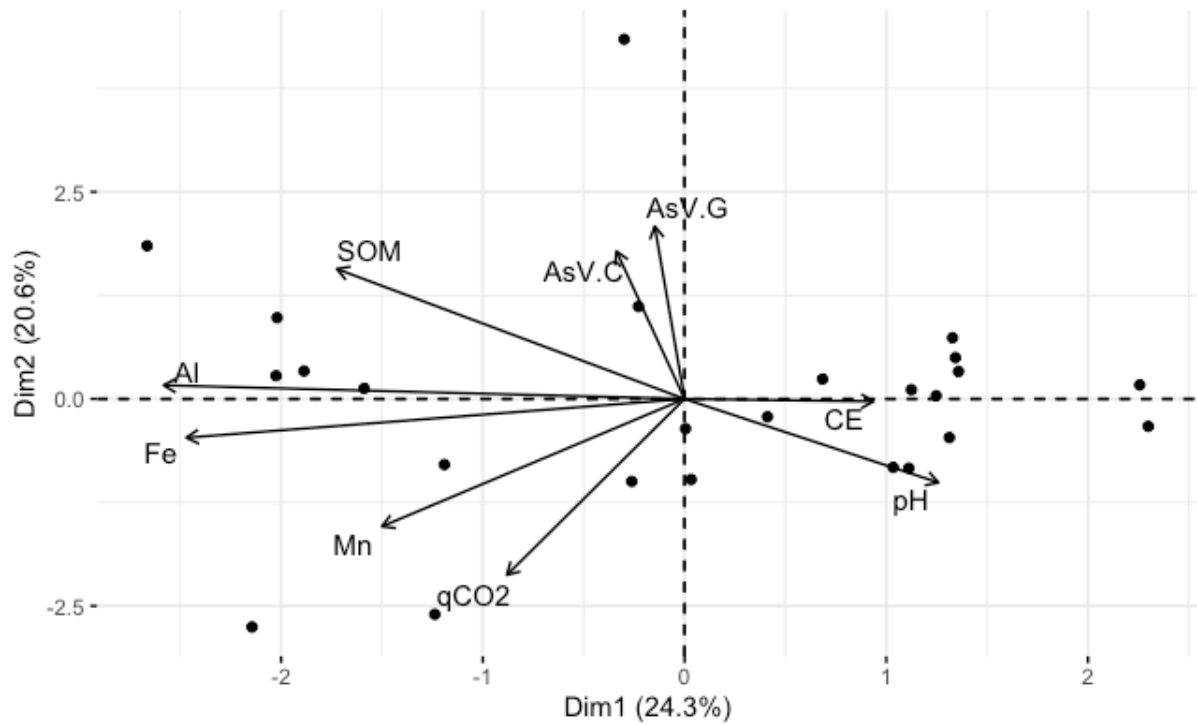
Figura 30. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(III) no tratamento diesel (Estação seca). Parâmetros da PCA: AsIII.C: concentração de As(III) no tratamento Controle; AsIII.D: concentração de As(III) no tratamento Diesel; SOM: matéria orgânica do solo; qCO₂: coeficiente metabólico do solo; CE: condutividade elétrica na solução do solo.



Fonte: Elaborado para este estudo.

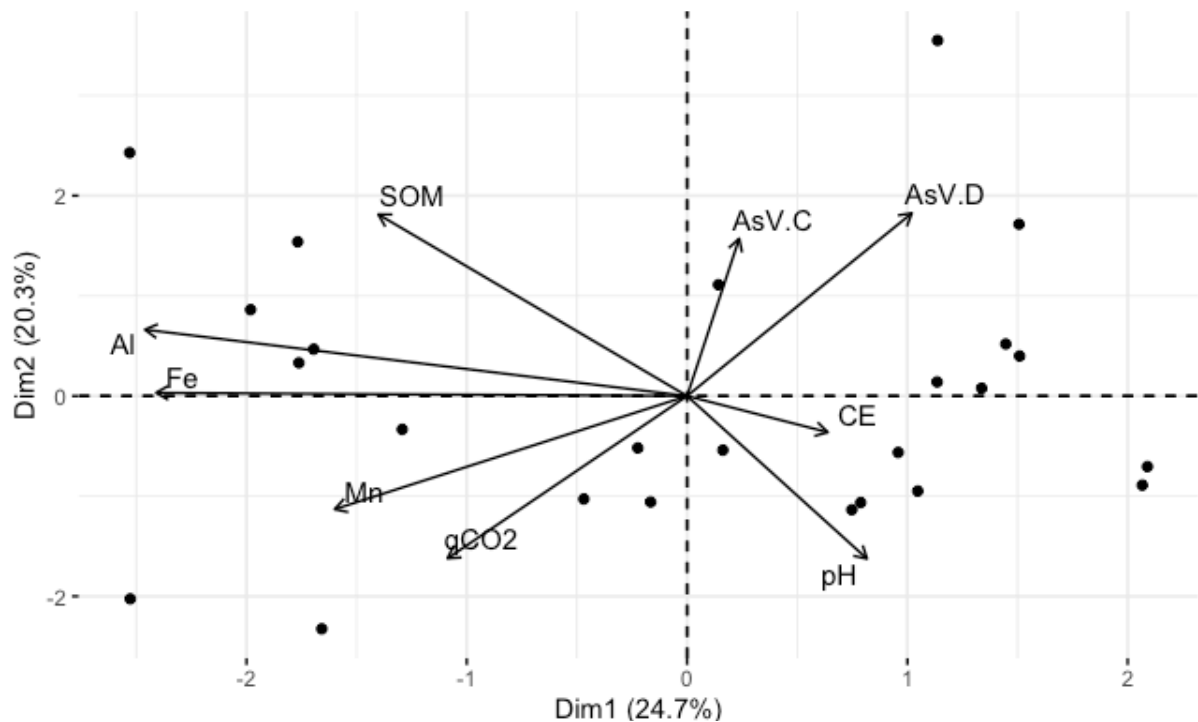
Na figura 31 e 32, observa-se que as concentrações de As(V) nos tratamentos controle e gasolina, e controle e diesel, respectivamente, estão positivamente relacionadas, não sendo evidente a relação destas concentrações com nenhum outro parâmetro do solo estudado.

Figura 31. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(V) no tratamento gasolina (Estação seca). Parâmetros da PCA: AsV.C: concentração de As(V) no tratamento Controle; AsV.G: concentração de As(V) no tratamento Gasolina; SOM: matéria orgânica do do solo; qCO₂: coeficiente metabólico do solo; CE: condutividade elétrica na solução do solo.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Figura 32. Análise dos Componentes Principais para a concentração de As(V) no tratamento diesel (Estação seca). Parâmetros da PCA: AsV.C: concentração de As(V) no tratamento Controle; AsV.D: oncentração de As(V) no tratamento Diesel; SOM: matéria orgânica do solo; qCO₂: coeficiente metabólico do solo; CE: condutividade elétrica na solução do solo.



Os PCAs foram capazes de explicar de 44,9 a 45,7% da variação das amostras. No entanto, os PCAs corroboram os resultados obtidos a partir da Estatística Clássica (Teste *Kruskal-Wallis*), sendo que é possível observar que não houve separação entre os tratamentos gasolina e controle e entre os tratamentos controle e diesel para As(V). No entanto, essa diferença é acentuada para As(III). Para o tratamento gasolina (Figura 28), a relação positiva entre a condutividade elétrica e a concentração de As(III) em solução pode indicar que competição com outros íons (e.g. metais, SO_4^{2-} , PO_4^{-2} , Cl^-) pode estar contribuindo para a mobilização do arsênio da fase sólida. Relação similar foi reportada anteriormente na literatura, sendo que Anawar et al (2001) observaram uma correlação linear significativa ($R^2=0,85$) entre a concentração de arsênio e a condutividade elétrica em aquíferos não confinados em uma área contaminada em Bangladesh.

