

MARINA BIANCHINI DE SALVI

**Degradação química e biológica de ^{14}C -
Hexaclorobenzeno por
polietilenoglicol/hidróxido de sódio e
Trametes villosa (Sw.) Kreisel**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2008

MARINA BIANCHINI DE SALVI

**Degradação química e biológica de ^{14}C -
Hexaclorobenzeno por
polietilenoglicol/hidróxido de sódio e
Trametes villosa (Sw.) Kreisel.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de MESTRE em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de
Concentração de Plantas Avasculares e Fungos
em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. DÁCIO ROBERTO MATHEUS

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Salvi, Marina Bianchini
S184d Degradação química e biológica de ^{14}C -hexaclorobenzeno por polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel / Marina Bianchini de Salvi São Paulo, 2008.
150 p.il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Organoclorados . 3. Oxidação química . I. Título

CDU : 579

Aos meus pais Claulino e Neusa,
Às minhas irmãs Camila e Lara,
Ao meu “pequeno príncipe” Enzo.

DEDICO

“É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve”

(Victor Hugo)

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus pela simples oportunidade de viver!!!

Serei eternamente grata aos meus pais, Claulino e Neusa, que são os principais responsáveis por tudo na minha vida, que sempre me apoiaram, incentivaram, custearam e insistiram na minha caminhada. AMO VOCÊS!!!

Às minhas irmãs, Camila e Lara e ao meu cunhado Roberto que apesar das brigas e discussões, sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram. Muito Obrigada e Amo vocês!!!!

Ao mais novo membro da família, meu pequeno e precioso amor Enzo!!!

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus, pelos ensinamentos, convívio, exemplo de pessoa e profissional e por ter acreditado em mim durante estes 5 anos de aprendizado. Muito Obrigada!!

À Dra. Vera Maria Valle Vitali, pela preciosa ajuda e ensinamentos durante todo o desenvolvimento do trabalho e por me hospedar tantas vezes em sua casa. Muito Obrigada!!!

Aos meus queridos amigos e companheiros de projeto: Dra. Kátia Maria Gomes Machado, Ricardo Ribeiro da Silva, Glauciane Danusa Coelho, Sérgio Luiz Moreira Neto, William Seiti Okada, Ricardo Soares de Oliveira, Stephanie Moreta e Ana Paula Paranhos.

À Nara Ballaminut, grande amiga que conquistei durante esses anos, muito obrigada pelos ensinamentos do laboratório, pelas duradouras conversas (nada produtivas) durante o “cafezinho” e o almoço, pela companhia durante as viagens a congressos, etc.

À Cida e Dona Josefa (*in memorian*), pela organização do laboratório e companhia durante o “cafezinho”.

Aos meus avós maternos, Dionísio (*in memorian*) e Dilce, pelo exemplo de vida e por sempre me acolherem carinhosamente em sua casa para minhas tardes de estudo. Amo vocês!!!

Aos meus queridos primos e companheiros de bagunça: Ricardo, Gustavo, Fernando, Guilherme, Marília, Vladimir, Luiz Paulo, Luiz Henrique, Heloisa e Gabriela.

Aos agregados, mas que já fazem parte da família: Marcão, Gislaine, Monique, Saulo e minha querida amiga desde a faculdade Giuliana.

A todos da minha família que de alguma forma contribuíram para meu aperfeiçoamento.
MUITO OBRIGADA!!!

Aos amigos da Seção de Micologia e Liquenologia: Adriano Afonso Spielmann, Alexandra Lenk Gomes, Carla Puccinelli, Cássia Canavese, Carolina G. Moreira, Fernanda Karstedt, Luciana da Silva Canêz, Patrícia Junghblut, Prof. Dr. Norberto Carlos Schoenlein, Priscila da Silva, Tatiane Asai, Filipe R. Baptista, Luciana Jandelli Gimenes, Maíra Cortellin i Abrahão, Cristiane Nascimento e Nelson Menolli Júnior.

Aos pesquisadores e professores da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de SP, Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dra. Carmem Lúcia Amorim Pires-Zottarelli, Dra. Iracema Helena Schoenlin-Crusius, Dra. Milena de Luna Alves Lima, Dra. Marina Capelari, Dr. José Ivanildo de Souza, Ms. Michel Navarro Benatti, Dr. Marcelo Pinto Marcelli e Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

Aos funcionários da Seção de sub-frota, pelo auxílio no transporte das amostras: Arnaldo de Carvalho Lima, Alípio Santana de Oliveira, José Roberto Mourelli, João Darcílio, Aliomar Oliveira Gomes (Mazinho), Luís Gustavo Zanqueta e Wilson Ferreira da Silva.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo pela utilização de suas instalações e equipamentos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado pelo programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

À Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, através de convênio com Rhodia do Brasil Ltda, pelo apoio financeiro para a execução dos trabalhos.

Ao Dr. André Ferraz da Faculdade de Engenharia Química/USP de Lorena, pela utilização do CG/MS e ajuda na interpretação dos dados.

À Dra. Mara M. Andrea e ao Dr. Luiz Luchini do Instituto Biológico, pela utilização do espectrômetro de cintilação em líquido e o combustor.

Ao Dr. Amilcar Machuleck Junior do Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA/USP), pela colaboração nas análises cromatográficas e interpretação dos espectros de massa.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hexaclorobenzeno.....	4
1.1.1. Características gerais.....	5
1.1.2. Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente.....	6
1.2. Poluentes orgânicos persistentes (POPs).....	8
1.3. Aplicação de fungos causadores de podridão branca na degradação de xenobióticos.....	10
1.4. Processos químicos na degradação de organoclorados.....	14
1.4.1. Oxidação química.....	15
1.5. Biodegradação de hexaclorobenzeno.....	16
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Solo.....	21
3.2. Aplicação de ^{14}C -HCB ao solo.....	22
3.3. Diluição e determinação da radioatividade inicial do solo ^{14}C -HCB.....	23
3.4. Oxidação química do ^{14}C -HCB presente no solo.....	24
3.5. Determinação dos compostos ^{14}C -voláteis e $^{14}\text{CO}_2$ durante a oxidação química do solo ^{14}C -HCB.....	24
3.6. Neutralização do pH do solo após oxidação química.....	25
3.6.1. Determinação do pH inicial do solo.....	25
3.6.2. Determinação do mili equivalente do NaOH.....	26
3.7. Diluição e determinação da radioatividade inicial do solo ^{14}C -HCB oxidado.....	26

3.8. Capacidade máxima de retenção de água (CMRA).....	27
3.9. Fungo.....	27
3.10. Inóculo fúngico.....	28
3.11. Ajuste da Relação carbono/ nitrogênio (C/N) do inoculo fúngico e do solo	
¹⁴ C-HCB oxidado.....	29
3.11.1. Determinação do carbono orgânico.....	29
3.11.2. Determinação do nitrogênio total.....	30
3.11.2.1. Digestão sulfúrica.....	31
3.11.2.2. Destilação.....	31
3.12. Preparo dos solos contaminados para tratamento biológico.....	32
3.13. Condições de cultivo e biodegradação dos organoclorados.....	32
3.13.1. Influência dos ácidos graxos na biodegradação por <i>Trametes villosa</i>	
CCB 176 de ¹⁴ C-HCB e ¹⁴ C-HCB oxidado.....	33
3.13.2. Influência das diferentes relações C/N do solo na biodegradação por	
<i>Trametes villosa</i> CCB 176 de ¹⁴ C-HCB oxidado.....	34
3.14. Mineralização do ¹⁴ C-HCB e ¹⁴ C-HCB oxidado.....	36
3.15. Extração dos compostos ¹⁴ C-voláteis.....	36
3.16. Extração dos ¹⁴ C-resíduos solúveis em solvente orgânico.....	37
3.17. Determinação dos compostos ¹⁴ C-resíduos não extraíveis (ligados).....	38
3.18. Recuperação do radiocarbono.....	38
3.19. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa.....	38
3.20. Toxicidade aguda do solo.....	39
3.21. Análise estatística.....	40

ARTIGO I

Oxidação química de ^{14}C -hexaclorobenzeno em solo arenoso contaminado com resíduos organoclorados utilizando polietilenoglicol e NaOH

Resumo.....	42
Abstract.....	42
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão.....	49
Referências bibliográficas.....	55

ARTIGO II

Efeito de oxidação química, ácidos graxos insaturados e relação C/N do solo na biodegradação de ^{14}C -Hexaclorobenzeno por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel em solo contaminado com resíduos organoclorados

Resumo	60
Abstract.....	61
Introdução	62
Material e métodos.....	65
Resultados e discussão.....	70
Referências bibliográficas.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	112

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do ^{14}C -hexaclorobenzeno (^{14}C -HCB) por oxidação química em solo arenoso utilizando NaOH e polietilenoglicol e avaliar os efeitos de ácidos graxos insaturados e da relação C/N do solo na biodegradação por *Trametes villosa* CCB176 de ^{14}C -HCB e dos produtos da oxidação química do ^{14}C -HCB. O processo de oxidação química do ^{14}C -HCB no solo foi feita com polietilenoglicol, etanol e NaOH, durante 44 dias, seguido de neutralização com H_2SO_4 e esterilização com brometo de metila. A relação C/N do solo foi ajustada para 30, 80, 160 e 320 com sulfato de amônia e amido solúvel. O fungo foi inoculado no solo tratado quimicamente, acrescido de óleo vegetal (2,5 e 5%), CaSO_4 (2,5%) e incubado por 112 dias. Como controle utilizou-se solo não tratado quimicamente e sem óleo vegetal. $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis foram capturados em cal sodada e poliuretano, seguidos de extração ácida e em hexano, respectivamente. A extração dos compostos ^{14}C -solúveis em n-hexano foi feita em microondas com 16 ciclos de 41s a 240 watts, alternados com banho de gelo. Os ^{14}C -compostos ligados foram recuperados combustão. A leitura dos compostos radiomarcados foi feita por espectrometria de cintilação em líquido. A quantificação e identificação dos compostos foram feitas por cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa. Durante o período de oxidação do ^{14}C -HCB não foi observada formação de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis. A oxidação química promoveu a degradação de cerca de 83% do pentaclorobenzeno e 85% do HCB, transformando-o principalmente em tetraclorodietoxibenzeno e seus isômeros, 1,2,4 tricloro-5-etoxibenzeno, 1,2,3,5 tetracloro-4-etoxibenzeno e pentacloroetóxibenzeno. *T. villosa* não mineralizou o ^{14}C -HCB, e não produziu quantidade significativa de ^{14}C -compostos voláteis. Porém, com a oxidação química do ^{14}C -HCB e a adição de óleo vegetal, *T. villosa* mineralizou até 13% do tetraclorodietoxibenzeno e quando não foi adicionado óleo vegetal ao sistema de cultivo *T. villosa* produziu cerca de 6% de ^{14}C -compostos voláteis. Foi observado efeito significativo de *T. villosa* e do óleo vegetal na formação de ^{14}C -resíduos ligados que variou de 35,0 a 9,3% no solo ^{14}C -HCB e 14,5 a 8% no solo

com ^{14}C -HCB oxidado. As análises cromatográficas indicaram que houve remoções significativas de HCB (36%) e pentaclorobenzeno (38%) por *T. villosa* em solo contaminado sem tratamento químico. Após a oxidação química do HCB, *T. villosa* removeu cerca de 8% do tetraclorodietoxibenzeno formado e 30% de HCB residual no solo com óleo vegetal. A variação da relação C/N do solo não alterou as taxas de degradação dos produtos de oxidação química por *T. villosa*.

Palavras chaves: oxidação química, organoclorado, biorremediação

Abstract

This work had as objective to evaluate the degradation of ^{14}C -hexachlorobenzene (^{14}C -HCB) by chemical oxidation in sandy soil with utilization of NaOH and polyelthyleneglycol and to evaluate the effects of unsaturated fatty acids and soil C/N ratio on the biodegradation of ^{14}C -HCB and products of the chemical oxidation of ^{14}C -HCB by *Trametes villosa* CCB176. The chemical oxidation's process of ^{14}C -HCB in soil was made with polyelthyleneglycol, ethanol and NaOH, during 44 days, followed by neutralization with H_2SO_4 and sterilization with methyl bromide. Soil C/N ratio was adjusted to 30, 80, 160 and 320 with ammonium sulfate and soluble starch. The fungus was inoculated in chemically treated soil with addition of vegetable oil (2.5 and 5%), CaSO_4 (2.5%) and incubated for 112 days. A chemically non-treated soil with no addition of vegetable oil was used as control. $^{14}\text{CO}_2$ and ^{14}C -volatile compounds were captured in soda lime and polyurethane, followed by acid extraction and in n-hexane, respectively. The extraction of ^{14}C -soluble compounds in n-hexane was assayed in microwave with 16 cycles of 41s at 240 watts, alternated by ice baths. Bound ^{14}C -compounds were recuperated by combustion. A reading of the radiolabeled compounds was made by liquid scintillation spectrometry. Quantification and identification of the compounds were assayed in gas chromatograph coupled with a mass spectrometer. During HCB oxidation period it was not observed formation of $^{14}\text{CO}_2$ and volatile ^{14}C -compounds. The chemical oxidation promoted degradation of about 83% of pentachlorobenzene and 85% of HCB, transforming it mainly into tetrachlorodiethoxybenzene and its isomers, 1,2,4 trichloro-5-ethoxybenzene, 1,2,3,5 tetrachloro-4-ethoxybenzene and pentachloroethoxybenzene. *T. villosa* did not mineralize ^{14}C -HCB, and did not produce significant amounts of volatile ^{14}C -compounds. However, with chemical oxidation of ^{14}C -HCB and the addition of vegetable oil, *T. villosa*, was able to mineralize up to 13% of tetrachlorodiethoxybenzene and when it was not added vegetable oil to the culture system *T. villosa* produced about 6% of ^{14}C -compounds volatile. It was observed significant effect of *T. villosa* and vegetable oil in the formation of ^{14}C -bound residues

which varied from 35.0 to 9.3% in ^{14}C -HCB soil and from 14.5 to 8% in oxidized ^{14}C -HCB soil. The chromatographic analyses indicated that there were significant removals of HCB (36%) and pentachlorobenzene (38%) by *T. villosa* in soil contaminated with these pollutants. After HCB chemical oxidation, *T. villosa* removed about 8% of formed tetrachlorodiethoxybenzene and 30% of residual HCB in soil with vegetable oil. Soil C/N variation did not alter the degradation rates of the chemical oxidation products by *T. villosa*.

Keywords: chemical oxidation, organochlorine, bioremediation

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o processo de industrialização, o desenvolvimento de tecnologias e produtos cada vez mais avançados e o desmedido crescimento populacional, problemas ligados à poluição ambiental se acentuaram e trouxeram como consequência a necessidade da conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes nos solos, rios, lagos, oceanos e na atmosfera, bem como investimentos no desenvolvimento e implementação de tecnologias de remediação. (Kunz *et al.* 2002).

A partir do século XX, as indústrias químicas, farmacêuticas, de fertilizantes e de pesticidas sintetizaram vários compostos em grande quantidade, que não participam dos ciclos biogeoquímicos, e, portanto, não possuem decompositores naturais, pois a microbiota não foi exposta a eles durante a sua evolução, não desenvolvendo assim metabolismo para a sua degradação. Em consequência, os compostos revelaram-se estáveis sob condições aeróbias e anaeróbias. Tais compostos são chamados genericamente de xenobióticos e podem se tornar recalcitrantes e persistentes (Leisinger 1983, Semple *et al.* 2001).

O hexaclorobenzeno (HCB) foi considerado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um dos 12 poluentes orgânicos mais persistentes (POPs) que devem ser banidos do planeta, devido aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Toledo 2002).

O maior uso do HCB foi como fungicida, aplicado em sementes, em particular nos grãos de cereais. Também foi muito utilizado na adição de preservativos de madeira, nas composições pirotécnicas e na fabricação de corantes, vinil policlorado e borracha sintética (Matheus 2003). A produção mundial, no período de 1978-1981 foi estimada em 10.000 toneladas ano⁻¹. Uma vez que desde 1978 o HCB não tem sido produzido nos Estados Unidos da América, a maioria das 10.000 toneladas ano⁻¹ produzidas devem ter sido fabricadas na Europa (Barber *et al.* 2005).

O HCB é o principal composto presente nos solos contaminados por organoclorados da Baixada Santista. É oriundo do processo industrial de produção do tetracloreto de carbono, um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica. Os resíduos da fabricação de tetracloreto de carbono constituem-se de uma mistura de compostos organoclorados, sendo o HCB o componente principal, muito embora o pentaclorofenol (PCF) possa estar presente em concentrações relativamente elevadas, além de outros organoclorados em menores concentrações (Matheus 2003).

Diversas tecnologias têm sido avaliadas para degradação de organoclorados, sendo a biorremediação umas das mais promissoras do ponto de vista ambiental e econômico (Freire *et al.* 2000, Lodolo *et al.* 2001, Matheus & Machado 2002, Moreno *et al.* 2004, Rizzo *et al.* 2006).

Fungos são interessantes para a aplicação em sistemas de biorremediação, pois são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o crescimento bacteriano. Ainda, o crescimento dos fungos (induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico), por meio do alongamento e da ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, otimizando o contato do microrganismo com o contaminante, uma vez que aumenta sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (Dupont *et al.* 1997).

Basidiomicetos nativos do Brasil têm sido estudados para aplicação em processos de degradação de moléculas organocloradas e de descontaminação de solos. Estudos avaliando 125 fungos nativos selecionaram algumas espécies com características para aplicação em processos de biorremediação de solos contaminados com organoclorados (Okino *et al.* 2000; Matheus *et al.* 2000; Machado *et al.* 2005a). *Trametes villosa*, *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus* foram selecionados como os mais promissores para aplicação em solos com altos teores de pentaclorofenol (PCF) e HCB (Matheus *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2005a).

Matheus *et al.* (2000) estudaram a biodegradação de ^{14}C -HCB e observaram taxas de mineralização por *T. villosa*, *P. castanella* e *L. crinitus* inferiores a 1%, quando os fungos cresceram

em solo contendo 1.327 mg de HCB kg⁻¹solo, sem qualquer suplementação, evidenciando a recalcitrância do HCB à ação dos basidiomicetos. No entanto, quando Matheus & Bononi (2002) otimizaram as condições de cultivo de *P. castanella* e *L. crinitus* as taxas de mineralização aumentaram para mais de 20% após 56 dias de incubação. Machado *et al.* (2005a) em estudos de biodegradação de ¹⁴C-pentaclorofenol observaram mineralização de cerca de 8% de PCF em solo contendo 1.278 mg de PCF kg⁻¹solo, em condições não otimizadas.

Mesmo com resultados significativos observados por Matheus & Bononi (2002) de biodegradação de HCB por basidiomicetos “*in vivo*”, os dados não são reprodutíveis quando aplicados em grande escala (dados não publicados), contudo a utilização de tratamento químico associado ao tratamento biológico pode ser uma alternativa tecnológica para otimizar a remediação de solos contaminados com HCB.

A fim de melhorar a eficiência dos processos de biorremediação de solos contaminados, a degradação de poluentes recalcitrantes, através do tratamento combinado de oxidação química e biodegradação, por basidiomicetos tem sido também avaliada para algumas moléculas como o DDT e Benzo (a) pireno (Eggen & Sveum 2001, Zang *et al.* 2007).

1.1. Hexaclorobenzeno

O hexaclorobenzeno (HCB) é um composto aromático halogenado que apresenta o núcleo benzênico completamente clorado. Esta característica confere estabilidade ao composto, já que o cloro ligado organicamente inibe a sua biodegradação e, embora a ligação carbono-cloro não seja totalmente estranha à natureza, a maioria dos organismos não dispõe de enzimas que a quebre (Toledo 2002, Nakagawa 2003, Matheus 2003).

O HCB foi fabricado comercialmente pela primeira vez em 1933, através da reação do benzeno com excesso de cloreto, na presença de cloreto férrico e foi introduzido no mercado em 1945. À temperatura ambiente é um sólido cristalino branco, praticamente insolúvel em água, levemente solúvel em álcool frio, mas solúvel em éter, benzeno, hexano e clorofórmio. O HCB grau técnico contém, aproximadamente, 98% de HCB, 1,8% de pentaclorobenzeno e 0,2% de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, e é conhecido por ter uma variedade de impurezas, incluindo hepta- e octaclorodibenzofurano, octaclorodibenzo-p-dioxina e decaclorobifenil (Toledo 2002, Matheus 2003, Barber *et al.* 2005).

O HCB teve muitos usos na indústria e na agricultura. A principal aplicação agrícola para o HCB foi no tratamento de sementes de produtos agrícolas como trigo, cevada, aveia e centeio, para impedir o crescimento de fungos. Na indústria, o HCB foi usado diretamente na fabricação de fogos de artifício, e como agente fluxante na fabricação do alumínio. O HCB também foi usado como um agente preservador de madeira e agente peptisante na produção de estireno em borrachas para pneus (Toledo 2002, Vitali 2004, Barber *et al.* 2005).

A maioria do HCB existente atualmente teve como origem a atividade industrial. O pico de produção do HCB foi ao final da década de 70 e começo da década de 80, quando a produção anual mundial foi de $10.000 \text{ ton.ano}^{-1}$ de 1978 a 1981 (Barber *et al.* 2005, Hirano *et al.* 2007).

No Brasil o HCB é o principal composto presente nos solos contaminados por organoclorados da Baixada Santista. Foi produzido como resíduo do processo industrial de produção do tetracloreto de

carbono, um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica, inclusive no pólo petroquímico de Cubatão, Baixada Santista, que é uma das regiões mais industrializadas do Brasil (Matheus 2003, Vitali 2004). Os resíduos da fabricação de tetracloreto de carbono constituem-se de uma mistura de compostos organoclorados, sendo o HCB o componente principal, muito embora o pentaclorofenol (PCF) possa estar presente em concentrações relativamente elevadas, além de outros organoclorados em menores concentrações (Matheus 2003).

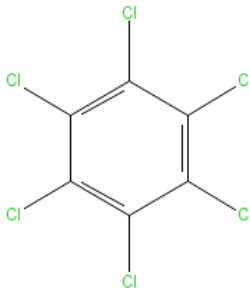
O HCB é extremamente persistente no ambiente devido à sua baixa solubilidade, baixa reatividade e seu alto teor de cloro. Está distribuído no meio ambiente em virtude de sua mobilidade e sua resistência a degradação. O transporte de longa distância tem uma importância significativa na redistribuição do HCB no meio ambiente. Geralmente presente em baixas concentrações, está largamente disperso no ambiente, tendo sido detectado em ar, água, sedimento, solo, biota e sítios remotos, refletindo a persistência e o longo alcance dessa substância (Matheus *et al.* 2000, Toledo 2002, Ezendam *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2007).

Devido a esta resistência natural à degradação biológica e química, à sua persistência no ambiente e à sua capacidade de se transportar para lugares distantes de sua fonte emissora, pelo ar e pelas águas, o HCB se configura num grupo de substâncias químicas de particular interesse, em nível global, para a agricultura, a indústria, a saúde pública e o meio ambiente: os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (Matheus *et al.* 2000, Toledo 2002, Hirano *et al.* 2007)

1.1.1. Características gerais

As características do HCB estão mostradas no Quadro 1

Quadro 1: Características do hexaclorobenzeno (Shiu *et al.* 1994)

Estrutura química	
Outros nomes:.....	Amatin; Bunt-cure; Bunt-no-more; Co-op Hexa; HCB; Carbono clorado de Julin; No Bunt 40; No Bunt 80; Pentaclorofenil clorado; Perclorobenzeno; Snieciotox; 1,2,3,4,5,6-Hexaclorobenzeno; Benzeno hexaclorado; Hexaclorobenzol; Fenil percloril; Rcra waste number U127; Sanocid; UN 2729
Fórmula	C ₆ Cl ₆
Peso molecular (g mol ⁻¹).....	284,78
Número de registro CAS.....	118-74-1
Solubilidade em água (mg L ⁻¹ , 25°C)....	0,0079
Ponto de fusão (°C).....	226
Ponto de Ebulição (°C).....	323-326
Pressão de vapor (mPa).....	1,45
Volatilidade.....	baixa
log Kow (pH 4,7).....	6,18
Mobilidade.....	baixa
Persistência.....	elevada
Limite aceitável em água para proteção da vida humana..(EPA/USA)..	zero

1.1.2. Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente

Segundo Toledo (2002) o HCB é altamente tóxico para a vida aquática, plantas, animais terrestres e seres humanos. O HCB pode causar danos para o feto em desenvolvimento, fígado, sistema imunológico (aumentando o risco de infecção), tireóide e rins. Uma exposição elevada ou repetida pode causar danos para o sistema nervoso e causar irritabilidade, dificuldade de locomoção e de coordenação, fraqueza muscular, tremor e/ou uma sensação de formigamento na pele. Exposição repetida pode levar a alterações permanentes na pele, tais como mudanças na pigmentação, pele

esticada e grossa, enrugamento fácil, cicatrizes, pele quebradiça e aumento no crescimento de pêlos, especialmente na face e antebraços.

Devido à sua alta lipossolubilidade, o HCB é facilmente absorvido por difusão passiva no sistema gastrointestinal. Uma vez absorvido, o HCB se liga a proteínas plasmáticas e se distribui pelo organismo e, a partir de então, vai se depositando nos tecidos gordurosos. A afinidade do HCB, como qualquer organoclorado, em diferentes partes do organismo, é determinada pela quantidade de gordura contida em cada um dos tecidos. Após uma exposição, o HCB pode ser detectado na circulação sanguínea até, aproximadamente, 45 dias. O HCB é biotransformado no fígado, pelas enzimas de oxidação NADPH-dependentes, em moléculas mais polares e é eliminado, principalmente, pelas fezes, e apenas uma pequena parte é excretada pela urina. A administração oral de gorduras inabsorvíveis aumenta o teor lipídico do bolo fecal, estimulando a eliminação do HCB pelas fezes (Toledo 2002).

O HCB tem sido relacionado com alguns casos de “porfiria cutânea tardia” (PCT), alterações no metabolismo de porfirina (excreção de porfirinas e precursores de porfirina foram aumentadas). Ezendam (2004) em estudos realizados com ratos comprovou que o gene responsável pelo metabolismo das porfirinas foi induzido quando os ratos foram expostos a uma dieta que continha HCB.

Em revisão sobre o HCB, Toledo (2002) descreve que o HCB é altamente tóxico para os peixes ($LC_{50}/96h$ 0,05-0,2 mg L⁻¹) e tem sido detectado em invertebrados, peixes, répteis e mamíferos em todo o mundo. Estudos de campo indicaram que a exposição ao HCB via alimento é importante para os organismos nos níveis tróficos mais elevados e têm sido observada biomagnificação. A concentração de HCB em crustáceos, peixes e aves marinhas apresentou-se de forma biomagnificada, na ordem de 1 a 3 vezes (Borga 2000). As propriedades bioacumulativas do HCB resultam da combinação de suas propriedades físico-químicas (alto coeficiente de partição octanol/água) e de sua lenta eliminação devido ao metabolismo limitado relacionado com sua alta estabilidade química. Geralmente os

organismos acumulam o HCB da água e do alimento, embora organismos bênticos também possam acumular HCB diretamente de sedimento (Gobas *et al.* 1989).

1.2. Poluentes orgânicos persistentes (POPs)

Os poluentes orgânicos persistentes são compostos organoclorados que foram intensamente produzidos a partir da década de 40, sendo considerados produtos sintetizados pelo homem que maior impacto causam no meio ambiente, devido basicamente a sua alta persistência no ambiente, resistência à degradação, capacidade de transporte a longas distâncias pela atmosfera e correntes marinhas, potencial de bioacumulação e biomagnificação. Os organoclorados possuem elevada solubilidade em lipídios e esta característica determina sua capacidade de biomagnificação, atingindo o topo da cadeia alimentar, o homem (Fernícola & Oliveira 2002).

Em 1995, o Conselho de Administração do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente - PNUMA - classificou 12 compostos orgânicos como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). São compostos orgânicos representados por compostos aromáticos e alicíclicos clorados. Foram reconhecidos pela comunidade internacional como POPs os seguintes compostos: Aldrin, Clordano, diclorodifeniltricloroetno (DDT), Dieldrin, Dioxinas, Endrin, Furanos, Heptacloro, Mirex, Bifenilas Policloradas (PCBs), Toxafeno e o hexaclorobenzeno (HCB) (Fernícola & Oliveira 2002, Breivik *et al.* 2004, Goerk *et al.* 2004, Guerzoni *et al.* 2007, Bais *et al.* 2008).

Em 2001, durante a convenção internacional sobre os POPs em Estocolmo na, Suécia, conhecida como Convenção de Estocolmo, foram criadas medidas de controle relacionadas à produção, importação, exportação, disposição e ao uso das substâncias classificadas como POP's. Esta Convenção foi elaborada ao longo de três anos de negociação e concluída em dezembro de 2004. Em

reunião diplomática realizada em maio de 2001, 92 países aderiram à Convenção, dentre eles o Brasil. Foi determinado que os governos promovessem as melhores tecnologias e práticas para a sua substituição, bem como previnam o desenvolvimento de novos POPs, e trabalhem com o objetivo de eliminação dos POPs ou restrição, nos casos em que tal meta seja inatingível, pelo menos em curto prazo (Fernícola & Oliveira 2002, Barber *et al.* 2005, Hirano *et al.* 2007).

Os POPs são usados ou aplicados em regiões tropicais e temperadas. Por serem ligeiramente voláteis, são transportados pelos ventos na forma gasosa até encontrarem temperaturas mais baixas. Quando isso ocorre, são condensados diretamente na superfície do solo ou nas partículas presentes em aerossóis, que serão depositadas posteriormente com a neve ou as chuvas. Na realidade, também ocorre evaporação nas regiões mais frias, e o transporte, pelas correntes de ar, dos pólos para as regiões tropicais equivale à corrente inversa. Mas, como a condensação e a deposição são favorecidas pelas baixas temperaturas, o balanço final desse processo é o transporte mais intenso dessas substâncias químicas na direção das regiões polares. O transporte dos POPs para as regiões polares pode se dar em uma ou várias etapas (efeito “gafanhoto”), e pode levar algumas décadas até que o produto químico seja degradado ou retirado de forma permanente (Figura 1). Como agravante quanto mais baixa temperatura, mais baixa a velocidade de biodegradação dos POPs, o que favorece o aumento da concentração desses poluentes nas regiões mais frias (Fernícola & Oliveira 2002, Schmid *et al.* 2007).

Segundo Fernícola & Oliveira (2002) em revisão sobre POPs, descrevem que tanto nas regiões distantes, assim como nas regiões onde foram usados e aplicados, os POPs entram nas cadeias alimentares e acumulam-se em peixes, aves, mamíferos marinhos e no homem. Um exemplo é o das mulheres da tribo Inuit (esquimós), na Groelândia e no Ártico canadense, que apresentam hoje uma concentração de Bifenilas Policloradas (PCBs) no seu leite muitas vezes superior ao das mulheres que vivem nos países industrializados. Medições recentes realizadas no lago Ontário mostraram que as Bifenilas Policloradas presentes nas suas águas com uma baixa concentração – duas partes por trilhão

(2ppt), estavam presentes no tecido gorduroso das gaivotas em uma concentração de cinquenta partes por milhão (50 ppm), o que significa uma magnificação biológica de 25 milhões de vezes.

Segundo estudos de Goerk *et al.* (2004) o HCB, o diclorodifeniltricloroetileno (DDE) e o mirex foram os POPs predominantes encontrados em amostras de peixes da Antártica analisadas entre 1986 e 2000, comprovando a persistências desses compostos, encontrados em uma região muito distante das fontes de emissão.



Figura 1: Processos de migração dos POPs

(Fonte: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa 2007)

1.3. Aplicação de fungos causadores de podridão branca em biorremediação

A biorremediação é uso de organismos vivos em tratamento de ambiente contaminado a fim de reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (Litchfield 2005).

Grande parte dos estudos de biorremediação utilizava bactérias pela facilidade que ofereciam para estudar suas vias metabólicas e utilizar construções genéticas que permitam degradar especificamente determinados compostos contaminantes. No entanto, algumas limitações restringem o uso de bactérias quando se tem condições de estresse ambiental, como baixos teores de nutrientes, baixos valores de pH, elevadas concentrações dos contaminantes. Além disso, as bactérias têm baixa eficiência na degradação de compostos solúveis em água, ou ligados ao solo, e seu sistema enzimático pode ser induzido somente na presença do contaminante. Sendo assim, níveis ainda indesejáveis do contaminante podem ser insuficientes para induzir a produção ou atividade das enzimas, diminuindo o processo de biodegradação (Matheus 1998, Moreno *et al.* 2004).

Os basidiomicetos causadores de podridão branca parecem ser os melhores microrganismos que possuem a capacidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até CO₂ e água. A lignina é um biopolímero tridimensional com alto peso molecular, amorfo, altamente ramificado, heterogêneo, com estrutura irregular. Apresenta subunidades as quais não se repetem regularmente e, também, não possuem ligações facilmente hidrolisáveis. Devido a essa característica, a molécula de lignina não é facilmente degradada, dependendo da ação de um conjunto de enzimas oxidativas extracelulares para iniciar o processo de transformação (Matheus & Okino 1998).