Por sua vez, o teor semi-total de Mn e atividade metabólica microbiana aparecem negativamente correlacionado com a concentração de As(III) em solução nos solos contaminados com gasolina, mas positivamente relacionados a

concentração de As(III) em solução nos solos controle. Uma vez que o Mn é um componente importante na fase mineral do solo como óxidos e hidróxidos, poderia se esperar uma relação negativa deste elemento com a concentração de arsênio lábil. No entanto, o mesmo deveria ocorrer para Al e Fe, sendo que ambos elementos não apresentaram uma relação negativa expressiva. Ainda, se os óxidos de Mn estivessem sendo um mecanismo de retenção do arsênio, este deveria ocorrer igualmente para o As(III) no tratamento controle. No entanto, observa-se uma relação positiva entre o As(III) no tratamento controle e o Mn. Segundo Scott e Morgan (1995), óxidos de Mn pouco cristalizados podem aumentar a taxa de oxidação de As(III), sendo a meia-vida desta espécie reduzida para 10 a 20 minutos. Sendo uma razão entre a respiração do solo e o tamanho da comunidade microbiana (BMS), a atividade metabólica do solo indica em que nível de estresse a comunidade microbiana se encontra, visto que, quanto mais alto, mais a degradação de matéria orgânica está sendo realizada por um número limitado de indivíduos. Na ausência de micro-organismos ou em solos em que a comunidade microbiana encontra-se em condições de estresse, a oxidação em fase sólida por óxidos de Mn pode ser uma importante forma de oxidação abiótica do As(III) (BOWELL et al., 2014). Desta forma, o As(III) que é reduzido pelo metabolismo dos micro-organismos no tratamento gasolina, pode estar sendo reoxidado em solos com alto teor de Mn, em solos que apresentaram estresse metabólico.

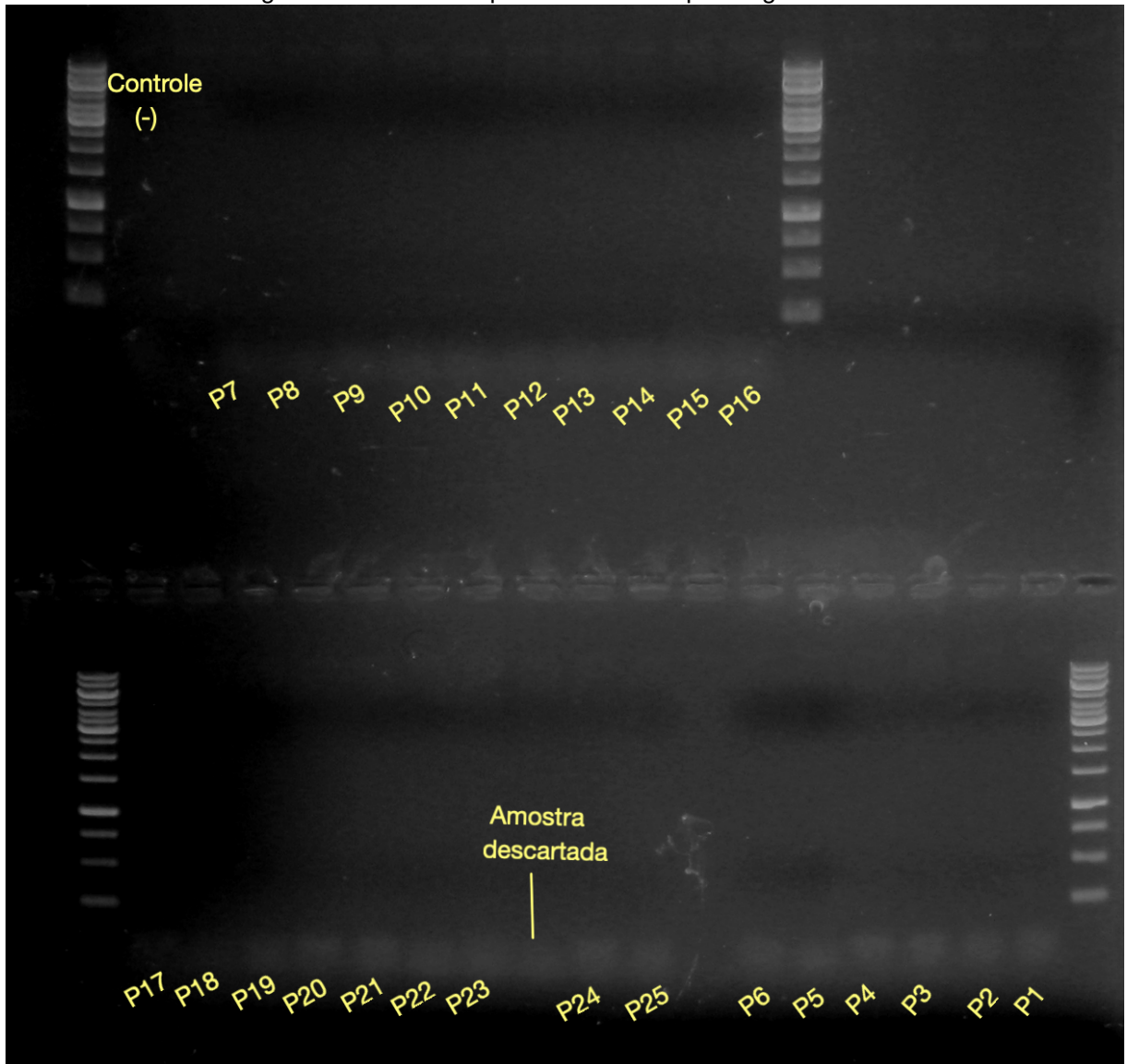
Para o tratamento diesel (Figura 29), observa-se que o pH apresenta uma relação positiva com a concentração de As(III). Os teores pseudo-totais de Fe e Al apresentaram um papel expressivo, possivelmente por que o Mn e a atividade metabólica não apresentaram relação com a concentração de As(III) neste tratamento.

Não foi observada relação entre as concentrações de As(V) e demais variáveis para o tratamento gasolina. Relação negativa entre Mn e atividade metabólica do solo foi observada para As(V) no tratamento diesel.

5.9 Expressão de genes funcionais

As figuras abaixo mostram géis de eletroforese com os produtos do PCR realizado com os *primers* funcionais específicos para a amplificação do gene *ArsB* (Figura 33) e *acr3.1* (Figura 34), ambos associados à resistência ao arsênio, comum em microbiotas de ambientes com altas concentrações deste elemento.