A degradação da lignina por fungos basidiomicetos ocorre por meio de reações intermediadas por um mecanismo, que começa com a subtração de um elétron de seu núcleo aromático, para formarem radicais catiônicos instáveis e, em seqüência, formam produtos de reações não enzimáticas, de radicais catiônicos com água e outros nucleófilos (Bumpus & Aust 1987, Bononi 1997, Pointing 2001, Hofrichter 2002, Ballaminut 2007).

Os nutrientes absorvidos pelos fungos, por meio de reações anabólicas e catabólicas, são convertidos em constituintes celulares e energia. Os nutrientes orgânicos obtidos de carboidratos são oxidados pela respiração e pela fermentação, produzindo reservas energéticas e estruturas de parede celular. A energia química que é liberada nesses processos envolve a perda de elétrons de um composto

para reduzir outro, o qual é denominado aceptor de elétrons. Na maioria dos fungos o aceptor final é o oxigênio. Os principais aceptores de elétrons de interesse na biodegradação são: o oxigênio para microrganismos aeróbios e nitrato, manganês, ferro, sulfato, dióxido de carbono e carbono orgânico para anaeróbios (Moore-Landecher 1996, Boopathy 2000, Matheus & Machado 2002).

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina por fungos basidiomicetos pode ser entendida como um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoreduktases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (Figura 2) (Leonowicz *et al.* 1999, Moreira-Neto 2006).

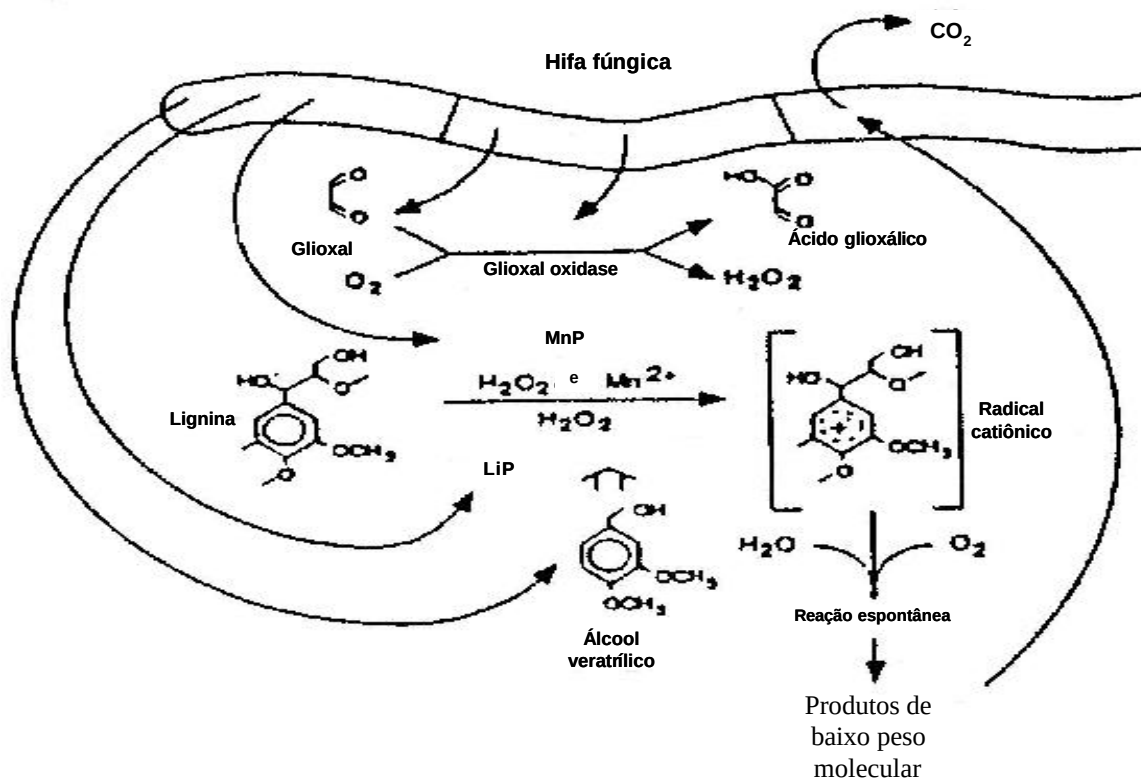


Figura 2: Esquema geral do processo de degradação da lignina por *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk 1993).

Inicialmente pensava-se que a capacidade dos basidiomicetos em degradar compostos xenobióticos devia-se à semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e as moléculas de alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os compostos aromáticos. Atualmente sabe-se que a capacidade biodegradativa de fungos de podridão branca deve-se à presença do sistema enzimático ligninolítico inespecífico, extracelular e de alto poder oxidante (Matheus & Okino 1998, Tuomela *et al.* 2000, Evans & Hedger 2001, Pointing 2001, Eerd *et al.* 2003).

Com o entendimento do mecanismo básico de degradação da lignina pelos fungos causadores de podridão branca e sua habilidade em transformar lignina em CO₂ e água, que se propôs que estes fungos poderiam ser utilizados para a degradação de poluentes ambientais, embora algumas observações da transformação de compostos aromáticos poluentes por fungos de podridão branca já datem de 40 anos atrás. Somente em meados da década de 80 foram apresentadas evidências de que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* tinha a capacidade de mineralizar DDT, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina), benzo(a)pireno, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) e algumas bifenilas policloradas (PCBs), bem como o pentaclorofenol (Bumpus & Aust, 1987, Barr & Aust 1994, Reddy *et al.* 1998, Reddy & Gold 2000, Pointing *et al.* 2001, Shim & Kawamoto 2002, Krishna 2005, Tortella *et al.* 2005).

Os basidiomicetos são utilizados amplamente em estudos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (POPs), tais como pesticidas clorados (DDT), dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina), bifenilas policloradas, hexaclorobenzeno, além de hidrocarbonetos aromáticos (benzo-*a*-pireno), pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Tais linhagens de fungos envolvidas na degradação destas moléculas incluem as espécies: *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (Matheus *et al.* 2000, Gugliotta 2001, Machado *et al.* 2005a, Vitali *et al.* 2006, Ballaminut 2007).

Aust (1990) e Eerd *et al.* (2003) listaram uma série de vantagens em utilizar fungos basidiomicetos em processos de biorremediação:

- Os fungos estão em contato direto com o solo, líquido ou porções de vapor do solo;
- São capazes de transformar um grande número de compostos com estruturas dissimilares;
- São capazes de diminuir o efeito tóxico de muitos xenobióticos;
- Libera metabólitos que podem ser degradados por outros microrganismos;
- O sistema enzimático sendo extracelular pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos e, portanto, pouco acessíveis à ação bacteriana;
- O sistema sendo inespecífico pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para a mistura deles;
- O sistema, sendo produzido em resposta a condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença de lignina ou do composto poluente;
- Este grupo de fungos possui vantagens competitivas quando materiais ligninocelulósicos são utilizados como fonte de carbono;
- A degradação da lignina ocorre até que sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis, onde o produto final é CO₂. Este é o tipo de processo desejável para os xenobióticos.

1.4. Processos químicos na degradação de organoclorados

A desalogenação, a oxidação, assim como a redução, promovem a conversão química do contaminante utilizando insumos como ozônio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cloro (Cl_2), permanganato de potássio ($KMnO_2$), ferro de valência zero, entre outros. Os processos químicos podem servir de etapa preliminar para a biorremediação, gerando compostos mais facilmente biodegradáveis. (Arruda 2005).

1.4.1. Oxidação química

Segundo Bosna *et al.* (2001) a oxidação química é um processo químico usado para remover halogênios (geralmente cloro) de um contaminante químico, pelo hidrogênio ou um radical contendo um doador de hidrogênio. Os halogênios são uma classe de elementos químicos que incluem cloro, bromo, iodo e flúor e são frequentemente considerados os mais importantes elementos químicos de caráter xenobiótico. Os compostos halogenados eram utilizados na produção de pesticidas, pois sua adição causa a toxicidade necessária para o controle das pestes (USEPA 1996).

A oxidação química tem sido frequentemente usada para tratar compostos aromáticos halogenados, incluindo bifenilas Policloradas (PCBs), dibenzo-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzo-furanos policlorados (PCDFs), clorobenzenos, fenóis clorados, pesticidas organoclorados, herbicidas halogenados e certos halifáticos halogenados (dibromo etileno, tetracloreto de carbono, clorofórmio e diclorometano), contidos em solo, lodo ou sedimento (Brunelle & Singleton 1983, Sabata *et al* 1993, Rahuman *et al.* 2000, Kastánek & Kastánek 2005).

A oxidação química com glicolato faz uso de um reagente chamado APEG. Este reagente consiste de duas partes: um hidróxido de metal alcalino (A) e um polietilenoglicol (PEG). O hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio são dois hidróxidos de metal alcalino comumente utilizados nos processos de oxidação com glicolato. Este processo consiste na mistura e aquecimento do solo com o reagente APEG. Durante o aquecimento o hidróxido de metal alcalino reage com o halogênio do

contaminante formando um glicol éter e/ou um composto hidroxilado, além de um sal de metal alcalino, que são subprodutos muito solúveis (Arruda 2005).

O processo de oxidação química com polietilenoglicol foi empregado com sucesso no tratamento de bifenilas policloradas (PCBs) em solo de três localidades dos Estados Unidos da América: Nova York, Massachusetts e Texas (Rahuman *et al.* 2000). Este processo também promoveu a destruição de dibenzo-dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzo-furanos policlorados (PCDFs) até níveis não-detectáveis de partes por bilhão (ppb).

A oxidação química pode também ser usada em conjunto com outras tecnologias, tais como a dessorção térmica a baixa temperatura, extração por solvente ou biodegradação. A integração de tratamento químico e biológico é comumente utilizada para remediação de solos contaminados com poluentes orgânicos (Miler *et al.* 1996, Eggen & Sveum 2001, Zang *et al.* 2007, Jung *et al.* 2008).

A oxidação química do HCB com polietilenoglicol pode ser considerada uma alternativa tecnológica para a redução do HCB presente em solos. Na perspectiva de identificar fungos basidiomicetos tolerantes aos produtos da oxidação química do HCB em solo, Silva *et al.* (2005) mostraram que, de quatro fungos testados, apenas *Trametes villosa* CCB 176 foi capaz de crescer satisfatoriamente no solo tratado quimicamente. A degradação de poluentes recalcitrantes, através do tratamento combinado de oxidação química e biodegradação, por basidiomicetos tem sido também avaliada para algumas moléculas como o DDT (Eggen & Sveum 2001).

1.5. Biodegradação de hexaclorobenzeno

Existem alguns estudos indicando a possibilidade de desalogenação redutiva de HCB. Fathepure *et al.* (1988) demonstraram que o HCB foi desalogenado a tri e diclorobenzeno em lodo de esgoto, sob condições anaeróbias. A desalogenação completa de 50 mg de HCB L⁻¹ (~190 µM) ocorreu

em três semanas. O HCB foi desalogenado por duas rotas diferentes. A principal rota foi a seguinte: HCB → pentaclorobenzeno → 1,2,3,5-tetraclorobenzeno → 1,3,5-triclorobenzeno. Mais de 90% do HCB inicial foi convertido a 1,3,5-triclorobenzeno, não se evidenciando a continuidade da desalogenação a partir desta última molécula.

Até recentemente, considerava-se improvável a biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos. Isto foi, em parte, devido ao trabalho realizado por Bumpus & Aust (1987), no qual se observou menos de 1% de mineralização de HCB por *Phanerochaete chrysosporium*. Tratava-se das primeiras evidências da capacidade de um fungo basidiomiceto degradar vários poluentes considerados, até então, recalcitrantes à biodegradação.

Estudos realizados na Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo, inseridos no projeto "Avaliação de fungos para a biorremediação de solos contaminados com resíduos organoclorados", desenvolvido mediante convênio entre o Instituto de Botânica, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo e a Rhodia do Brasil Ltda, avaliaram 125 linhagens de fungos quanto à taxa de crescimento, produção de enzimas ligninolíticas, capacidade de descoloração do corante antraquinônico Azul Brilhante de Remazol R (RBBR), tolerância a altas concentrações de HCB e pentaclorofenol (PCF) e capacidade de degradar e mineralizar estes poluentes. Machado (1998) selecionou 32 linhagens das 125 estudadas para aplicação em estudos de biodegradação de PCF em solo, dentre as 32 linhagens apenas 6 foram capazes de crescer em solo com 46000 mg PCF kg⁻¹ solo. No mesmo estudo Machado (1998) também observou que *Peniophora cinerea* CCB 204, *Psilocybe castanella* CCB 444 e *Trametes villosa* CCB 176 foram capazes de degradar até 80% do PCF presente no solo.

Matheus *et al.* (2000) observaram redução de até 25% de HCB durante crescimento de *Psilocybe castanella* CCB444 e *Lentinus crinitus* CCB274 em solo contendo 1.327 mg de HCB kg⁻¹, sem qualquer suplementação, com taxas de mineralização inferiores a 1%.

Muitas são as evidências de que os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico dos basidiomicetos são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos, e, portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos (Boyle 1995, Wu *et al.* 1996; Sandermann *et al.* 1998; Bakshi *et al.* 1999; Kadhim *et al.* 1999, Ullah *et al.* 2000).

Segundo Hofrichter (2002) nos processos de degradação da lignina e de poluentes orgânicos persistentes, certos co-oxidantes, tais como compostos sulfúricos orgânicos (L-cisteína) e ácidos graxos insaturados e seus derivados (ácido linoleico, Tween 80, por exemplo), são oxidados pelo sistema da peroxidase dependente do manganês (MnP) para formar radicais tióis e peroxilas, respectivamente, que são altamente reativos. Na presença de oxigênio, estes radicais podem atacar estruturas recalcitrantes da lignina, as quais não são normalmente abertas diretamente pelo sistema da MnP. Estes radicais também podem ser fontes de H₂O₂.

Este sistema de mediação, baseado nos ácidos graxos insaturados e seus derivados, tem sido proposto para explicar a ação da MnP na degradação de estruturas não-fenólicas da lignina. Este processo, que é conhecido como peroxidação de lipídios, é forte o bastante para quebrar ligações Cα-Cβ e éter β-arílicas em compostos diméricos não fenólicos de modelos de lignina (Kapich *et al.* 1999).

Os óleos vegetais e os surfactantes, como tween 20, podem servir como fontes de carbono para *Phanerochaete chrysosporium* e estimular a atividade ligninolítica (¹⁴C-lignina → ¹⁴CO₂). Além disso, os óleos vegetais e os surfactantes podem alterar a composição fosfolipídica e a permeabilidade das membranas celulares, facilitando as trocas entre a célula e o meio externo e, conseqüentemente a ação das enzimas produzidas (Asther *et al.* 1998, Leštan *et al.* 1990; 1993).

Matheus & Bononi (2002) otimizou as condições de cultivo *Psilocybe castanella* CCB444 e *Lentinus crinitus* CCB274, com a adição de ácidos graxos insaturados ao solo e observou aumento das taxas de mineralização de ¹⁴C-HCB em solo superiores a 20% após 56 dias de incubação. Dessa forma, os ácidos graxos insaturados, presentes no óleo de soja, podem ter intermediado a ação de peroxidases

produzidas por *P. castanella* e *L. crinitus* na mineralização do ^{14}C -HCB, através do sistema de peroxidação dos lipídios descrito por Hofrichter (2002). Sendo o HCB um composto muito estável quimicamente, é provável que o estímulo para tais reações oxidativas tenha sido o principal papel desempenhado pelos ácidos graxos presentes no óleo de soja.

Assim, o efeito da emulsão de óleo de soja em tween 20 sobre a mineralização de ^{14}C -HCB pode sugerir a ação conjunta destes compostos, promovendo maior crescimento fúngico, maior permeabilidade da membrana, maior difusão de oxigênio e produção de radicais altamente reativos capazes de quebrar o anel benzênico e transformá-lo até $^{14}\text{CO}_2$.

Suplementos ligninocelulósicos são comumente utilizados nos processos de tratamento de solos com basidiomicetos, quer sejam como veículos do inoculo fúngico, quer sejam como fonte suplementar de carbono para o crescimento do organismo (Lamar & Evans 1993).

Suplementação de nitrogênio, como adição de farinha de cereais, por exemplo, pode ser feita nos substratos e dependendo do fungo estudado, podendo melhorar seu crescimento (Matheus *et al.* 2000, Matheus & Bononi 2002). Matheus & Bononi (2002) em um estudo dirigido às relações C/N do substrato utilizado para *P. castanella* e *L. crinitus*, mostraram que a suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com farinha de soja e adição de óleo vegetal em níveis adequados interferiu, em alguns casos de forma positiva, na mineralização de ^{14}C -hexaclorobenzeno por esses fungos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a degradação do ^{14}C -hexaclorobenzeno por oxidação química e biológica, utilizando polietilenoglicol/hidróxido de sódio e *Trametes villosa* em solos contaminados com resíduos industriais.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a transferência de poluentes para atmosfera (compostos voláteis) durante o processo de tratamento químico do ^{14}C -HCB e a toxicidade aguda do solo após tratamento químico;
- Avaliar a biodegradação de ^{14}C -HCB por *Trametes villosa* em solo contaminado e os efeitos de um tratamento químico sobre a biodegradação dos organoclorados;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de ácidos graxos insaturados na biodegradação de ^{14}C -HCB por *Trametes villosa*; em solo tratado quimicamente;
- Avaliar a influência da relação C/N do solo na biodegradação de ^{14}C -HCB por *T. villosa*, em solo tratado quimicamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Solo

O solo contaminado com organoclorados, principalmente HCB, foi oriundo de áreas contaminadas na região de restinga do Distrito de Samaritá, São Vicente, SP. Encontra-se armazenado numa “Estação de Espera” às margens da rodovia Padre Manoel da Nóbrega km 67, em “mag-sacks” com capacidade de uma tonelada, controlada pela empresa Rhodia, sob supervisão da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB). O solo foi coletado com auxílio de trado, pelos técnicos credenciados para tal, com acompanhamento da equipe de pesquisa. A tabela 1 apresenta as características físico-químicas do solo estudado, que foram analisadas pelo laboratório “Lagro – Laboratório Agrônomo” S/C de Campinas, SP. As concentrações dos compostos organoclorados contaminantes do solo foram determinadas por cromatografia gasosa, nos laboratórios do Centro de Pesquisa da empresa Rhodia, localizado em Paulínia, SP (CPP/Rhodia) e estão discriminadas na tabela 2.

Tabela 1: Características físico-químicas do solo

Parâmetros analisados	Valores
pH	5,07
Capacidade de troca iônica (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,50
Saturação de bases (V%)	5,60
Matéria orgânica (%)	0,13
Acidez total [H ⁺] (mEq. 100 mL ⁻¹)	5,07
Alumínio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,13
Cálcio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,20
Magnésio (mEq. 100 mL ⁻¹)	0,10
Nitrogênio total (%)	0,06

Fósforo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,00
Potássio ($\text{mEq. } 100 \text{ mL}^{-1}$)	0,01
Enxofre ($\mu\text{g g}^{-1}$)	13,47
Sódio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3,67
Ferro ($\mu\text{g g}^{-1}$)	25,53
Manganês ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10
Cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10
Zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,37
Boro ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,10

Tabela 2: Análise quantitativa dos organoclorados do solo HCB

Organoclorados	Concentração (mg kg^{-1})
Pentaclorobenzeno	2.560
Hexaclorobenzeno	22.050

3.2. Aplicação de ^{14}C -HCB ao solo

Ao solo contaminado (350g solo seco) foi aplicada uma solução de HCB radiomarcado uniformemente em todos os carbonos do anel benzênico (^{14}C -UL-HCB), com atividade específica de $11,46 \text{ GBq mL}^{-1}$, 97% de pureza, adquirido da “International Isotopes München” (Alemanha). A solução de ^{14}C -HCB foi preparada em hexano p.a. (Merck) para garantir a incorporação de $1,11 \text{ kBq g}^{-1}$ de solo-HCB.

A radioatividade da solução foi determinada em espectrômetro de cintilação em líquido, no laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico - SAA, adicionando-se $10 \mu\text{L}$ de

solução ^{14}C -HCB em 10,0 mL de solução cintiladora (Mesquita & Ruegg 1984, Matheus & Bononi 2002, Vitali *et al.* 2006), composta por:

- 4,0 g de POP (2,5-Difenil-oxazol),
- 0,2 g de POPOP [2,2'-?-fenillenbis-(5-feniloxazol)]
- 660 mL de Tolueno p.a.,
- 340 mL de Renex (40%)

Alíquota de 10 g de solo foi colocada em placa de petri, onde 11,2 mL da solução de ^{14}C -UL-HCB foram gotejados sobre o solo e homogeneizados até a completa evaporação do hexano. O solo com ^{14}C -HCB incorporado foi misturado ao restante do solo e homogeneizado por agitação manual dentro de um saco plástico de polipropileno, durante 15 min, para garantir uma boa distribuição do composto radiomarcado em toda a massa de solo.

3.3. Diluição e determinação da radioatividade inicial do solo ^{14}C -HCB

Após a incorporação da solução de ^{14}C -HCB ao solo, foi pesada a mesma quantidade (peso seco) de solo não contaminado e incorporado ao solo ^{14}C -HCB e homogeneizado por agitação manual dentro de um saco plástico de polipropileno, durante 15 min. Foram pesadas 5 alíquotas de 0,5 g cada e submetidas à incineração em combustor “Biological Oxidizer” OX-600, com incineração de 3 minutos. O CO_2 produzido durante a combustão foi capturado em solução de metanol : monoetanolamina : solução cintiladora na proporção 2.0:2.4:5.6 (v/v) e sua radioatividade determinada em espectrômetro de cintilação em líquido (Packard LS 1600). A radioatividade medida por grama de solo serviu de base para os cálculos de recuperação da radiação inicial aplicada ao solo experimento utilizando apenas o solo ^{14}C -HCB (Matheus & Bononi. 2002, Vitali *et al.* 2006).

3.4. Oxidação química do ^{14}C -HCB presente no solo

Após a incorporação da solução de ^{14}C -HCB ao solo, o mesmo foi submetido à oxidação química através da adição ao solo, com base no peso seco do solo, 4% de polietilenoglicol 400 (PEG), 3,5% Etanol e 10% Hidróxido de Sódio (NaOH) sólido em escamas (peso seco). O solo foi colocado em um frasco erlenmeyer com capacidade para 1000 mL e a adição de cada reagente foi realizada em três etapas seguidas de agitação manual durante 3 minutos. O solo tratado permaneceu no escuro durante 44 dias no escuro e então submetido à neutralização com ácido sulfúrico.

3.5. Determinação dos compostos ^{14}C -voláteis e $^{14}\text{CO}_2$ durante a oxidação química do solo ^{14}C -HCB

Na boca do erlenmeyer utilizado para a oxidação química do ^{14}C -HCB foi encaixado um sistema fechado para a captura de possíveis compostos $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis gerados durante a oxidação química do ^{14}C -HCB (Figura 3).

O sistema de captura de gases continha duas armadilhas com 20 mL cada de etilenoglicol monometil éter para captura de ^{14}C -compostos voláteis, e duas armadilhas com 20 mL cada de solução de Hidróxido de Potássio (KOH) 0,1N para captura de $^{14}\text{CO}_2$.

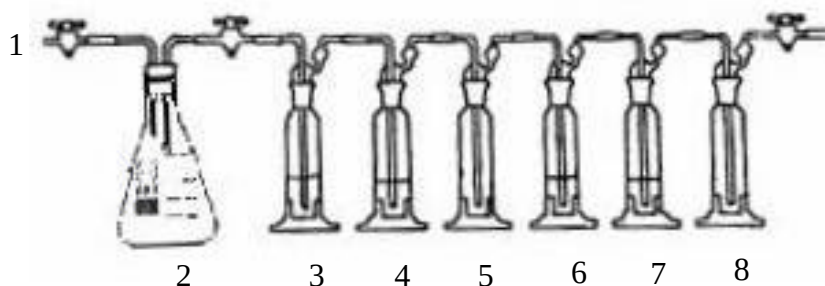


Figura 3: Sistema fechado para captura de compostos $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis. 1- Bomba de vácuo, 2 – Erlenmeyer com solo ^{14}C -HCB, 3 e 4 KOH 0,1 M, 5 e 8 frasco vazio para evitar refluxo, 6 e 7 etilenoglicol monometil éter
(Fonte: Marcondes & Andréa 2001)

A troca das armadilhas foi feita diariamente durante a primeira semana de tratamento e duas vezes por semana no período posterior, até completar 44 dias de oxidação. Antes da troca das armadilhas, um fluxo de ar comprimido não esterilizado foi injetado no interior do frasco, durante 20 minutos, para garantir a troca do ar. Duas alíquotas de 1 mL de cada armadilha foram colocadas em frascos de cintilação, contendo 20 mL de solução cintiladora e sua radioatividade determinada em espectrômetro de cintilação em líquido (Packard LS 1600). A radioatividade medida por grama de solo serviu de base para os cálculos de recuperação da radiação inicial aplicada ao solo.

3.6. Neutralização do pH do solo após oxidação química

3.6.1. Determinação do pH inicial do solo

Foram retiradas duas alíquotas de 3g cada do solo ^{14}C -HCB oxidado e transferidas para frascos com capacidade de 250 mL, onde foram adicionados 100 mL de água destilada, e agitados

manualmente durante 3 minutos. O pH foi medido utilizando-se papel indicador universal de pH (MERCK).

3.6.2. Determinação do mili equivalente do NaOH

Após mensurar o pH foram adicionadas às amostras 3 gotas de solução de fenolftaleína 1% e tituladas contra solução de HCl 0,5N. O mEq do NaOH em 3g de solo foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{mEq NaOH} = \text{Volume gasto de HCl} \times \text{FC (fator de correção da solução de HCl)}$$

Após calculado o mEq do NaOH, foi calculado a quantidade de ácido sulfúrico (H_2SO_4) para neutralizar 3g de solo, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Massa de H}_2\text{SO}_4 = \text{mEq NaOH} \times \text{massa molecular H}_2\text{SO}_4$$

Com o volume de H_2SO_4 definido para a neutralização do solo ^{14}C -HCB oxidado, ele foi despejado em 4 porções, homogeneizando-as durante 5 min cada. Após a mistura do H_2SO_4 foram retiradas 2 amostras de 3 g cada e adicionados 100 mL de água destilada e o pH foi medido com o auxílio de pHmetro (TECNAL), para monitorar o pH, até atingir o valor desejado por volta de 6,0.

3.7. Diluição e determinação da radioatividade inicial do solo ^{14}C -HCB oxidado

A diluição do solo tratado quimicamente e a determinação da radioatividade inicial foram feitas de acordo com o item 3.3.

3.8. Capacidade máxima de retenção de água (CMRA)

A CMRA dos solos (^{14}C -HCB e ^{14}C -HCB oxidado) foi determinada colocando-se 100g dos sistemas de cultivo do fungo (solo + gesso) em um funil revestido com papel de filtro, previamente umedecido com água destilada, e encaixado sobre uma proveta. Lentamente, foram adicionados aos sistemas 100 mL de água destilada. Esperou-se que toda água em excesso escoasse para a proveta, e determinou-se a CMRA pela diferença entre o volume de água adicionado e o coletado na proveta (Vitali 2004).

3.9. Fungo

O basidiomiceto *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel é um fungo lignícola, neotropical, comumente encontrado no Brasil, já foi citado para os estados do Amazonas, Roraima, Amapá, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Gugliotta & Bononi 1999). *Trametes villosa* CCB176 pertence à Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. *T. villosa* CCB 176 foi selecionado entre 36 espécies de basidiomicetos em estudos de biorremediação, por apresentar tolerância a altas concentrações de pentaclorofenol (PCF), e por ser capaz de reduzir cerca de 60% sua concentração em solo (Matheus *et al.* 2000, Machado *et al.* 2005a). Além disso, em estudo realizado por Silva *et al.* (2005) de três linhagens avaliadas *T. villosa* foi a única a se desenvolver em solo contendo

tetraclorodietoxibenzeno (produto da oxidação química do HCB). A cultura foi mantida em tubo inclinado com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sob refrigeração a 4°C. A figura 4 mostra o basidioma de *T. villosa* CCB 176 crescido sobre tronco.



Figura 4: *Trametes villosa* CCB 176, crescido sobre tronco
(Foto: Adriana de Mello Gugliotta, 1997)

3.10. Inóculo fúngico

Bagaço de cana-de-açúcar picado foi misturado com farinha de soja e amido de milho na relação carbono e nitrogênio (C/N) 90, e a umidade ajustada, com água destilada, até aproximadamente 70% da capacidade máxima de retenção de água. A mistura foi distribuída em sacos de polipropileno

com capacidade para 500 mg, onde foram colocadas 100g da mistura e esterilizados durante 90 min, 121 °C em autoclave, adaptado de Ballaminut & Matheus 2007.

T. villosa CCB 176 foi previamente crescido em placas de petri contendo meio de cultura de extrato de malte e ágar (MEA 2%), a 28 °C, até que o micélio ocupasse $\frac{3}{4}$ da superfície do meio. Foram retiradas da borda de cada colônia fúngica discos de 5 mm de diâmetro e transferidos, em condições assépticas, para o substrato sólido esterilizado na proporção de 1:10 (disco: g de substrato úmido). Os sacos foram fechados e o inóculo foi incubado em estufa incubadora (ELETROLAB / 101 STD) durante 21 dias na ausência de luz com temperatura controlada a 28 ± 2 °C.

3.11. Ajuste da relação carbono/nitrogênio (C/N) do inóculo fúngico e do solo ^{14}C -HCB oxidado

Para ajustar a relação C/N do inóculo fúngico para 90 e do solo ^{14}C -HCB oxidado contendo gesso comercial, óleo de soja e tween 20 para 30, 80, 160 e 320 foram determinadas as quantidades do carbono orgânico total e nitrogênio total.

3.11.1. Determinação do carbono orgânico

A determinação de carbono orgânico foi feita segundo metodologia descrita por Kiehl (1985), em que a matéria orgânica foi oxidada por uma mistura sulfo-crômica, numa reação exotérmica de bicromato de potássio e ácido sulfúrico. O excesso de agente oxidante, resultante da reação, foi determinado por titulação com sulfato ferroso.

Reagentes:

- solução de bicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 M,

- ácido fosfórico a 85%,
- solução de difenilamina (0,5g de difenilamina em 20 mL de água destilada e 100 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado,
- solução de sulfato ferroso 0,5M (recém preparada)

Cálculo estequiométrico do carbono: alíquotas de 0,2 g de solo seco e inóculo fúngico, em quintuplicata, foram transferidas para frascos erlenmeyer com capacidade de 500 mL, onde foram adicionados 20 mL de K₂Cr₂O₇ e 40 mL de H₂SO₄ concentrado. Após agitação magnética por 1 min, e repouso de 30 min, foram adicionados 200 mL de água destilada, 10 mL de ácido fosfórico e 1 mL de difenilamina. O excesso de oxidante foi titulado com solução de sulfato ferroso até ponto de viragem de cor púrpura para o verde.

O cálculo estequiométrico da porcentagem de carbono orgânico foi feito pela fórmula abaixo:

$$C\% = \frac{(V1 - V2) \times 0,003 \times 74,15}{p}$$

Onde:

C%= porcentagem de carbono orgânico,

V1= volume (mL) de K₂Cr₂O₇ adicionado na amostra,

V2= volume (mL) de sulfato ferroso gasto na titulação,

p= peso seco da alíquota (g).

3.11.2. Determinação do nitrogênio total

A determinação do nitrogênio total foi feita conforme descrita por Kiehl (1985), pelo método de Kjeldahl, com adaptações feitas pelo laboratório de Ecologia do Instituto de Botânica, onde se realizou

a digestão ácida da amostra, na presença de catalisadores, seguida de destilação, em meio alcalino, do sulfato de amônio formado.

3.11.2.1. Digestão sulfúrica

Reagentes da mistura de digestão:

- 350 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30%,
- 14,0 g de sulfato de lítio ($\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$),
- 0,42 g de selênio em pó,
- 420 mL de H_2SO_4 concentrado.

Preparo da mistura de digestão: todos os reagentes foram misturados em Becker com capacidade de 2000 mL e resfriados em banho de gelo, o H_2SO_4 foi o último reagente a ser acrescentado, sendo misturado cuidadosamente, também resfriado em banho de gelo.

Foram pesadas 5 alíquotas de 0,27g de solo e inoculo fúngico (peso seco) em tubos de digestão de 100 mL, onde foram acrescentados 8 mL da mistura de digestão fria. Os tubos foram levados para um bloco de digestão (MOD 40-25) e aquecidos lentamente até o máximo de 350°C. Nos primeiros 15 minutos de reação as amostras ficaram claras e transparentes, escurecendo em seguida e voltando a clarear quando a temperatura atingiu os 350°C, após atingir essa temperatura, continuou-se a digestão por mais 30 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, completou-se o volume do tubo até 100 mL, com água destilada.

3.11.2.2. Destilação

Reagentes:

- 10 mL de ácido bórico (H_3BO_3) 10%,

- 2 gotas de indicador misto (0,5% verde de bromo cresol + 0,1% vermelho de metila, diluídos em etanol 95%)
- 15 mL de solução de NaOH 18N padronizado com ácido oxálico;
- Solução de HCl 0,05N, padronizado com NaOH previamente padronizado.