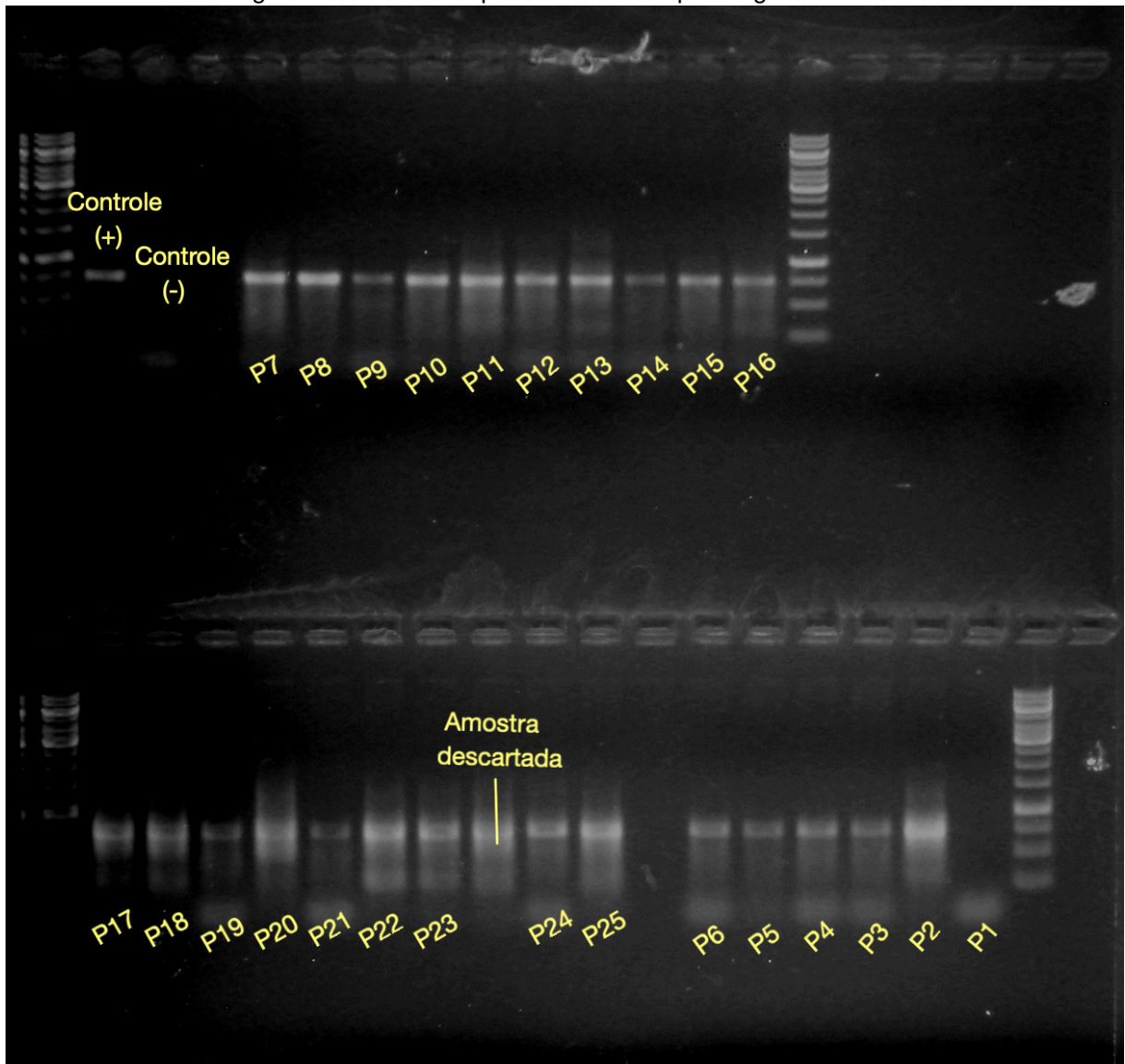
Figura 33. Gel com os produtos de PCR para o gene ArsB.



Fonte: Elaborado para este estudo.

De acordo com as imagens dos géis, nenhuma banda foi encontrada para o gene ArsB enquanto o gene *acr3.1* foi encontrado e amplificado em 24 das 25 amostras analisadas.

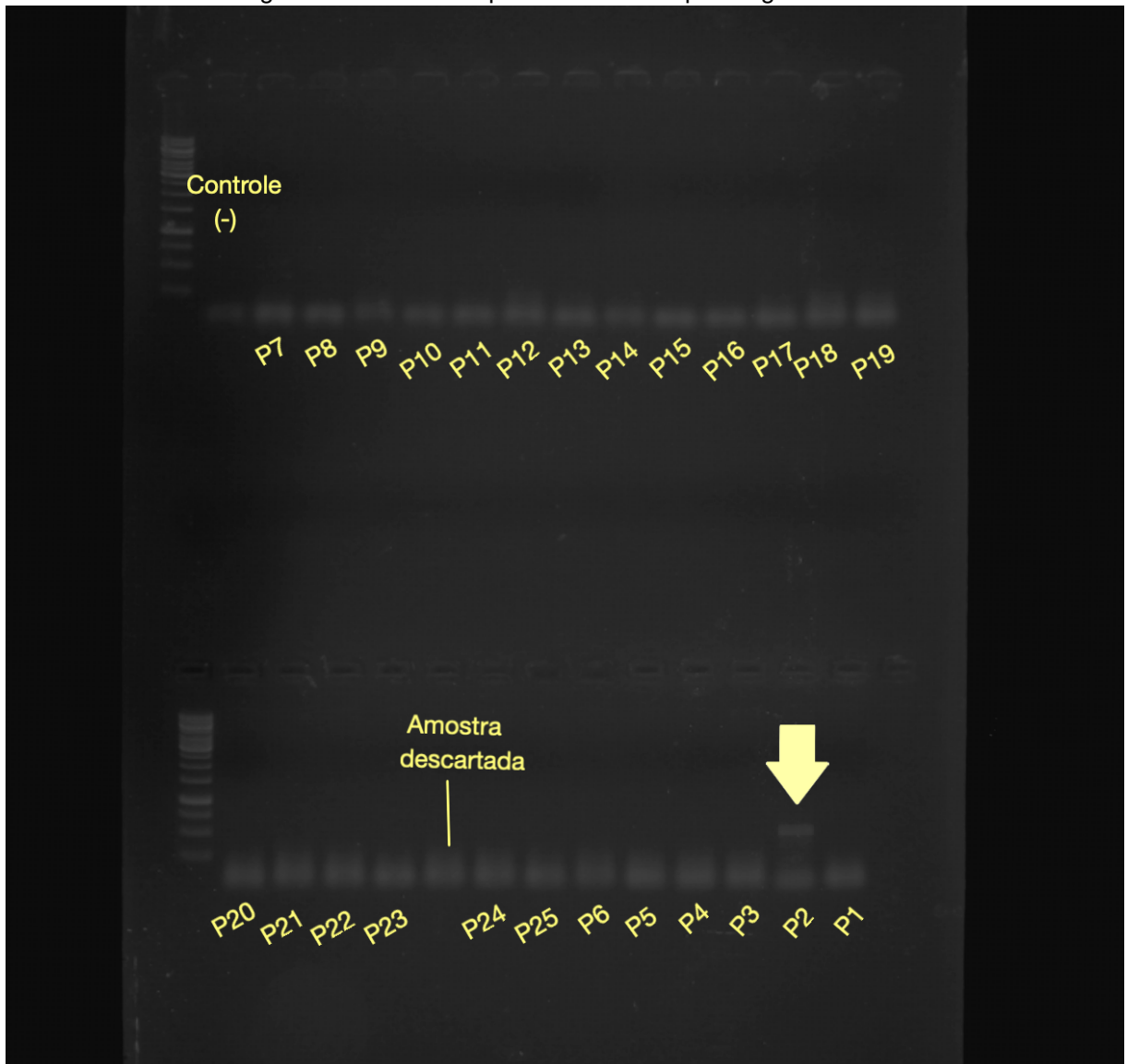
Figura 34. Gel com os produtos de PCR para o gene Arc3.1.



Fonte: Elaborado para este estudo.

DESOEUVRE et al. (2016), em um estudo da diversidade da microbiota presente em águas de rios, reportou a expressão do gene *ArsB* apenas para locais com pouca variação das condições do meio, como pH, teor de Fe, Al, entre outros; enquanto a expressão do gene *acr3.1* foi reportada para a microbiota proveniente de ambientes de condições mais generalistas. Estes genes foram reportados como associados a um dos dois processos que resultam na redução de As(V) no meio, visto que esta espécie pode tanto ser utilizada como aceptora de elétrons em condições anaeróbicas quanto sofrer redução intracelular, desta vez, em condições aeróbicas.

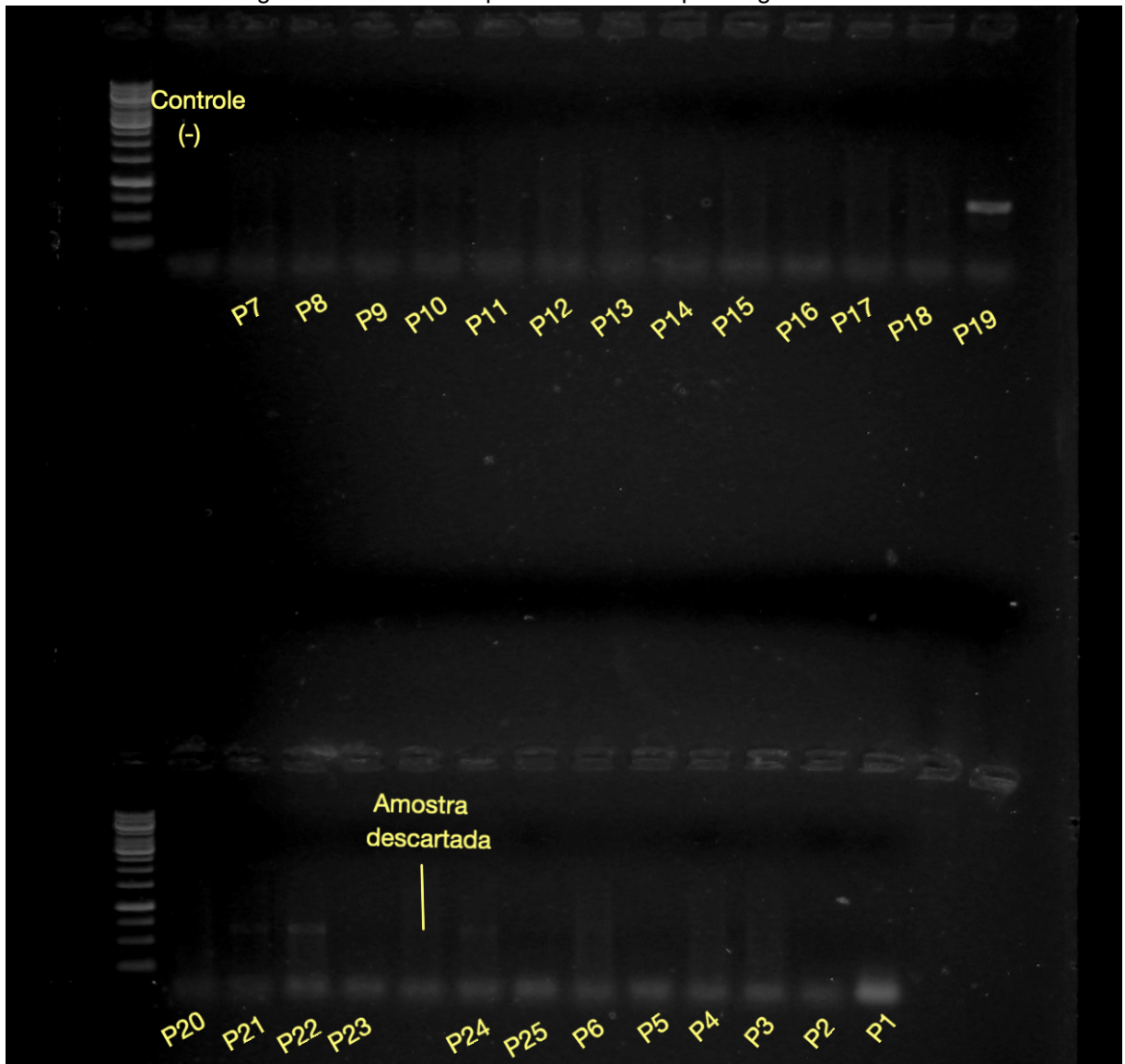
Na figura 35, pode-se observar a amplificação do gene associado a oxidação do arsênio, o *aoxB*, encontrada para apenas uma das amostras, a P2.

Figura 35. Gel com os produtos de PCR para o gene *aoxB*.

Fonte: Elaborado para este estudo.

Na figura 36, observa-se as bandas relativas à amplificação durante o PCR realizado com os *primers* funcionais para o gene *ArrAb*, relacionado a respiração utilizando arsênio como aceptor de elétrons. Houve amplificação para as amostras P19 e P22 (mais tênue). As duas amostras em que houve a amplificação foram as mesmas que apresentaram concentração de arsênio no extrato de saturação menor no tratamento de contaminação por gasolina que no controle.

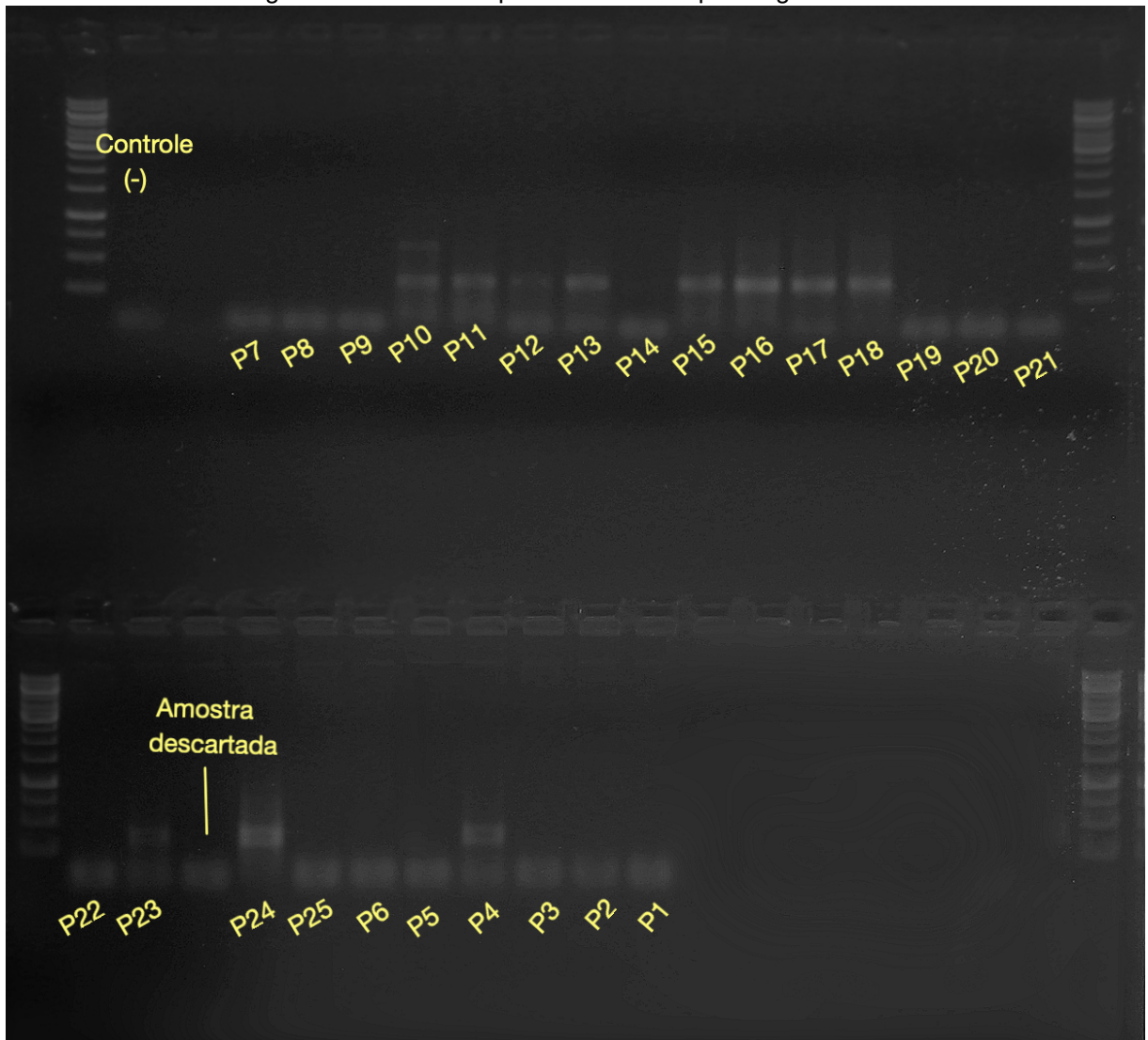
Figura 36. Gel com os produtos de PCR para o gene *arrAb*.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Na figura 37, observa-se à amplificação realizada com os *primers* funcionais para o gene *ArsM*, relacionado a metilação arsênio, das formas inorgânicas para as orgânicas, voláteis. Em 11 das amostras avaliadas (P4, P10, P11, P12, P13, P15, P16, P17, P18, P23, P24) foi observada a presença do gene.