O sistema de destilação foi aquecido até aproximadamente 100°C. Um frasco erlenmeyer de 150mL, contendo 10mL do ácido bórico e 2 gotas do indicador, foi colocado na saída do destilador (TECNAL / TE-036/1). O tubo contendo a amostra digerida foi acoplado à entrada do destilador, onde juntou-se 15mL de NaOH (18N). A amostra foi destilada até que a amônia destilada fosse transferida para a solução receptora de ácido bórico, triplicando seu volume. Após a destilação, a amostra foi titulada com HCl 0,05 N padronizado até o ponto de viragem do indicador.

3.12. Preparo dos solos contaminados para tratamento biológico

Foi adicionado ao solo contaminado com ^{14}C -HCB e ao solo tratado quimicamente (^{14}C -HCB oxidado) 2,5% (peso seco) de gesso comercial. Para o teste de diferentes relações C/N do solo tratado quimicamente foi adicionado ao solo, 1,46g de sulfato de amônia para ajustar a relação C/N para 30 e 50,83g e 166,35g de amido solúvel para ajustar a relação C/N para 160 e 320, respectivamente. Os solos foram homogeneizados por agitação manual em saco plástico de polipropileno, durante 15 min e esterilizados com brometo de metila, em câmara vedada, por 48h. A adição da emulsão de óleo vegetal foi feita após a esterilização, no momento da inoculação do fungo no solo.

3.13. Condições de cultivo e biodegradação dos organoclorados

3.13.1. Influência dos ácidos graxos na biodegradação por *Trametes villosa* CCB 176 de ^{14}C -HCB e ^{14}C -HCB oxidado

Após a esterilização e a determinação da quantidade de radiocarbono aplicado aos solos ^{14}C -HCB e ^{14}C -HCB oxidado, 30,0 g de solo (peso seco) foram colocados em frascos erlenmeyer com capacidade para 250 mL com boca esmerilhada, e a umidade foi ajustada com água destilada esterilizada para 50% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) de cada solo, de acordo com Matheus (2003). Em cada tratamento, foram incorporados 6 g (peso seco) de inóculo fúngico e uma emulsão de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p), nas concentrações de 0, 2,5 e 5,0% de emulsão por peso de solo seco. Como controles foram montados, para cada tratamento, frascos com substrato do inóculo esterilizado, sem fungo, em triplicata. O solo foi homogeneizado com bastão de vidro esterilizado e o peso total do frasco foi anotado. Na boca de cada frasco foi encaixada uma coluna de vidro contendo cal sodada e espuma de poliuretano para captura de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos orgânicos voláteis (Anderson 1990) (Figura 5).

Os frascos foram incubados por 112 dias em sala com temperatura controlada a $28\pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, e a umidade do solo foi corrigida semanalmente por gravimetria.

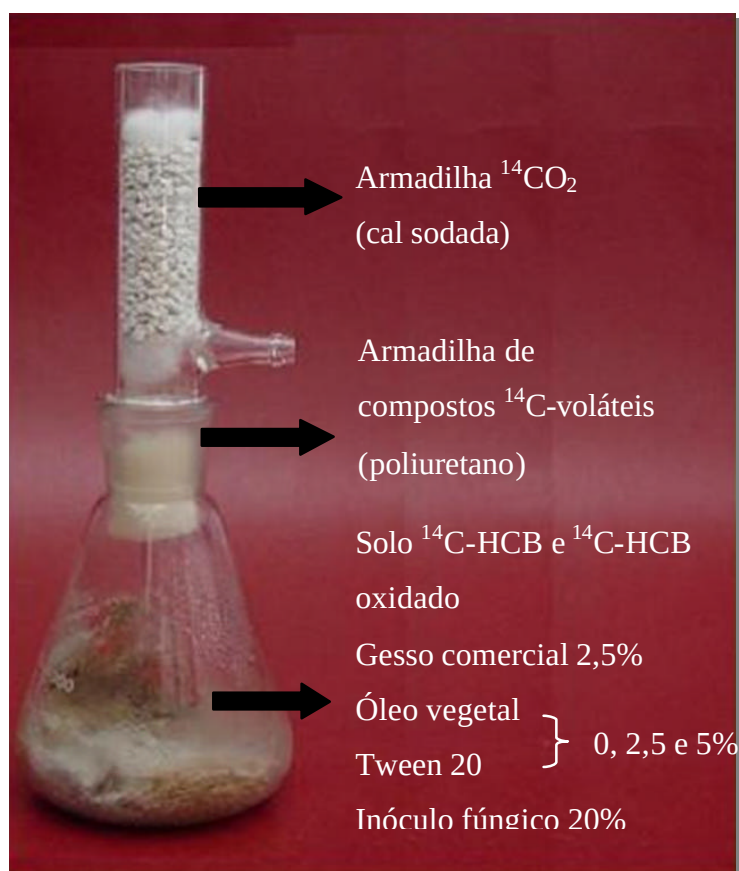


Figura 5: Sistema de incubação de *T. villosa* CCB176 inoculado em solo contaminado com ^{14}C -HCB e ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes concentrações de óleo vegetal adicionados ao sistema de cultivo, com armadilhas para captura de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis

3.13.2. Influência das diferentes relações C/N do solo na biodegradação por *Trametes villosa* CCB 176 de solo ^{14}C -HCB oxidado

A montagem do experimento de influência da relação C/N do solo na biodegradação de ^{14}C -HCB oxidado por *Trametes villosa* CCB 176 foi feito de acordo com o item 3.13.1. O solo utilizado foi o solo tratado quimicamente (^{14}C -HCB oxidado) com relação C/N 30, 80, 160 e 320 e foi incorporado

ao sistema de cultivo apenas 5% de uma emulsão (por peso de solo seco) de óleo de soja comestível e tween 20, na proporção de 9:1 (p/p) (Figura 6).

Os frascos foram incubados por 84 dias em sala com temperatura controlada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, e a umidade do solo foi corrigida semanalmente por gravimetria.

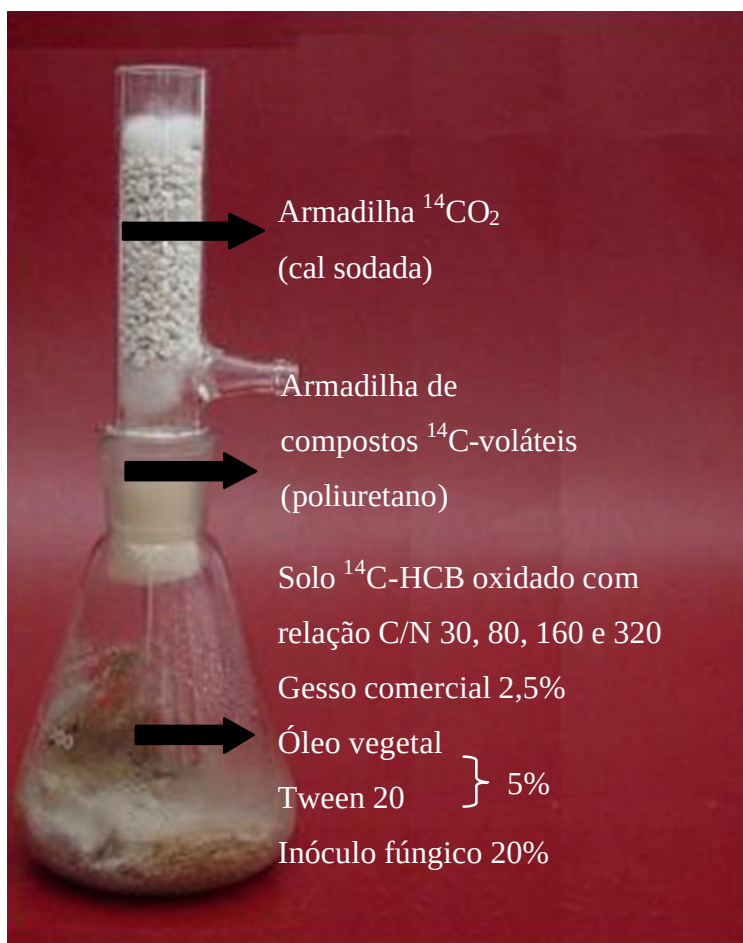


Figura 6: Sistema de incubação de *T. villosa* CCB176 inoculado em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado com diferentes relações C/N, com armadilhas para captura de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis

3.14. Mineralização do ^{14}C -HCB e ^{14}C -HCB oxidado

A porcentagem de radiocarbono mineralizado a partir dos tratamentos foi determinada pela quantificação de $^{14}\text{CO}_2$ produzido e capturado nas armadilhas de cal sodada, aos, 7, 14, 28, 56, 84 e 112 dias após a incubação (Vitali 2004). Antes da troca das armadilhas, um fluxo de ar comprimido não esterilizado foi injetado no interior de cada frasco, durante 10 minutos, para que todo ar fosse trocado, passando pela cal sodada e pela espuma de poliuretano. As armadilhas foram armazenadas em sacos plásticos de polietileno, em geladeira a 4°C, para posterior extração do $^{14}\text{CO}_2$ capturado.

A cal sodada de cada armadilha foi transferida para frasco kitassato com capacidade de 500 mL, onde foram injetados em sistema fechado 20 mL de ácido clorídrico fumegante (6N), sob agitação magnética. O gás produzido no sistema borbulhou em uma série de dois tubos lavadores, contendo 20 ml de solução metanol : monoetanolamina (7:3 v/v). Duas alíquotas de 1,0 mL de cada tubo lavador foram transferidas para frascos de cintilação com 10 mL de solução cintiladora. O radioatividade de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido foi determinado em espectrômetro de cintilação em líquido. A porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ recuperado nesta fase foi calculada com base na radioatividade inicialmente aplicada em 30 g de solo seco.

3.15. Extração dos compostos ^{14}C -voláteis

A porcentagem de compostos ^{14}C -voláteis foi quantificada pela determinação de outros gases diferentes de CO_2 produzidos durante a biodegradação e capturados nas armadilhas de poliuretano, aos 7, 14, 28, 56, 84 e 112 dias após a incubação

De acordo com Nakagawa *et al.* (1995), a espuma de poliuretano de cada armadilha foi transferida para frascos com capacidade de 30 mL, com tampa de rosca de teflon, onde foram adicionados 20 mL de n-hexano (grau pesticida), garantindo que toda a espuma ficasse mergulhada no

solvente. Após 48h a espuma foi retirada do frasco com o auxílio de uma pinça de aço e o volume recuperado foi anotado. Duas alíquotas de 1,0 mL de cada frasco foram transferidas para frascos de cintilação com 10 mL de solução cintiladora. A radioatividade de compostos ^{14}C -voláteis capturados pela espuma e extraídos pelo solvente foi determinada em espectrômetro de cintilação em líquido. A porcentagem de ^{14}C -voláteis nesta fase também foi calculada com base na radioatividade inicialmente aplicada em 30 g de solo seco.

3.16. Extração dos ^{14}C -resíduos solúveis em solvente orgânico

Após o período de incubação, foram feitas as extrações dos compostos solúveis em solvente orgânico (^{14}C -compostos extraíveis) e quantificados os ^{14}C -resíduos não extraíveis.

Foram retiradas seis alíquotas de 3,0 g do conteúdo do frasco. Determinou-se o peso seco das amostras, em triplicata, por termogravimetria, utilizando-se termo-balança.

A extração dos ^{14}C -compostos remanescentes no solo após os tratamentos foi feita por microondas, de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001) e modificado. Três alíquotas de 3 g de cada frasco de incubação foram transferidas para frascos de 30 mL com tampa de rosca teflon. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução acetona : n-hexano (25:75, v/v.). Os frascos foram colocados dentro do microondas de forma simétrica e aquecidos por 16 ciclos de 41 segundos a 240 watts de potência. A cada ciclo os frascos foram resfriados em banho de gelo para evitar fervura e perda da amostra por volatilização. Após resfriamento, a fase n-hexano foi removida com uma pipeta pasteur, o volume recuperado foi medido e transferido para outro frasco de 30 mL. Duas alíquotas de 1,0 mL do extrato foram transferidas para frascos de cintilação com 10 mL de solução cintiladora e a radioatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação em líquido. A porcentagem de radiocarbono recuperado nesta fase foi calculada com base na radioatividade inicial aplicada em 30 g

de solo seco. O restante dos extratos foi guardado em freezer a -18°C para posterior análise cromatográfica.

3.17. Determinação dos compostos ^{14}C -resíduos não extraíveis ou ligados

Após a remoção de ^{14}C -compostos solúveis em n-hexano (descrita no item 3.15), os solos foram secos em capela de exaustão de ar até a completa evaporação dos solventes e então homogeneizados até completa trituração dos fragmentos de bagaço de cana de açúcar presentes nas amostras. Duas alíquotas de 0,5 g da mistura de solo foram transferidas para pequenos envelopes de papel de seda e levadas para combustão. O $^{14}\text{CO}_2$ produzido foi capturado em armadilha de metanol : monoetanolamina : solução cintiladora na proporção 2,0:2,4:5,6 (v.v.). A radioatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação em líquido. A porcentagem de ^{14}C -resíduos não extraíveis foi calculada com base na radioatividade inicial aplicada em 30 g de solo seco.

3.18. Recuperação do radiocarbono

A porcentagem de recuperação do radiocarbono foi calculada pela soma das porcentagens de ^{14}C recuperados nas diferentes amostras como: $^{14}\text{CO}_2$, ^{14}C -compostos voláteis, ^{14}C -compostos extraíveis e ^{14}C -resíduos não extraíveis, após o período de incubação.

3.19. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

As análises quantitativas e qualitativas dos organoclorados foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian CP-3800) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2200), equipado com detector FID, injetor split/splitless e coluna VF-5ms (VARIAN) composta por 5% Difênil e 95% Dimetil Polisiloxano (30m x 0.25mm x 0,25µm). O gás de arraste foi hélio com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com modo split de 50 vezes. A temperatura de operação foi de 260 °C no injetor. O programa de temperatura da coluna foi 100°C durante 1:00 min, aumentou 4 °C min⁻¹ até 230°C, permanecendo por 34:30 min nessa temperatura e por fim aumentou 35 °C min⁻¹ até 280 °C permanecendo por 4 min. As amostras analisadas foram originárias dos extratos dos ¹⁴C-compostos solúveis, diluídas 10 vezes em n-hexano (UV-análise de resíduo da Merk) e filtradas em filtro millex HV 13mm (ns f-slip da Millipore). A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo a uma mistura de padrões que incluía: HCB, pentaclorobenzeno (PeCB) e pentacloroanisol (PCA). A quantificação dos organoclorados nas amostras de solo foi calculada sobre concentrações definidas que formam a curva padrão de cada composto. Para a identificação dos compostos utilizou-se a biblioteca de dados NIST. A quantificação dos compostos resultantes da oxidação química, que não possuíam curva padrão de concentrações conhecidas, foi realizada com base na curva padrão do HCB e corrigida proporcionalmente ao peso molecular do composto.

3.20. Toxicidade aguda do solo

O teste foi realizado segundo “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals” (*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. 202, 2004) e USEPA/USACOE (1991), nos laboratórios do Centro de Pesquisas da Rhodia do Brasil, em Paulínia. A amostra foi preparada transferindo os compostos contaminantes presentes nos solos (¹⁴C-HCB e ¹⁴C-HCB oxidado) para a água. Para tal, foi medido em proveta 25 mL da amostra (solo seco) e adicionado 100 mL de água de

represa. A mistura foi submetida à agitação por 30 min e posterior centrifugação a 3786 rpm por 30 min. A fase líquida superior denominada elutriato foi cuidadosamente retirada e considerada como a solução 100% usada diretamente no teste. Para a realização do teste, quatro réplicas de cinco animais foram expostas às seguintes concentrações de elutriato da amostra: 0,01%; 0,04%; 0,16%; 0,63%; 2,5%; e 10,00%. A concentração efetiva inicial mediana após 48 horas de exposição (CE(I) 50; 48h) e respectivo intervalo de confiança foram estimados através do método binomial (Stephan 1977). A CE(I) 50; 48h do elutriato da amostra, nas condições de teste, foi estimada em 0,32%, com intervalo de confiança de 0,16 a 0,63%.

3.21. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico MiniTab versão Release 15. As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey sempre protegida por análise de variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$). Os dados percentuais foram transformados de acordo com a fórmula abaixo (Vieira & Hoffmann 1989).

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \sqrt{\text{valorem\%} / 100}$$

Onde:

Arcsen = arcoseno

valor % = valor percentual dos compostos recuperados

Artigo I

Oxidação química de ^{14}C -hexaclorobenzeno em solo arenoso contaminado com resíduos organoclorados utilizando polietilenoglicol e NaOH

Marina Bianchini de Salvi^{1, 2*}, Vera Maria Valle Vitali¹, Ricardo Ribeiro da Silva^{1,2}, Rosmary de Nadai⁴, Amilcar Machulek Junior⁴, Dácio Roberto Matheus¹

¹Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo;

²Pós-graduanda em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

³Rhodia do Brasil;

⁴Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA/USP)

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Micologia e Liquenologia, Av. Miguel Estéfano, 3687, São Paulo, CEP: 04301-012, Brazil. Tel.: (+5511) 50736300 (R 311). E-mail: ma_bianchini@hotmail.com

Resumo

O hexaclorobenzeno (HCB) é um composto organoclorado, extremamente persistente e está distribuído no meio ambiente em virtude de sua mobilidade e sua resistência à degradação. Devido a essas características foi considerado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um dos 12 poluentes orgânicos mais persistentes (POPs) que devem ser banidos do planeta. Este trabalho avaliou a degradação do ^{14}C -HCB em solo arenoso por oxidação química utilizando NaOH e polietilenoglicol, sua distribuição nas diferentes fases (gasosa e sólida), bem como a toxicidade do solo tratado. Ao solo contaminado com HCB ($17.290 \text{ mg kg}^{-1}$) e pentaclorobenzeno (1.730 mg kg^{-1}) foi adicionado 4% polietilenoglicol, 3,5% etanol e 10% NaOH. O solo foi tratado durante 44 dias, seguida de neutralização do pH com ácido sulfúrico. Durante o período de oxidação do ^{14}C -HCB não foi observada formação de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis. A oxidação química promoveu a degradação de cerca de 83% do pentaclorobenzeno e 85% do HCB, transformando-o principalmente em tetraclorodietoxibenzeno (TCDB) e seus isômeros, 1,2,4 tricloro-5-etoxibenzeno, 1,2,3,5 tetracloro-4-etoxibenzeno (TCEB) e pentacloroetoxibenzeno (PCEB). Foi observado um aumento considerável da toxicidade aguda do lixiviado do solo para *Daphnia* sp, exigindo assim pós-tratamento para melhoria das condições do solo.

Palavras chaves: oxidação química, HCB, polietilenoglicol, hidróxido de sódio

Abstract

Hexachlorobenzene (HCB) is an organochlorinated compound, extremely persistent and is distributed in the environment due to its mobility and resistance to degradation. Due to these characteristics it was considered by the United Nations Environmental Programme as one of the 12

most persistent organic pollutants (POPs) that must be banished from the planet. This work had as objective to evaluate the degradation of ^{14}C -HCB in sandy soil by chemical oxidation utilizing NaOH and polyethylene, its distribution in the different phases (gas and solid) and the toxicity of treated soil. The oxidation of HCB (17290 mg kg^{-1}) e pentaclorobenzeno (1.730 mg kg^{-1}) in soil was made with 4% polyelthyleneglycol, 3,5% ethanol and 10% NaOH. Soil was treated during 44 days, followed by neutralization with sulfuric acid. During HCB oxidation period it was not observed formation of $^{14}\text{CO}_2$ and volatile ^{14}C -compounds. The chemical oxidation promoted the degradation of about 83% of pentachlorobenzene and 85% of HCB, transforming it mainly into tetrachlorodiethoxybenzene (TCDB) and its isomers, 1,2,4 trichloro-5-ethoxybenzene, 1,2,3,5 tetrachloro-4-ethoxybenzene (TCEB) and pentachloroethoxybenzene (PCEB). It was observed a considerable increase of the acute toxicity of the lixiviated soil, demanding a post-treatment of the soil for improvement of its conditions.

Keywords: chemical oxidation, HCB, polyelthyleneglycol, sodium hydroxide

Introdução

O Hexaclorobenzeno (HCB) é um composto orgânico sintético, que foi amplamente utilizado como fungicida no tratamento de sementes, especialmente trigo, cevada, aveia e centeio. É extremamente persistente no ambiente devido à sua baixa solubilidade, baixa reatividade e seu alto teor de cloro. Por estas características foi considerado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um dos 12 poluentes orgânicos mais persistentes (POPs) que devem ser banidos do planeta (Toledo 2002, Matheus *et al.* 2000, Ezendam *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2007).

O pico de produção do HCB foi ao final da década de 70 e começo da década de 80, quando a produção anual mundial foi de 10.000 ton.ano⁻¹ de 1978 a 1981 (Barber *et al.* 2005, Hirano *et al.* 2007). Embora a produção de HCB tenha sido proibida em alguns países, estima-se que mundialmente 23 toneladas de HCB sejam introduzidas no ambiente todo ano. Dessas 23 toneladas emitidas anualmente, 6,5 correspondem à sua aplicação como pesticida, 9,5 como sub-produto da fabricação de outros compostos clorados e 7 são provenientes de combustão de compostos clorados (Bailey 2001, Barber *et al.* 2005).

No Brasil, o HCB foi produzido como resíduo do processo industrial de produção do tetracloreto de carbono, um desengraxante bastante utilizado na indústria metalúrgica e é o principal composto organoclorado presente nos solos contaminados da Baixada Santista, São Paulo, que é uma das regiões mais industrializadas do Brasil (Matheus 2003, Vitali 2004).

Já se passaram quase 20 anos desde a proibição da fabricação do HCB em alguns países e, contudo, devido à sua persistência, as taxas de redução do HCB no ambiente são muito lentas. Além disso, grandes quantidades de HCB ainda estão estocadas em vários países, incluindo Estados Unidos da América, Japão e Brasil (Miyoshi *et al.* 2004). Por estes motivos há necessidade emergencial de desenvolver novos métodos de degradação do HCB ou aperfeiçoar os já existentes, que não produzam compostos tóxicos durante o processo.

Métodos para transformação de HCB já foram descritos por muitos autores, eles incluem, irradiação (Zang *et al.* 2007), fotodegradação (Chu *et al.* 2002); incineração (Jan Stach *et al.* 1999), desalogenação redutiva (Rosenbrock 1997, Pavlostathis *et al.* 2002, Brahushi *et al.* 2004, Hirano *et al.* 2007), biodegradação (Matheus *et al.* 2000, Matheus & Bononi 2002, Matheus 2003), entre outros. Contudo, a utilização de oxidação química tem mostrado resultados muito significativos no tratamento não só do HCB, mas de outros compostos, como: bifenilas policloradas, DDT e tetracloroetileno, com taxas de redução de até 99% (Miyoshi *et al.* 2004, Kastaék & Kastaék 2005, Eggen & Sveum 2001, Mesquita 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do ^{14}C -hexaclorobenzeno por oxidação química em solo arenoso utilizando NaOH e polietilenoglicol, sua distribuição nas diferentes fases (gasosa e sólida), bem como a toxicidade do solo tratado.

Material e Métodos

Solo: utilizou-se solo contaminado com organoclorados, principalmente HCB, oriundo de áreas contaminadas na região de restinga do Distrito de Samaritá, São Vicente, SP. Este solo encontra-se armazenado numa “Estação de Espera”, em área controlada, às margens da rodovia Padre Manoel da Nóbrega Km 67, em “mag-sacks” com capacidade de uma tonelada. O solo tem como características 98% areia, pH 5,07, capacidade de troca iônica de 5,50 mEq. 100 mL⁻¹, 0,13 de matéria orgânica, 0,06 nitrogênio, 1,00 µg g⁻¹ fósforo e 0,01 mEq. 100 mL⁻¹ potássio, determinadas pelo laboratório “Lagro – Laboratório Agrônômico” S/C de Campinas. As concentrações dos compostos organoclorados contaminantes do solo no momento da coleta da amostra eram de 22050 mg HCB e 2560 mg PeCB g⁻¹ solo.

Tratamento com ^{14}C -HCB: à amostra de solo contaminado (350g) foi aplicada uma solução de HCB radiomarcado uniformemente em todos os carbonos do anel benzênico (^{14}C -UL-HCB), com atividade específica de $11,46 \text{ GBq mmol}^{-1}$, 97% de pureza, adquirido da “International Isotopes München” (Alemanha). A solução de ^{14}C -HCB foi preparada em hexano p.a. (Merck) para garantir a incorporação de $1,11 \text{ kBq g}^{-1}$ de solo.

Determinação da radioatividade do solo: foram pesadas 5 alíquotas de 0,5 g de solo ^{14}C -HCB e submetidas à combustão durante 3 minutos. O $^{14}\text{CO}_2$ produzido foi capturado em armadilha de metanol : monoetanolamina : solução cintiladora (2.0:2.4:5.6 v/v). A radioatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação em líquido (ECL), em aparelho Packard LS 1600.

Oxidação química do ^{14}C -HCB presente no solo: após a incorporação da solução de ^{14}C -HCB em 350g de solo, foi adicionado ao solo 4% de polietilenoglicol 400 (PEG), 3,5% Etanol e 10% Hidróxido de Sódio (NaOH) sólido em escamas (com base peso de solo seco). O solo foi colocado em frasco erlenmeyer com capacidade para 1000 mL e cada reagente foi adicionado em três etapas seguidas de agitação manual durante 3 minutos. O solo permaneceu durante 44 dias em repouso na ausência de luz. Ao final dos 44 dias foram pesadas três alíquotas de 3,0 g de solo para extração dos organoclorados e 5 alíquotas de 0,5 g para determinação da radiatividade residual. Após tratamento, o pH do solo foi corrigido para 6,0 com adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) fumegante e novamente foram determinadas as radiatividades residuais.

Captura dos compostos ^{14}C -voláteis e $^{14}\text{CO}_2$ durante a oxidação química do ^{14}C -HCB: na boca do erlenmeyer utilizado para a oxidação química do ^{14}C -HCB foi encaixado um sistema fechado para a captura de possíveis compostos $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -voláteis gerados durante o tratamento.

O sistema de captura de gases continha duas armadilhas com 20 mL cada de etilenoglicol monometil éter para captura de ^{14}C -compostos voláteis e duas armadilhas com 20 mL cada de

solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M para captura de $^{14}\text{CO}_2$.

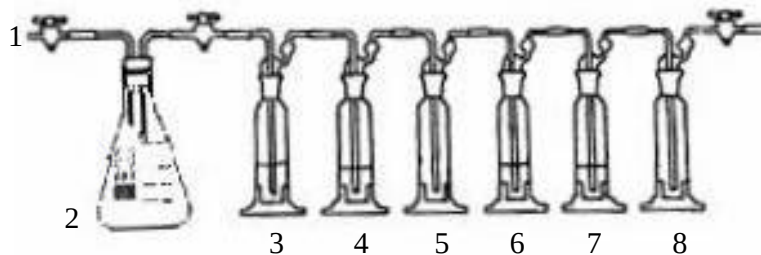


Figura 1: Sistema fechado para captura de compostos $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis. 1- Bomba de vácuo, 2 – Erlenmeyer com solo ^{14}C -HCB, 3 e 4 solução de KOH 0,1 M, 5 e 8 frasco vazio para evitar refluxo, 6 e 7 etilenoglicol monometil éter. (Fonte: Marcondes & Andrea 2001)

A troca das armadilhas foi feita diariamente durante a primeira semana de tratamento e duas vezes por semana no período posterior, até completar 44 dias. Antes da troca das armadilhas, um fluxo de ar comprimido não esterilizado foi injetado no interior do frasco, durante 20 minutos, para garantir a troca de toda a atmosfera de ar. Duas alíquotas de 1 mL de cada armadilha foram colocadas em frasco de cintilação, contendo 20 mL de solução cintiladora composta por tolueno, PPO (2,5-Difeniloxazol) e POPOP (1,4-bis2-(5-feniloxazolil)-benzeno), como descrito por Mesquita & Ruegg (1984) e sua radioatividade determinada em espectrômetro de cintilação em líquido (ECL) (Packard LSI 600). A radioatividade medida por grama de solo serviu de base para os cálculos de balanço de massa.

^{14}C -compostos extraíveis: a extração dos ^{14}C -compostos remanescentes no solo foi feita por microondas, de acordo com método descrito por Andrea *et al.* (2001) modificado. Alíquotas de 3 g de cada etapa do tratamento foram colocadas em frascos com capacidade para 30 mL, onde foram adicionados 10 mL de solução acetona : n-hexano (25:75, v/v.). Os frascos foram aquecidos por 16 ciclos de 41 segundos a 240 watts de potência. A cada ciclo os frascos foram resfriados em banho de gelo para evitar fervura e perda da amostra por volatilização. Após resfriamento, a fase n-

hexano foi removida com uma pipeta pasteur, o volume recuperado foi medido.

Cromatografia gasosa e espectrometria de massa: as análises quantitativas e qualitativas dos organoclorados foram realizadas em cromatógrafo a gás (Varian CP-3800) acoplado a um espectrômetro de massa (Varian Saturn 2200), equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor split/splitless e coluna VF-5ms (VARIAN) composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polisiloxano (30m x 0.25mm x 0,25µm). O gás de arraste foi hélio com um fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com modo split de 50 vezes. A temperatura de operação foi de 260°C no injetor. O programa de temperatura da coluna foi 100°C durante 1:00 min, aumentou 4 °C min⁻¹ até 230°C, permanecendo por 34:30 min nessa temperatura e por fim aumentou 35 °C min⁻¹ até 280 °C permanecendo por 4 min. As amostras analisadas foram originárias dos extratos dos ¹⁴C-compostos solúveis, diluídas 10 vezes em n-hexano (UV-análise de resíduo da Merk) e filtradas em filtro millex HV 13mm (ns f-slip da Millipore). A identificação individual dos compostos foi baseada no tempo de retenção relativo a uma mistura de padrões que incluía: HCB, pentaclorobenzeno e pentacloroanisol. A quantificação dos organoclorados nas amostras de solo foi feita usando a curva padrão construída para cada composto. Para a identificação dos compostos utilizou-se a biblioteca de dados NIST. A quantificação dos compostos que não possuíam padrão analítico foi calculada proporcionalmente ao peso molecular do HCB com base na curva padrão deste composto.

Toxicidade aguda do solo: o teste foi realizado segundo “OECD Guidelines for the Testing of Chemicals” (*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. 202, 2004) e USEPA/USACOE (1991), nos laboratórios do Centro de Pesquisas da Rhodia do Brasil, em Paulínia. A amostra foi preparada transferindo os compostos contaminantes presentes nos solos (¹⁴C-HCB e ¹⁴C-HCB oxidado) para a água. Para tal, foi medido em proveta 25 mL da amostra (solo seco) e adicionado 100 mL de água de represa. A mistura foi submetida à agitação por 30 min e posterior centrifugação a 3786 rpm por 30 min. A fase líquida superior denominada elutriato foi

cuidadosamente retirada e considerada como a solução 100% usada diretamente no teste. Para a realização do teste, quatro réplicas de cinco animais foram expostas às seguintes concentrações de elutriato da amostra: 0,01%; 0,04%; 0,16%; 0,63%; 2,5%; e 10,00%. A concentração efetiva inicial mediana após 48 horas de exposição (CE(I) 50; 48h) e respectivo intervalo de confiança foram estimados através do método binomial (Stephan 1977). A CE(I) 50; 48h do elutriato da amostra, nas condições de teste, foi estimada em 0,32%, com intervalo de confiança de 0,16 a 0,63%.

Resultados e discussão

A radioatividade aplicada inicialmente foi de 1,15 kBq g⁻¹ de solo contaminado com HCB. Este valor de radioatividade serviu de base para todos os cálculos de desprendimento de ¹⁴CO₂ e ¹⁴C-compostos voláteis, bem como a determinação de compostos ¹⁴C- extraíveis e ¹⁴C-resíduos não extraíveis.

Durante o processo de oxidação química do ¹⁴C-HCB não foi observada a formação de ¹⁴CO₂. A porcentagem de ¹⁴C-compostos voláteis registrada não foi significativa, sendo inferior a 2,5% da radioatividade inicialmente aplicada ao solo. Como este valor é menor que o grau de impureza do composto radiomarcado (3%), não foi possível inferir que houve a produção de ¹⁴C-compostos voláteis oriundos do ¹⁴C-HCB.

Ao final dos 44 dias da oxidação química do ¹⁴C-HCB foi realizada a neutralização do pH do solo com ácido sulfúrico concentrado. Durante a correção do pH não foi observada a formação de ¹⁴CO₂ e ¹⁴C-compostos voláteis.

As taxas de recuperação da radioatividade aplicada inicialmente ao solo permaneceram dentro dos limites estabelecidos pelo método (Tabela 1), entre 80 e 120% da radiação inicial aplicada ao solo (Anderson 1990).