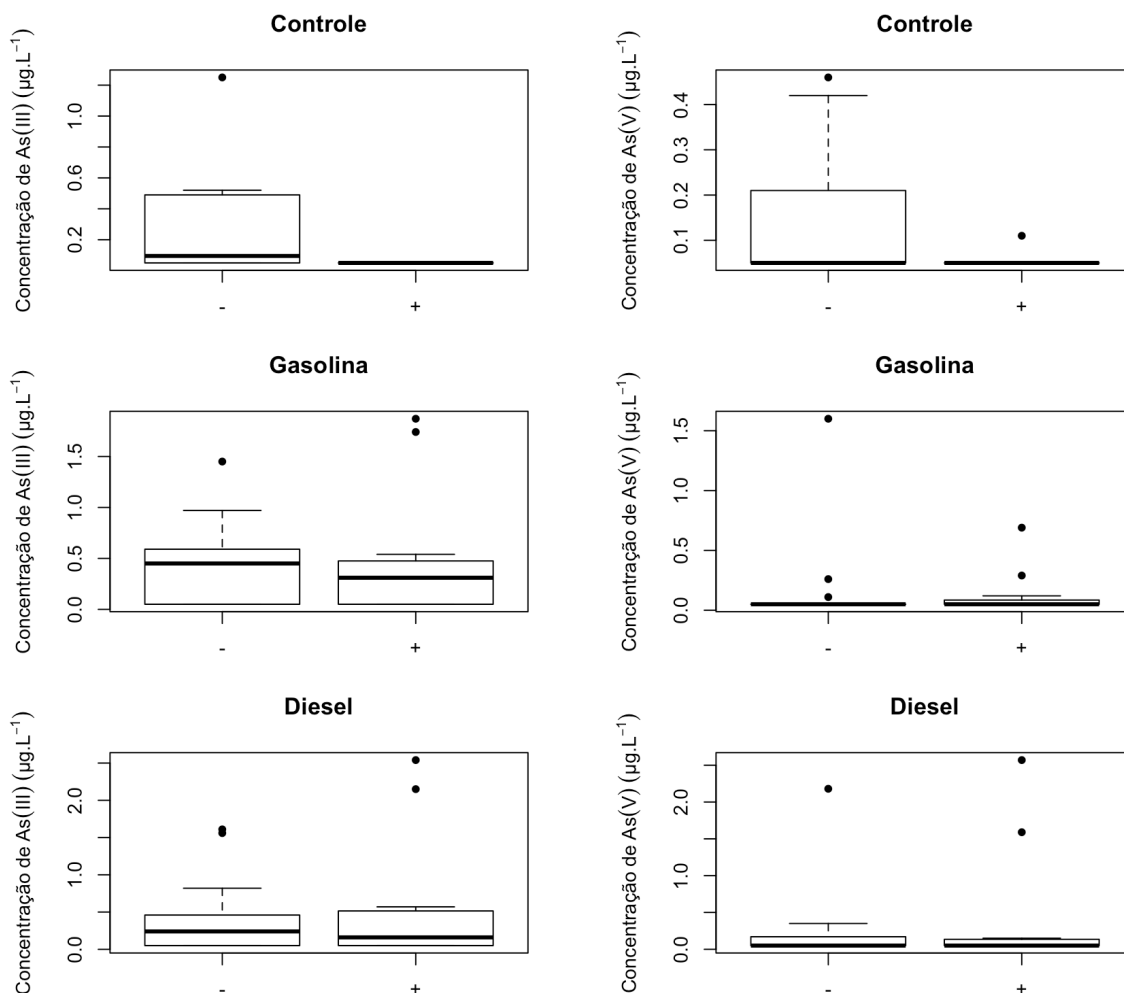
Figura 37. Gel com os produtos de PCR para o gene arsM.



Fonte: Elaborado para este estudo.

Nos solos que foi encontrada a expressão do gene *ArsM*, a concentração no tratamento controle foi significativamente mais baixa para $As(III)$ (p -valor=0,0078) e $As(V)$ (p -valor=0,0488). No entanto, não foi observada diferença significativa para ambas as espécies nos tratamentos gasolina e diesel (Figura 38)

Figura 38. Concentração das espécies de arsênio em função da expressão do gene *ArsM* nos três tratamentos (Solos da campanha Estação seca).



Fonte: Elaborado para este estudo.

Este resultado evidencia que a metilação é um mecanismo importante na regulação da concentração de As(III) nos solos controle, mas que, após a adição dos contaminantes orgânicos, a metilação deixa de ser um processo eficiente.

6 CONCLUSÃO

Os solos coletados apresentaram grande variação em relação ao carbono orgânico, nas frações totais e dissolvidas. Também foi observada grande variação no enriquecimento do arsênio nas amostras. Quanto a textura, todos os solos apresentaram textura média, no entanto esta textura tem sido reportada como ideal para o objetivo deste estudo, visto que apresentam melhores condições de aeração do solo quando comparados com solos de textura argilosa e maior atividade biológica, maior capacidade de troca catiônica e menor migração vertical dos contaminantes em comparação com solos de textura arenosa.

A adição de gasolina e de diesel aos solos superficiais resultou no aumento da extração da concentração de arsênio em água nos solos superficiais. O aumento da mobilidade do arsênio em solo na presença dos contaminantes, apesar de significativo, foi menos expressivo quando comparado com outros sistemas (aquífero e áreas úmidas) e quando comparado com outras fontes de matéria orgânica (biocarvão e serapilheira). A sazonalidade não influenciou na faixa de concentração do arsênio extraível em água, mas influenciou significativamente a eficiência da redução do As(V). A respiração basal do solo foi a principal variável de influência na mobilidade de As(III). Uma taxa de biodegradação de aproximadamente 7% foi o suficiente para tornar frações de As(III), antes imobilizadas pela fase sólida, em solúveis para 60% dos solos estudados. A metilação, importante fator de regulação da concentração de As(III) em solos não contaminados, não foi significativa quando gasolina ou diesel foram adicionados ao meio. O teor de Mn no solo pode ser um importante mecanismo de oxidação abiótica, controlando a concentração de As(III).

As amostras de solos do tratamento controle apresentaram apenas a capacidade de mobilizar mais acentuadamente o arsênio de origem antrópica, porém a adição da gasolina e do diesel resultou no aumento da mobilidade do arsênio em solos de outras classes, incluindo os de origem litogênica.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para As(III) no uso rural e natural do solo, sendo que não foi observada diferença significativa entre os tratamentos apenas nos solos urbanos. Os dados sugerem que a alta atividade metabólica do solo, característica de solo em áreas de cultivo, contribuiu para aumentar a mobilização do arsênio. Ressalta-se que a influência de agroquímicos pode contribuir direta ou indiretamente para o aumento da mobilização do arsênio, por

meio de modificação na comunidade microbiana, competição por sítios de ligação no solo ou influencia em parâmetros físico-químicos do solo, sendo que estudos aprofundados em relação aos mecanismos influenciadores em solos rurais ainda são necessários. O estudo destes mecanismos apresenta grande importância tendo em vista que solos utilizados para atividades agrícolas podem ser particularmente susceptíveis a mobilização do arsênio após a contaminação com gasolina e diesel. O aumento da mobilidade do arsênio extraível em água após a introdução dos contaminantes orgânicos, incluiu majoritariamente espécies inertes, não influenciando nas concentrações lábeis do elemento. Mesmo com a presença dos contaminantes, as frações lábeis de arsênio permaneceram controladas pelo teor de COD, naturalmente presente no solo. Desta forma, nas condições deste estudo, o aumento da mobilidade do arsênio tem implicações mais sérias em relação à lixiviação do arsênio que à absorção do elemento por plantas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOGHNY, T.; MOHAMED, R. S. A.; EL-SAYED, E.; MOHAMMED ALY, S.; SNOUSY, M. G. Effect of Soil Texture on Remediation of Hydrocarbons-Contaminated Soil at El-Minia District, Upper Egypt. *ISRN Chemical Engineering*, v. 2012, p. 1–13, 2012.
- ABREU, M. C., & FIGUEIREDO, B. R. Mapeamento geoquímico de arsênio e metais pesados em solo da unidade Piririca, Vale do Ribeira (SP). In: *Proceedings of the 41th Brazilian Geological Congress*, João Pessoa Paraíba, 2004.
- ALLOWAY, B. J. *Heavy Metals in Soils*. 2nd ed. Bishhopbriggs: Springer Netherlands, 1995.
- ARORA, B.; DWIVEDI, D.; FAYBISHENKO, B.; JANA, R. B.; WAINWRIGHT, H. M. Understanding and Predicting Vadose Zone Processes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, v. 85, n. 1, p. 303–328, 2019.
- BAHMANI, F.; AHMAD ATAEI, S.; ALI MIKAILI, M. The Effect of Moisture Content Variation on the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soils: Modeling and Experimental Investigation. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 05, n. 02, 2018.
- BALSEIRO-ROMERO, M.; MONTERROSO, C.; CASARES, J. J. Environmental Fate of Petroleum Hydrocarbons in Soil: Review of Multiphase Transport, Mass Transfer, and Natural Attenuation Processes. *Pedosphere*, v. 28, n. 6, p. 833–847, 2018.
- BARBIERI, M. The Importance of Enrichment Factor (EF) and Geoaccumulation Index (Igeo) to Evaluate the Soil Contamination. *Journal of Geology & Geophysics*, v. 5, n. 1, 2016.
- BARRINGER, J. L.; SZABO, Z.; BARRINGER, T. H. Arsenic and metals in soils in the vicinity of the Imperial Oil Company Superfund site, Marlboro Township, Monmouth County, New Jersey. *U.S. Geol. Survey Water Resour. Inv. 98-4016*, 251 p., 1998.
- BECKER, E. M.; DESSUY, M. B.; BOSCHETTI, W.; et al. Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by hydride generation-graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 71–72, p. 102–106, 2012.
- BEESLEY, L.; MARMIROLI, M.; PAGANO, L.; et al. Biochar addition to an arsenic contaminated soil increases arsenic concentrations in the pore water but reduces uptake to tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Science of The Total Environment*, v. 454–455, n. 2865, p. 598–603, 2013.
- BOWELL, R. J.; ALPERS, C. N.; JAMIESON, H. E.; NORDSTROM, D. K.; MAJZLAN, J. The Environmental Geochemistry of Arsenic -An Overview. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, v. 79, n. 1, p. 1–16, 2014.
- BROWN, R. A.; PATTERSON, K. E.; BP, G. T. R.; PALMA, L. *Attenuation of Naturally Occurring Arsenic at Petroleum Hydrocarbon – Impacted Sites*. 2010.
- BURGIN, A. J.; YANG, W. H.; HAMILTON, S. K.; SILVER, W. L. Beyond carbon and nitrogen: How the microbial energy economy couples elemental cycles in diverse ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2011.
- CHATTERJEE, A.; MUKHERJEE, A. Hydrogeological investigation of ground water arsenic contamination in South Calcutta. *The Science of The Total Environment*, v. 225, n. 3, p. 249–262, 1999.
- CHEN, M.; MA, L. Q.; HARRIS, W. G. Baseline Concentrations of 15 Trace Elements in Florida Surface Soils. *Journal of Environmental Quality*, v. 28, n. 4, p. 1173–1181, 1999.
- CHEN, X.; ZENG, X. C.; KAWA, Y. K.; et al. Microbial reactions and environmental factors affecting the dissolution and release of arsenic in the severely contaminated soils under anaerobic or aerobic conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, n. August, 2020.
- CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 4, n. 1, p. 71–75, 1999.
- COUNCIL, N. R. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*. Washington, DC: Press, The National Academies, 2003.
- COZZARELLI, I. M.; SCHREIBER, M. E.; ERICKSON, M. L.; ZIEGLER, B. A. Arsenic Cycling in

- Hydrocarbon Plumes: Secondary Effects of Natural Attenuation. *Groundwater*, v. 54, n. 1, p. 35–45, 2016.
- CUNHA, C. D. DA; FERREIRA LEITE, S. G. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 1, p. 45–49, 2000.
- DAVISON, W.; ZHANG, H. In-situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*, vol. 367, p. 546–548, 1994.
- DAVISON, W.; ZHANG, H. Progress in understanding the use of diffusive gradients in thin films (DGT) back to basics. *Environmental Chemistry*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2012.
- DEB, S. K.; SHUKLA, M. K. A Review of Dissolved Organic Matter Transport Processes Affecting Soil and Environmental Quality. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, v. 1, n. 2, p. 1–11, 2011.
- DESOEUVRE, A.; CASIOT, C.; HÉRY, M. Diversity and Distribution of Arsenic-Related Genes Along a Pollution Gradient in a River Affected by Acid Mine Drainage. *Microbial Ecology*, v. 71, n. 3, p. 672–685, 2016.
- DIVIŠ, P.; LEERMAKERS, M.; DOČEKALOVÁ, H.; GAO, Y. Mercury depth profiles in river and marine sediments measured by the diffusive gradients in thin films technique with two different specific resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, n. 7, p. 1715–1719, 2005.
- DOBРАН, S.; ZAGURY, G. J. Arsenic speciation and mobilization in CCA-contaminated soils: Influence of organic matter content. *Science of the Total Environment*, v. 364, n. 1–3, p. 239–250, 2006.
- DODDS, W. K.; BANKS, M. K.; CLENAN, C. S.; et al. Biological properties of soil and subsurface sediments under abandoned pasture and cropland. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 28, n. 7, p. 837–846, 1996.
- DOUŠOVÁ, B.; MARTAUS, A.; FILIPPI, M.; KOLOUŠEK, D. Stability of arsenic species in soils contaminated naturally and in an anthropogenic manner. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 187, n. 1–4, p. 233–241, 2008.
- DRADRACH, A.; SZOPKA, K.; KARCZEWSKA, A. Ecotoxicity of pore water in soils developed on historical arsenic mine dumps: The effects of forest litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 181, n. October, p. 202–213, 2019.
- DUFFUS, J.; TEMPLETON, D. M.; SCHWENK, M. *Comprehensive Glossary of Terms Used in Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017.
- EARY, L. E.; SCHRAMKE, J. A. Rates of Inorganic Oxidation Reactions Involving Dissolved Oxygen. In: MELCHIOR, D., BASSETT, R. L (Eds). *Chemical Modeling of Aqueous Systems II*, p.379–396, 1990.
- EMBRAPA. *Manual de Métodos de Análise de Solo*. 2nd ed. Rio de Janeiro, 1997.
- EMBRAPA. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro, 2013.
- FAHY, A.; GILOTEAUX, L.; BERTIN, P.; et al. 16S rRNA and As-Related Functional Diversity: Contrasting Fingerprints in Arsenic-Rich Sediments from an Acid Mine Drainage. *Microbial Ecology*, v. 70, n. 1, p. 154–167, 2015.
- FIGUEIREDO, B. R.; BORBA, R. P.; ANGÉLICA, R. S. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 29, n. 2, p. 109–118, 2007.
- FRIEDMAN, I.; O'NIEL, J. R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest [Data of Geochemistry, Sixth Edition]. *U. S. Geological Survey Professional Paper*, v. 440, n. 440-KK, p. 12, 1977.
- GARCÍA-DELGADO, C.; MARÍN-BENITO, J. M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 390, p. 122162, 2020.
- GOMEZ-CAMINERO, A, P.; HOWE, M.; HUGHES, E.; et al. Environmental Health Criteria 224 *ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS (Second Edition)*, p. 1–66, 2001.
- GONZAGA, M. I. S.; MA, L. Q.; PACHECO, E. P.; SANTOS, W. M. DOS. Predicting Arsenic bioavailability to Hyperaccumulator *Pteris vittata* in Arsenic-contaminated soils. *International Journal of*

Phytoremediation, v. 14, n. 10, p. 939–949, 2012.