Tabela 1 Radiocarbono recuperado nas diferentes frações, oriundas da oxidação química do ^{14}C -HCB em solo (%)

Etapas da oxidação química do ^{14}C -HCB	radioatividade recuperada (%)				
	Fração do ^{14}C -recuperado				
	$^{14}\text{CO}_2$	^{14}C - voláteis	^{14}C -extraíveis	^{14}C -não extraíveis	Total
Solo ^{14}C -HCB oxidado	0,0	2,40	95,99	1,5	99,89
Solo ^{14}C -HCB oxidado e neutralizado	0,0	0,0	94,02	5,97	99,99

Radioatividade inicial aplicada ao solo ^{14}C -HCB: 1,15 kBq g⁻¹ de solo contaminado

Na tabela 2 estão apresentadas as concentrações dos compostos organoclorados presente no solo antes e depois da oxidação química do HCB. Antes do tratamento químico o solo contaminado continha apenas HCB e PeCB (Figura 2A). As concentrações iniciais dos compostos organoclorados do solo eram de aproximadamente 17291 mg HCB kg⁻¹ e 1738 mg PeCB kg⁻¹. A oxidação química promoveu a degradação de cerca de 83% do PeCB e 85% do HCB, transformando-o principalmente em tetraclorodietoxibenzeno (TCDB) e seus isômeros, 1,2,4 tricloro-5-etoxibenzeno, 1,2,3,5 tetracloro-4-etoxibenzeno (TCEB) e pentacloroetoxibenzeno (PCEB) (Figura 2B), estes três últimos compostos apresentaram similaridade com compostos modelos da biblioteca NIST superior a 85% (Figura 2B). No entanto, outros compostos foram detectados com índices de similaridade inferiores a 50%, sendo eles: tetraclorohidroquinona, 5,6,7,8 tetracloroquinoxaline, 2,3,5 triclorofenol-6-metóxi,4-hidroxi e 3,4,6 tricloropirocatecol.

Tabela 2: Compostos organoclorados do solo (µg g⁻¹) determinados ao final de cada etapa da oxidação química do HCB

Etapas do processo de oxidação química	Concentração dos organoclorados µg g ⁻¹				
	HCB	PeCB	TCDB	PCEB	1,2,3,5 TCEB
Solo HCB	17291,22±151,9	1738,06±16,72	nd	nd	nd
Solo HCB oxidado	3539,54±291,2	194,11±20,96	10859,59±233,4	558,18±97,6	1013,14±146,5
Solo HCB oxidado e neutralizado	2644,24±214,9	146,469,83	8419,78±586,5	638,25±26,9	994,57±46,0

HCB = hexaclorobenzeno; PeCB= Pentaclorobenzeno, TCDB = Tetraclorodietoxibenzeno; PCEB = pentacloroetoxibenzeno; TCEB = 1,2,3,5 Tetracloro-4-etoxibenzeno, nd= não detectado

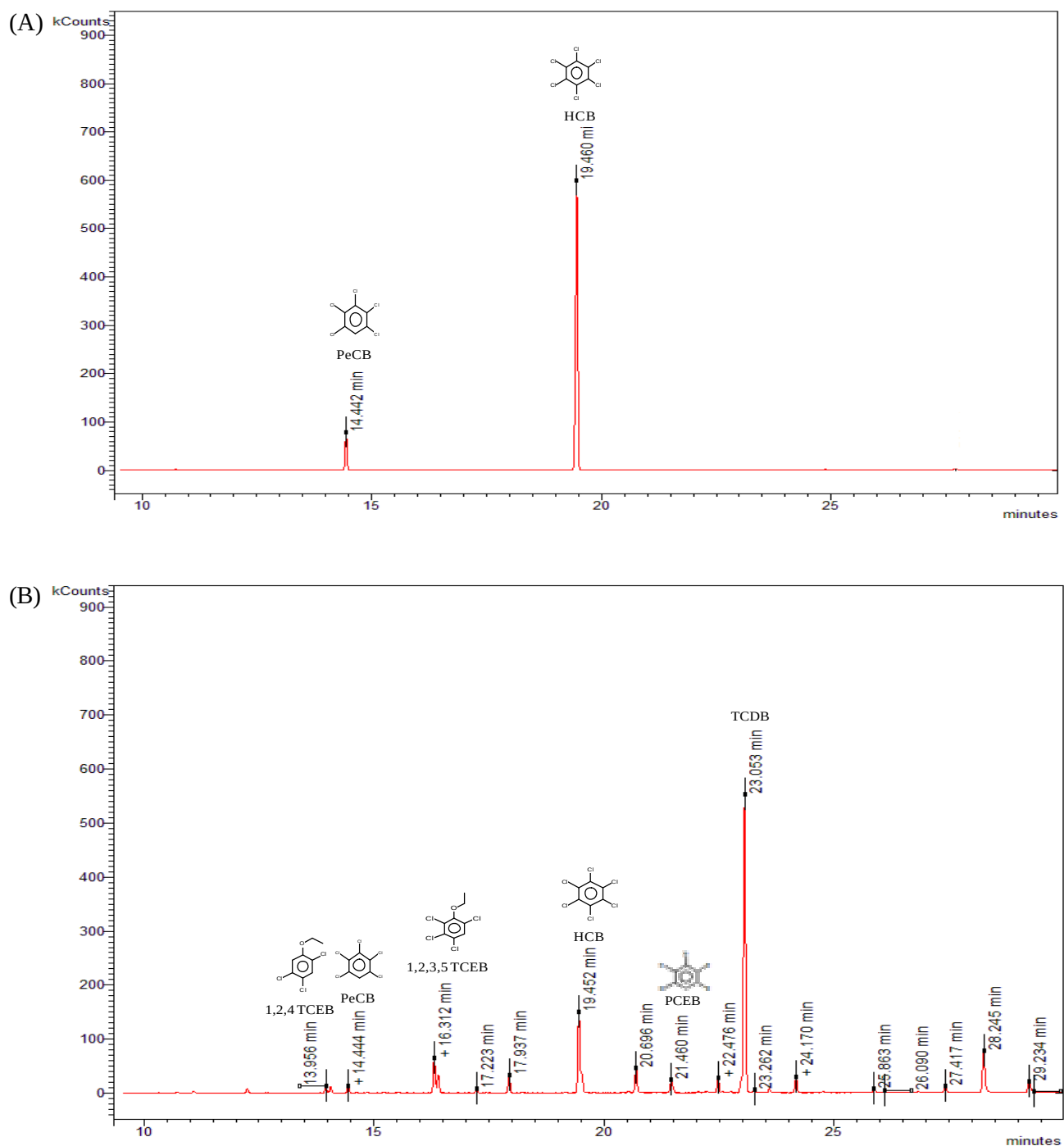


Figura 2: Cromatogramas dos extratos do solo antes e após a oxidação química do ^{14}C -HCB, (A): solo HCB, (B): solo HCB oxidado e neutralizado. (HCB = hexaclorobenzeno; PeCB= Pentaclorobenzeno, TCDB = Tetraclorodietoxibenzeno; PCEB = pentacloroetoxibenzeno; 1,2,3,5 TCEB = 1,2,3,5 Tetracloro-4-etoxibenzeno, 1,2,4 TCEB = 1,2,4 Tricloro-5-etoxibenzeno)

Sabe-se que durante o processo de oxidação o NaOH reage com os átomos halogênicos do

HCB formando um glicol éter e/ou um composto hidroxilado, além de um sal de metal alcalino, que são subprodutos muito solúveis (Arruda 2005). A formação de produtos com radical etóxi (C_2H_5O) deve-se ao uso do etanol. Visando otimizar o processo em escala industrial economicamente viável De Nadai (dados não publicados) realizou estudo de degradação de HCB com a substituição total ou parcial do PEG-400 por outros reagentes mais baratos. Vários reagentes foram testados, porém não foram obtidos resultados significativos. Entretanto, a substituição parcial de PEG-400 por etanol mostrou-se viável. O etanol atua como reagente, substituindo alguns átomos de Cl por radicais etóxi, e conseqüentemente há uma economia do polietilenoglicol. A substituição total do PEG por etanol não causa oxidação, tal fato já foi observado por Brunelle & Singleton (1983) em estudos de degradação com bifenilas policloradas (PCBs).

Com a análise das porcentagens do radiocarbono recuperado, pode-se observar que houve uma conservação da massa dos produtos de oxidação do HCB durante o tratamento químico (Tabela 1). Também foi possível observar a mesma conservação de massa dos organoclorados determinados pela cromatografia (Tabela 2), sugerindo, portanto que os produtos da oxidação química do HCB e PeCB são, em grande parte, constituídos apenas pelos compostos clorados identificados.

A utilização de oxidação química com polietilenoglicol na degradação de compostos organoclorados foi empregada com sucesso no tratamento de bifenilas policloradas (PCBs) em solo de três localidades dos Estados Unidos da América. As concentrações diminuíram consideravelmente, de $45.000 \mu g g^{-1}$ para $2 \mu g g^{-1}$. Este processo também promoveu a destruição de dibenzo-dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzo-furanos policlorados (PCDFs) até níveis não-detectáveis de partes por bilhão (ppb) (Rahuman *et al.* 2000). Kastaék & Kastaék (2005) também obtiveram resultados significativos, 97,3% de degradação de bifenilas policloradas ($1.900 mg kg^{-1}$), utilizando polietilenoglicol e hidróxido de potássio (KOH), porém em meio líquido. Brunelle & Singleton (1983) estudaram degradação de PCB's, em meio líquido, com polietilenoglicol de diferentes pesos moleculares com NaOH ou KOH. Os autores observaram 100% de degradação de PCBs com a utilização do PEG-350 juntamente com o KOH. Nenhuma degradação foi observada

com a ausência do PEG e o KOH foi mais eficiente na degradação em comparação com o NaOH. Em estudo de degradação de PCBs com polietilenoglicol e KOH Sabata *et al.* (1993) também observaram taxa de degradação de 99%. Em que pese saber-se que o KOH é mais eficiente que o NaOH na oxidação, este último foi por nós utilizado, em virtude dos custos no eventual aumento de escala do processo de tratamento. Além disso, a eficiência do NaOH pode ser melhorada em condições de alta umidade no solo (Arruda 2005).

A degradação quase que total de HCB por tratamento químico, porém sem a utilização do polietilenoglicol foi observada por alguns autores como Miyoshi *et al.* (2004) e Ma *et al.* (2005).

A oxidação química de HCB por uma solução combinada de sódio e potássio promoveu uma taxa degradação de 99,99% do HCB, com a retirada de todos os cloros da molécula, que se tornaram íons de cloro inorgânicos (Miyoshi *et al.* 2004). Ma *et al.* (2005) registraram degradação de 98% do HCB, por uso de uma combinação de óxido de cálcio e óxido de ferro em meio líquido, com a formação principalmente de tetraclorobenzenos e seus isômeros, triclorobenzenos e pentaclorobenzeno.

A maioria dos trabalhos de degradação química de compostos organoclorados foi realizada em meio líquido. Se compararmos as taxas de degradação obtidas neste trabalho (85% para HCB e 83% para PCB) com as observadas por outros autores (Miyoshi *et al.* 2004, Mesquita 2004, Kastaék & Kastaék 2005, Ma *et al.* 2005), podemos afirmar que a oxidação química do HCB com NaOH e polietilenoglicol é de uma técnica eficaz e eficiente para degradação de HCB em solo, uma vez que o solo é considerado um sistema muito heterogêneo e complexo.

O solo contaminado antes do tratamento químico apresentou CE 50 de $27,59 \pm 3,44$ para *Daphnia* sp. e após a oxidação química a toxicidade aumentou, apresentando CE 50 de $0,35 \pm 0,04$. Embora a oxidação química do HCB por polietilenoglicol e NaOH tenha apresentado uma porcentagem de degradação muito significativa, pode-se observar que há um aumento considerável na toxicidade do solo após tratamento químico. O aumento da toxicidade no solo pode estar relacionado com o aumento nas concentrações dos compostos clorados solúveis em água derivados

da oxidação química do HCB. Tal fato indica a necessidade de um pós-tratamento para diminuição da toxicidade aguda do solo e otimização nas taxas de degradação.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a oxidação química do HCB pode vir a ser usada como um pré-tratamento de áreas contaminadas, pois não forma compostos voláteis, fato extremamente interessante para processos de biorremediação de solos, não transferindo o poluente para outra parcela ambiental. Porém, melhores resultados de degradação ou até mesmo mineralização poderão ser obtidos caso a técnica de biorremediação, utilizando fungo basidiomiceto, seja aplicada após a oxidação química, uma vez que a redução do número de cloros da molécula de HCB o tornará mais biodisponível para o fungo e consequentemente contribuirá para o aumento da taxa de degradação.

Agradecimentos

Agradecemos a Rhodia do Brasil e a Fundação para o Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária – FUNDEPAG, pelo suporte financeiro, a CAPES pela concessão de bolsa, ao Instituto de Botânica de São Paulo e Instituto Biológico e ao Dr. André Ferraz pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Referências Bibliográficas

- Anderson, J. P .E.** 1990. Principles of an assay systems for biodegradation. Advance in Apllied Biotechnology Series 4: 129-145.
- Andrea, M. M, Papini, S. & Nakagawa, L. E.** 2001. Otimizing microwave-assited solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Environmental Science and Health 36 (1): 87-93.
- Arruda, T. L.** 2005. Uso de processos oxidativas avançados e ferro elementar na remediação de água subterrânea contendo compostos organoclorados. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 172p.
- Bailey, R.E.** 2001. Global hexachlorobenzene emissions. Chemosphere 43: 167–182.
- Barber, J. L., Sweetman, A. J., Wijk, D. V. & Jones, K. C.** 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. Science of the Total Environment 349: 1-44.
- Brahushi, F., Dörfler, U., Schroll, R. & Munch, J. C.** 2004. Stimulation of reductive dechlorination of hexachlorobenzene in soil by inducing the native microbial activity. Chemosphere 55: 1477-1487.
- Brunelle, D. J. & Singleton, D. A.** 1983. Destruction/Removal of polychlorinated biphenyls from non-polar media. Reaction of PCB with poly (ethylene glycol)/KOH. Chemosphere 12 (2): 183-196.
- Chu, W., Hunt, J. R. & Jafvert, C. T.** 2002. Modeling the sequential photodechlorination of hexachlorobenzene in surfactant micelles. Water Research 36: 843-850.
- Eggen, T. & Sveum, P.** 2001. DDT degradation by chemical oxidation and white rot fungi. *In: Ex situ biological treatment technologies.* Magar, V.S.; von Fahnstock, F.M.; Leeson, A. (eds.). Columbus: Battelle Press 157-164.
- Ezendam, J., Staedtler, F., Pennings, J., Vandebriel, R. J., Pieters, R., Harleman, J. H. & Vos,**

- J. G.** 2004. Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in brown norway rats. *Environmental Health Perspectives* 112 (7): 782-791.
- Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R.** 2007 Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzenes in river sediment. *Chemosphere* 67: 428-434.
- Jan Stach, V. P., Endrst, R. & and Hetflejs, J.** 1999. Dechlorination of hexachlorobenzene on mwi fly ash. *Chemosphere* 39 (14): 2391-2399.
- Kastánek, F. & Kastánek, P.** 2005. Combined decontamination processes for wastes containing PCB's. *Journal of Hazardous Materials B117*: 185-205.
- Ma, X., Zheng, M., Liu, W., Qian, Y., Zhao, X. & Zhang, B.** 2005. Synergic effect of calcium oxide and iron (III) oxide on the dechlorination of hexachlorobenzene. *Chemosphere* 60: 796-801.
- Marcondes, M. A. & Andréa, M. M.** 2001. Comportamento de [^{14}C]-2,4 D em solo como parâmetro de influência de aplicação de outros pesticidas. *Inn XV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas*, Maracaibo - Venezuela.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ^{14}C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Monterey, CA, Paper 2B-10.
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- Mesquita, A. C.** 2004. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 158p.

- Mesquita, T. B. & Ruegg, E. F.** 1984. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. *Ciência e Cultura* 36: 446-450.
- Miyoshi, K., Nishio, T., Yasuhara, A., Morita, M. & Shibamoto, T.** 2004. Detoxification of hexachlorobenzene by dechlorination with potassium–sodium alloy. *Chemosphere* 55: 1439-1446.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.** 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction. *In* Section 2: Effects on Biotic Systems, Test nº 202. p.1-12.
- Pavlosthatis, S. G., Prytula, M. T. & Yeh, D. H.** 2002. Potencial and limitations of microbial reductive dechlorination for bioremediation applications. *Water, Air and Soil Pollution* 3: 117-129.
- Rahuman, M., Pistone, L., Trifiró, F. & Miertus, S.** 2000. Destruction technologies for polychlorinated biphenyls (PCB's). ICS (International Centre for Science and High Technology) – Unido Publications, Padriciano 99, 34102 Trieste, Itália.
- Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F. & Munch, J. C.** 1997. Initiation of ³⁶C-Hexachlorobenzene dechlorination in three different soils under artificially induced anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 115-120.
- Sabata, S., Friesova, A., Rericha, R. & Hetflejs, J.** 1993. Limits to use of KOH/PEG method for destruction of PCB liquids of Czechoslovak production. *Chemosphere* 27 (7): 1201-1210.
- Stephan, C.E.** 1977. Methods for calculating an LC50. *In*: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: First Symposium*. ASTM -STP. Mayer, F. L. & Hamelink, J. L. (eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials. 634p.
- Toledo, H. H. B.** 2002. Hexachlorobenzene. *In*: *Poluentes Orgânicos Persistentes*. Fernícola, N. A. G. G.; Oliveira, S. S.– Salvador : CRA, v.13, cap.10, pág.385-416, 2002 (Série Caderno de Referência Ambiental).
- U.S. Environmental Protection Agency.** 1991. Evaluation of dredged material proposed for

ocean disposal CERCLA, EPA/503/8-91/001.