GOSS, K. U.; SCHWARZENBACH, R. P. Rules of thumb for assessing equilibrium partitioning of organic compounds: Successes and pitfalls. *Journal of Chemical Education*, v. 80, n. 4, p. 450–455, 2003.

GROYSMAN, A. Physico-Chemical Characteristics and Chemical Composition of Crude Oils and Petroleum Products. In: *Corrosion in Systems for Storage and Transportation of Petroleum Products and Biofuels*. Dordrecht: Springer Netherlands. p.227–297, 2014.

HALTER, W. E.; PFEIFER, H.-R. Arsenic(V) adsorption onto α -Al₂O₃ between 25 and 70°C. *Applied Geochemistry*, v. 16, n. 7–8, p. 793–802, 2001.

HARPER, M P; DAVISON, W.; ZHANG, H.; TYCH, W. Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 62, n. 16, p. 2757–2770, 1998.

HESNAWI, R. M.; ADBEIB, M. M. Effect of Nutrient Source on Indigenous Biodegradation of Diesel Fuel Contaminated Soil. *APCBEE Procedia*, v. 5, p. 557–561, 2013.

HUESEMANN, M. H. Predictive Model for Estimating the Extent of Petroleum Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, v. 29, n. 1, p. 7–18, 1995

ISO. ISO 18400-206 206: Soil quality — Sampling — Part 206: *Collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory* Qualité. Geveva, 2018.

JIA, Y.; HUANG, H.; ZHONG, M.; et al. Microbial arsenic methylation in soil and rice rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 7, p. 3141–3148, 2013.

JONES, D. L.; WILLETT, V. B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 991–999, 2006.

JONGE, M. DE; TEUCHIES, J.; MEIRE, P.; BLUST, R.; BERVOETS, L. The impact of increased oxygen conditions on metal-contaminated sediments part I: Effects on redox status, sediment geochemistry and metal bioavailability. *Water Research*, v. 46, n. 7, p. 2205–2214, 2012.

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, v. 107, n. 2, p. 245–254, 2000.

KAASALAINEN, M.; YLI-HALLA, M. Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environmental Pollution*, v. 126, n. 2, p. 225–233, 2003.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. The Anthropocene - Water Pollution. *Trace Elements in Soils and Plants Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd ed., p.25, 2001. Boca Raton: CRC Press.

KARCZEWSKA, A.; GAŁKA, B.; DRADRACH, A.; et al. Solubility of arsenic and its uptake by ryegrass from polluted soils amended with organic matter. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 182, n. 6, p. 193–200, 2017.

KIM, H.-B.; KIM, J.-G.; KIM, T.; ALESSI, D. S.; BAEK, K. Mobility of arsenic in soil amended with biochar derived from biomass with different lignin contents: Relationships between lignin content and dissolved organic matter leaching. *Chemical Engineering Journal*, v. 393, p. 124687, 2020.

KIM, H. BIN; KIM, J. G.; CHOI, J. H.; KWON, E. E.; BAEK, K. Photo-induced redox coupling of dissolved organic matter and iron in biochars and soil system: Enhanced mobility of arsenic. *Science of the Total Environment*, v. 689, n. June, p. 1037–1043, 2019.

KLEBER, M.; JOHNSON, M. G. *Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter*. 1st ed. Elsevier Inc., 2010.

LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; GIETER, M. DE; et al. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 1, p. 1–10, 2006.

LEVY, J. L.; ZHANG, H.; DAVISON, W.; PUY, J.; GALCERAN, J. Assessment of trace metal binding kinetics in the resin phase of diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta*, v. 717, p. 143–150, 2012.

- LI, C.; DING, S.; YANG, L.; et al. Diffusive gradients in thin films: devices, materials and applications. *Environmental Chemistry Letters*, v. 17, n. 2, p. 801–831, 2019.
- LI, G.; KHAN, S.; IBRAHIM, M.; et al. Biochars induced modification of dissolved organic matter (DOM) in soil and its impact on mobility and bioaccumulation of arsenic and cadmium. *Journal of Hazardous Materials*, v. 348, p. 100–108, 2018.
- LI, Y.; CAI, Y. Mobility of toxic metals in sediments: Assessing methods and controlling factors. *J Environ Sci (China)*, v. 31, p. 2013–2015, 2015.
- LIU, F.; CRISTOFARO, A. DE; VIOLANTE, A. Effect of Ph, Phosphate and Oxalate on the Adsorption/Desorption of Arsenate on/from Goethite. *Soil Science*, v. 166, n. 3, 2001.
- LUCAS, A. R.; REID, N.; SALMON, S. U.; RATE, A. W. Quantitative Assessment of the Distribution of Dissolved Au, As and Sb in Groundwater Using the Diffusive Gradients in Thin Films Technique. *Environmental Science & Technology*, v. 48, n. 20, p. 12141–12149, 2014.
- LUO, J.; ZHANG, H.; SANTNER, J.; DAVISON, W. Performance characteristics of diffusive gradients in thin films equipped with a binding gel layer containing precipitated ferrihydrite for measuring arsenic(V), Selenium(VI), Vanadium(V), and Antimony(V). *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 21, p. 8903–8909, 2010.
- MANDAL, B. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, v. 58, n. 1, p. 201–235, 2002.
- MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere - A review. *Science of the Total Environment*, v. 249, n. 1–3, p. 297–312, 2000.
- MCGRATH, S. P.; CUNLIFFE, C. H. A Simplified Method for the Extraction of the Metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from Soils and Sewage Sludges. *J. Sci. Food Agric.*, v. 36, p. 794–798, 1985.
- MCGUIRE, J. T.; LONG, D. T.; HYNDMAN, D. W. Analysis of recharge-induced geochemical change in a contaminated aquifer. *Ground Water*, v. 43, n. 4, p. 518–530, 2005.
- MCKEE JE; LAVERTY FB; HERTEL RM. Gasoline in groundwater. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, v. 44, n. 2, p. 293–302, 1972.
- MEERS, E.; LAING, G. DU; UNAMUNO, V. G.; et al. Water extractability of trace metals from soils: Some pitfalls. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 176, n. 1–4, p. 21–35, 2006.
- MOEYS, J. *The soil texture wizard: R functions for plotting, classifying, transforming and exploring soil texture data*. R package version 1.2.13. , p. 96, 2014.
- MORENO-JIME, E.; SIX, L.; WILLIAMS, P. N.; SMOLDERS, E. Inorganic species of arsenic in soil solution determined by microcartridges and ferrihydrite-based diffusive gradient in thin films (DGT). *Talanta*, v. 104, p. 83–89, 2013.
- NEUMANN, T. 2 - Fundamentals of aquatic chemistry relevant to radionuclide behaviour in the environment. In: C. Poinsot; H. B. T.-R. B. in the N. E. Geckeis (Eds.); *Woodhead Publishing Series in Energy*. p.13–43, 2012.
- OKOP, I. J.; EKPO, S. C. Determination of total hydrocarbon content in soil after petroleum spillage. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, v. 3, p. 1722–1726, 2012.
- ONISHI, H.; SANDELL, E. B. Geochemistry of arsenic. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 7, n. 1955, p. 1–33, 2000.
- ÖSTERLUND, H.; CHLOT, S.; FAARINEN, M.; et al. Simultaneous measurements of As, Mo, Sb, V and W using a ferrihydrite diffusive gradients in thin films (DGT) device. *Analytica Chimica Acta*, v. 682, n. 1–2, p. 59–65, 2010.
- PANAGOS, P.; LIEDEKERKE, M. VAN; YIGINI, Y.; MONTANARELLA, L. Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health*, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- PANKHURST, C. E.; HAWKE, B. G.; MCDONALD, H. J.; et al. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 35, n. 7, p. 1015–1028, 1995.
- PANTHER, J.; BENNETT, W.; WELSH, D.; TEASDALE, P. Simultaneous Measurement of Trace

- Metal and Oxyanion Concentrations in Water using Diffusive Gradients in Thin Films with a Chelex-Metsorb Mixed Binding Layer. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 1, p. 427–434, 2014.
- PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I.; HORNICK, S. B.; MEYER, R. E. Soil quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*, v. 7, n. 1–2, p. 5–11, 1992.
- PINEDO, J.; IBÁÑEZ, R.; LIJZEN, J. P. A.; IRABIEN, Á. Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances. *Journal of Environmental Management*, v. 130, p. 72–79, 2013.
- PINTO, A. B.; PAGNOCCA, F. C.; PINHEIRO, M. A. A.; FONTES, R. F. C.; OLIVEIRA, A. J. F. C. DE. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, n. 1–2, p. 410–417, 2014.
- PLIESKI, G. L. DO A.; EBELING, A. G.; ANJOS, L. H. C. DOS; PEREIRA, M. G.; VALLADARES, G. S. Avaliação de métodos analíticos para determinar acidez em solos com alto teor de matéria orgânica. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, v. 24, n. 2, p. 15–21, 2004.
- PSZONICKI, L.; HANNA, A.; SUSCHNYFERENCE, O. *Reference Sheet*. International Atomic Energy Agency, 2000.
- PYRZYŃSKA, K.; WIERZBICKI, T. Determination of vanadium species in environmental samples. *Talanta*, v. 64, n. 4, p. 823–829, 2004.
- RICHARDS, L. A. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils. *Soil Science Society of America Journal*. v. 18, p.348, 1954.
- RIEUWERTS, J. S.; THORNTON, I.; FARAGO, M. E.; ASHMORE, M. R. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability*, v. 10, n. 2, p. 61–75, 1998.
- ROLISOLA, A. M. C. M.; SUÁREZ, C. A.; MENEGÁRIO, A. A.; et al. Speciation analysis of inorganic arsenic in river water by Amberlite IRA 910 resin immobilized in a polyacrylamide gel as a selective binding agent for As(V) in diffusive gradient thin film technique. *Analyst*, v. 139, n. 4373–4380, 2014.
- RONALD, A. M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiological reviews*, v. 45, n. 1, p. 180–209, 1981.
- ROSA, R. T. D. LA. Arsênio e Metais Associados na Região Aurífera do Piririca, Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. *Dissertação*, 1993.
- RUBY, E. C.; FIGUEIREDO, A. M. G.; MODESTO, R. P. Arsênio e urânio como indicadores de contaminação em solos agrícolas do Estado de São Paulo. Gramado, RS: 13 *Congresso Brasileiro de Geoquímica*, 2011
- SADIQ, M. Arsenic Chemistry In Soils : An Overview Of Thermodynamic Predictions And Field Observations. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 93, p. 117–136, 1997.
- SHEEHAN, P.; DEWHURST, R. E.; JAMES, S.; et al. Is there a relationship between soil and groundwater toxicity? *Environmental Geochemistry and Health*, v. 25, n. 1, p. 9–16, 2003.
- SHEPPARD, S. C. Summary of phytotoxic levels of soil arsenic. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 64, n. 3, p. 539–550, 1992.
- SHEWFELT, K.; LEE, H.; ZYTNER, R. G. Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil. *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 4, n. 1, p. 29–42, 2005.
- SILVA, E. E. DA; AZEVEDO, P. H. S. DE; DE-POLLI, H. *Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂)*, Seropédica: Empraba, 2007.
- SMEDLEY, P.; KINNIBURGH, D. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, v. 17, n. 5, p. 517–568, 2002.
- SOUZA, A. E. DE. *Fosfato Balanço Mineral Brasileiro*. Brasília, 2001.
- SUTHERLAND, R. A. Bed sediment-associated trace metals in an urban stream, Oahu, Hawaii. *Environmental Geology*, v. 39, n. 6, p. 611–627, 2000.

SZÁKOVÁ, J.; TLUSTOŠ, P.; GOESSLER, W.; FRKOVÁ, Z.; NAJMANOVÁ, J. Mobility of arsenic and its compounds in soil and soil solution: The effect of soil pretreatment and extraction methods. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, n. 2–3, p. 1244–1251, 2009.

TAFURT-CARDONA, M.; EISMANN, C. E.; SUÁREZ, C. A.; et al. In situ selective determination of methylmercury in river water by diffusive gradient in thin films technique (DGT) using baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized in agarose gel as binding phase. *Analytica Chimica Acta*, v. 887, p. 38–44, 2015.

TAKENO, N. Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tokyo*, n. 419, p. 285, 2005.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, v. 72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

TRINDADE, J. M.; MARQUES, A. L.; LOPES, G. S.; MARQUES, E. P.; ZHANG, J. Arsenic determination in gasoline by hydride generation atomic absorption spectroscopy combined with a factorial experimental design approach. *Fuel*, v. 85, n. 14–15, p. 2155–2161, 2006.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study. *Chemosphere*, v. 58, n. 4, p. 515–522, 2005.

VASCONCELOS, C. A. Análise de solo: entendimento e interpretação. *Curso de Uso e Manejo da Irrigação*, p. 60, 1986.

WANG, J.; BAI, L.; ZENG, X.; et al. Assessment of arsenic availability in soils using the diffusive gradients in thin films (DGT) technique—a comparison study of DGT and classic extraction methods. *Environmental Science-Processes & Impacts*, v. 16, n. 10, p. 2355–2361, 2014.

WEI, M.; CHEN, J.; WANG, X. Removal of arsenic and cadmium with sequential soil washing techniques using Na₂EDTA, oxalic and phosphoric acid: Optimization conditions, removal effectiveness and ecological risks. *Chemosphere*, v. 156, p. 252–261, 2016.

WEISSMANNOVÁ, H. D.; PAVLOVSKÝ, J. Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview). *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 189, n. 12, p. 616, 2017.

WILLIAMS, P. N.; ZHANG, H.; DAVISON, W.; et al. Organic Matter-Solid Phase Interactions Are Critical for Predicting Arsenic Release and Plant Uptake in Bangladesh Paddy Soils. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 14, p. 6080–6087, 2011.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, v. 2011, p. 1–20, 2011.

XUE, S.; JIANG, X.; WU, C.; et al. Microbial driven iron reduction affects arsenic transformation and transportation in soil-rice system. *Environmental Pollution*, v. 260, 2020.

YAN, M.; ZENG, X.; WANG, J.; et al. Dissolved organic matter differentially influences arsenic methylation and volatilization in paddy soils. *Journal of Hazardous Materials*, v. 388, n. 12, p. 121795, 2020.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; GADI, R.; KOBAYASHI, T. In situ measurement of dissolved phosphorus in natural waters using DGT. *Analytica Chimica Acta*, v. 370, n. 1, p. 29–38, 1998.

ZHOU, W.; HE, J.; HUI, D.; SHEN, W. Quantifying the short-term dynamics of soil organic carbon decomposition using a power function model. *Ecological Processes*, v. 6, n. 1, 2017.

ZIEGLER, B. A.; MCGUIRE, J. T.; COZZARELLI, I. M. Rates of As and Trace-Element Mobilization Caused by Fe Reduction in Mixed BTEX-Ethanol Experimental Plumes. *Environmental Science and Technology*, v. 49, n. 22, p. 13179–13189, 2015.

ZSOLNAY, Á. Dissolved organic matter: Artefacts, definitions, and functions. *Geoderma*, v. 113, n. 3–4, p. 187–209, 2003.