Vitali, V. M. V. 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.

Yuan, S., Shu, Z., Wan, J. & Lu, X. 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 167-175.

Zhang, J., Zheng, Z., Luan, J., Yang, G., Song, W., Zhong, Y. & Xie, Z. 2007. Degradation of hexachlorobenzene by electron beam irradiation. *Journal of Hazardous Materials* 142: 431–436.

Até o final da década de 1990 considerava-se

Material e Métodos

Solo: utilizou-se solo contaminado com organoc

A oxidação química do HCB promoveu a degr

por *T. villosa* sem a adição de óleo vegetal foi de 6,4%, tanto no tratamento fúngico quanto no seu controle, evidenciando a influência apenas do óleo vegetal na formação desses compostos (Figura

apenas entre os tratamentos inoculados com *T. villosa* e os seus respectivos controles, em quaisquer das dosagens de óleo vegetal utilizadas, evidenciando novamente a ação de controle de *B. brassicae* sob a influência de *T. villosa*.

grandes e era visível a existência de bagaço de cana-de-açúcar ainda não degradado no solo, após os 112 dias de incubação. Assim, parte do ¹⁴C-HCB aplicado ao solo pode ter se ligado aos materiais

dos solos é responsável pela adsorção da maioria dos compostos, principalmente os hidrofóbicos,

Biodegradação do HCB e produtos de sua oxidação

Após o período de incubação de

similarsaui5Pra todos os

Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R. 2007. Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzene in river se

solo contaminado. Arquivos do Instituto Biológico 72 (2): 255-260.

Nakagawa, L. E., Luchini, L. C., Musumecceci, M. R. & Andrea, M. M.

sols brasileiros condições e laboratório

Environmental Chemicals in Soil, Plants and Aquatic System. Mansour, M. Lewis Publishers,
Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1-22.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hexaclorobenzeno tem recebido muita atenção por ter sido considerado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio ambiente (PNUMA) como um poluente orgânico persistente (POP), devido aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente e por apresentar grande resistência à degradação. Em consequência à grande quantidade de HCB, que ainda podemos encontrar nos ambientes aquático, marinho e terrestre, mesmo depois da proibição da sua fabricação, há a necessidade de se desenvolver técnicas que reduzam significativamente as suas concentrações no ambiente ou até mesmo sua degradação em compostos inócuos como CO₂, água e sais inorgânicos.

Neste estudo foram avaliadas três técnicas de degradação de HCB, são elas: oxidação química; biodegradação por fungo basidiomiceto *Trametes villosa*, e a associação de tratamentos químico e biológico, bem como a adição de ácidos graxos insaturados ao sistema de cultivo do fungo e a variação da relação C/N do solo.

Com os resultados obtidos no capítulo I podemos afirmar que a oxidação química do HCB com NaOH e polietilenoglicol trata-se de uma técnica eficaz e relativamente eficiente para degradação de HCB em solo, sendo pela primeira vez descrita para oxidação deste composto. Contudo, pode-se observar que há um aumento considerável na toxicidade do solo após este tratamento. Tal fato indica a necessidade de um pós-tratamento biológico para diminuir a toxicidade aguda do solo e otimizar as taxas de degradação.

A hipótese da degradação do HCB ser facilitada pela associação de tratamento químico e tratamento biológico pode ser confirmada pelos resultados obtidos no capítulo II. *Trametes villosa* é um fungo lignícola, neotropical, comumente encontrado no Brasil. Já havia sido descrito por alguns autores a sua capacidade em degradar e até mineralizar alguns compostos organoclorados, como o pentaclorofenol. Porém, neste trabalho registrou-se pela primeira vez a capacidade de *T. villosa* em degradar o HCB e mineralizar os produtos de sua oxidação química.

Embora muito recentemente tenha sido mostrada a capacidade de basidiomicetos em

mineralizar HCB em solo, ainda pouco se conhece dos mecanismos envolvidos na cinética de biodegradação deste composto, sendo necessária novas pesquisas para tornar viável o tratamento de solo em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, M. Y., Dec, J., Kim, J. E. & Bollag, J. M.** 2002. Treatment of 2,4-Dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *Journal of Environmental Quality* 31: 1509-1515.
- Anderson, J. P .E.** 1990. Principles of an assay systems for biodegradation. *Advance in Applied Biotechnology Series* 4: 129-145.
- Andrea, M. M, Papini, S. & Nakagawa, L. E.** 2001. Otimizing microwave-assited solvent extraction of pesticides from soil. *Journal of Environmental Science and Health* 36 (1): 87-93.
- Andrea, M. M.** 1992. Formação e bio-liberação de resíduos ligados de [¹⁴C]-lindano e [¹⁴C]-paration em dois solos brasileiros. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN). Universidade de São Paulo, São Paulo. 130p.
- Arruda, T. L.** 2005. Uso de processos oxidativos avançados e ferro elementar na remediação de água subterrânea contendo compostos organoclorados. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 172p.
- Asther, M., Lesage, L., Drapron, R., Corrieu, G. & Odier, E.** 1998. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27: 393-398.
- Aust, S. D.** 1990. Degradation of enviromental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology* 20:197-209.
- Bailey, R.E.** 2001. Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere* 43: 167–182.
- Bais, N., Bouzaza, A., Guernion, P. Y. & Laplanche, A.** 2008. Elimination of persistent organic pollutants (POPs) by adsorption at high temperature: The case of fluoranthene and hexachlorobenzene. *Chemical Engineering and Processing* 47 (3): 316-322.

- Bakshi, D. K., Gupta, K. G. & Sharma, P.** 1999. Enhanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 507-509.
- Ballaminut, N.** 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 163p.
- Ballaminut, N., & Matheus, D. R.** 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil remediation. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 248-252.
- Barber, J. L., Sweetman, A. J., Wijk, D. V. & Jones, K. C.** 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44.
- Barr, D. P. & Aust, S. D.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology* 28 (2): 78-87.
- Bononi, V. L. R.** 1997. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. *In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (eds.). Microbiologia Ambiental*, Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, 440 p.
- Boopathy, R.** 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Borga, K.** 2000. Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*. 113: 187-198. *apud* Toledo, H.H.B. 2002. Hexaclorobenzeno. *In: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (orgs.) Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador*, 13: 479-500.
- Bosna, T. N.P., Harms, H. & Zehnder, A. J. B.** 2001. Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. *In: The handbook of environmental chemistry: Biodegradation and Persistence*. Beek, B. (ed.). Berlin, v.2, 163-202.

- Boyle, C. D.** 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 41 (4-5): 345-353.
- Brahushi, F., Dörfler, U., Schroll, R. & Munch, J. C.** 2004. Stimulation of reductive dechlorination of hexachlorobenzene in soil by inducing the native microbial activity. *Chemosphere* 55: 1477-1487.
- Breivik, K., Alcock, R., Li, Y., Bailey, R. E., Fiedler, H. & Pacyna, J. M.** 2004. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environmental Pollution* 128: 3-16.
- Brunelle, D. J. & Singleton, D. A.** 1983. Destruction/Removal of polychlorinated biphenyls from non-polar media. Reaction of PCB with poly (ethylene glycol)/KOH. *Chemosphere* 12 (2): 183-196.
- Bumpus, J.A. & Aust, S.D.** 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus. In: Exner, J.H. (Ed.). *Solvent Hazardous waste problems: learning from dioxins*. Washington DC: American Chemistry Society 340-349.
- Chu, W., Hunt, J. R. & Jafvert, C. T.** 2002. Modeling the sequential photodechlorination of hexachlorobenzene in surfactant micelles. *Water Research* 36: 843-850.
- Côrrea, C. M. D.** 2005. Efeito de óleo de soja na persistência de Endosulfan no ambiente. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 85p.
- Dupont, R. R., Bruell, C. J., Marley, M. C., Downey, D. C., Norris, R. D., Hulling, S. G. & Pivets, B.** 1997. *Bioremediation*. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.
- Eerd, L. L. V., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. & Hall, J. C.** 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science* 51: 472–495.
- Eggen, T. & Sveum, P.** 2001. DDT degradation by chemical oxidation and white rot fungi. In: *Ex situ biological treatment technologies*. Magar, V.S.; von Fahnstock, F.M.; Leeson, A. (eds.). Columbus: Battelle Press 157-164.

- Escola superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.** 2007. Poluentes Orgânicos Persistentes. Disponível: <http://www.esb.ucp.pt/gea/myfiles/pops/POPs/dispersao.htm> (acesso em Junho de 2007).
- Evans, C. S. & Hedger, J. N.** 2001. Degradation of plant cell wall polymers. *In*. Fungi in bioremediation, Gadd, G. M. (ed.). University Press, Cambridge, British Mycological Society, 1-24.
- Ezendam, J., Staedtler, F., Pennings, J., Vandebriel, R. J., Pieters, R., Harleman, J. H. & Vos, J. G.** 2004. Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in brown norway rats. *Environmental Health Perspectives* 112 (7): 782-791.
- Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P.** 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231-240.
- Fathpure, B. Z., Tiedje, J. M. & Boyd, S. A.** 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzene in anaerobic sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (2): 327-330.
- Fernícola, N. A. G. G. & Oliveira, S. S.** 2002. Produtos orgânicos persistentes: POPs. Série Caderno de Referência Ambiental v.13. Salvador, 500 p.
- Freire, R. S., Pelegrini, R., Kubota, L. T. & e Durán, N.** 2000. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova* 23 (4): 504-511.
- Fuhr, F.** 1987. Non-extractable pesticide residues. *In*: Greenhalg, R.; Roberts, T.R. (Eds.) **Pesticide Science and Biotechnology**. 1987. Oxford:Blackwell Scientific Publications, p.381-389, *apud*
- Vitali, V. M. V.** 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.
- Gobas, F. A. P. C., Bedard, D. C., Ciborowski, J. J. H. & Haffner, G. D.** 1989. Bioaccumulation of

- chlorinated hydrocarbons by mayfly (*Hexagenia limbata*) in Lake St. Clair. J. Great Lakes Res. 15: 581-588. *apud* Toledo, H.H.B. 2002. Hexaclorobenzeno. In: Fernícola, N.A.G.G., Oliveira, S.S. (orgs.) Poluentes Orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador, 13: 479-500.
- Goerk, H., Weber, K., Bornemann, H., Ramdohr, S. & Plötz, J.** 2004. Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota. Marine Pollution Bulletin 48: 295–302.
- Guerzoni, S., Rossini, P., Sarretta, A., Raccanelli, S., Ferrari, G. & Molinaroli, E.** 2007. POPs in the Lagoon of Venice: budgets and pathways. Chemosphere 67: 1776-1785.
- Gugliotta, A. M. & Bononi, V. L. R.** 1999. Polyporaceae do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Botânica 12: 1-112.
- Gugliotta, A.M.** 2001. Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 115p.
- Hägglom, M. M.** 1992. Microbiol breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbiology Review 103: 29-72.
- Hirano, T., Ishida, T., Oh, K. & Sudo, R.** 2007. Biodegradation of chlordane and hexachlorobenzene in river sediment. Chemosphere 67: 428-434.
- Hofrichter, M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.
- Jan Stach, V. P., Endrst, R. & and Hetflejs, J.** 1999. Dechlorination of hexachlorobenzene on mwi fly ash. Chemosphere 39 (14): 2391-2399.
- Jung, H., Sohn, K., Neppolian, B. & Choi, H.** 2008. Effect of soil organic matter (SOM) and soil texture on the fatality of indigenous microorganisms in integrated ozonation and biodegradation. Journal of Hazardous Materials 150 (3): 809-817.

- Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S. & Rastall, R. A.** 1999. Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 303-307.
- Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. & Hatakka, A.** 1999. Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259: 212-219.
- Kastánek, F. & Kastánek, P.** 2005. Combined decontamination processes for wastes containing PCBs. *Journal of Hazardous Materials B117*: 185-205.
- Kiehl, E. J.** 1985. *Fertilizantes orgânicos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 492p.
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L.** 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kirk, T.K.** 1993. Lignin degradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping. *Inn: Cellulosics: Pulp, fibre and environmental aspects*. Kennedy, J.F.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. (eds.). New York: Ellis Horwood 63: 421-430.
- Krishna, C.** 2005. Solid-state fermentation systems - an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 1–30.
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Moraes, S. G. & Durán, N.** 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova* 25 (1): 78-82.
- Lamar, R. T. & Evans, J. W.** 1993. Solid-phase treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degradin fungi. *Environmental Science and Technology* 27: 2566-2571.
- Leisinger, T.** 1983. Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39: 1183-1191.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N. & Hofrichter, M.** 1999. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27:175-185.

- Leštan, D., Cernilec, M., Strancar, A. & Perdih, A.** 1993. Influence of some surfactants and related compounds ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters 106: 17-22.
- Leštan, D., Strancar, A. & Perdih, A.** 1990. Influence os some oils and surfactants on ligninolytic activity, growth and lipid fatty acids of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 426-428.
- Litchfield, C.** 2005. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime?. BioScience 55 (3): 273-279.
- Lodolo, A., Gonzalez-Valencia, E. & Miertus, S.** 2001. Overview of remediation technologies for persistent toxic substances. Arh Hig Rada Toksiko 52: 253-280.
- Ma, X., Zheng, M., Liu, W., Qian, Y., Zhao, X. & Zhang, B.** 2005. Synergic effect of calcium oxide and iron (III) oxide on the dechlorination of hexachlorobenzene. Chemosphere 60: 796-801.
- Machado, K. M. G., Compart, L. C. A., Morais, R. O., Rosa, L. H. & Santos, M. H.** 2006. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystems. Brazilian Journal of Microbiology 37: 481-487.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005a. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 297-301.
- Machado, K. M. G., Matheus, D. R., Monteiro, R. T. R. & Bononi, V. L. R.** 2005b. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. Brazilian. Journal of Microbiology 36: 246-252.
- Machado, K.M.G.** 1998. Biodegradação de pentaclofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solo contaminado com resíduos industriais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 172 p.

- Marcondes, M. A. & Andréa, M. M.** 2001. Comportamento de [^{14}C]-2,4 D em solo como parâmetro de influência de aplicação de outros pesticidas. *Inn XV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas*, Maracaibo - Venezuela.
- Matheus, D. R. & Bononi, V. L. R.** 2002. C/N Ratio and vegetable oil to mineralize ^{14}C hexachlorobenzene by white-rot-fungi. *In: Gavaskar, A. R., Chen, A. S. C. (eds.). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Monterey, CA, Paper 2B-10.
- Matheus, D. R. & Machado, K. M. G.** 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador*. 13: 479-500.
- Matheus, D. R. & Okino, L. K.** 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In: Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.
- Matheus, D. R.** 1998. Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D. R.** 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G.** 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- Mesquita, A. C.** 2004. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de

Janeiro. 158p.

- Mesquita, T. B. & Ruegg, E. F.** 1984. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. *Cultura e Ciência* 36: 446-450.
- Michizoe, J., Ichinose, H., Kamiya, N., Maruyama, T. & Goto, M.** 2005. Biodegradation of phenolic environmental pollutants by a surfactant-laccase complex in organic media. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (6): 642-647.
- Miller, C., M. Valentine, R. L., Roehl, M. E. & Pedro, J. J. A.** 1996. Chemical and microbiological assessment of pendimethalin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. *Water Research* 30: 2579-2586.
- Miyoshi, K., Nishio, T., Yasuhara, A., Morita, M. & Shibamoto, T.** 2004. Detoxification of hexachlorobenzene by dechlorination with potassium-sodium alloy. *Chemosphere* 55: 1439-1446.
- Moore-Landecher,** 1996. *Fundamentals of the Fungi*. 14^a ed. Brasil: Prentice-Hall. Cap 9, p. 251-78.
- Moreira-Neto, S. L.** 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.
- Moreno, C. M., Becerra, A. G. & Santos, M. J. B.** 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 103-120.
- Nakagawa, L. E. & Andréa, M. M.** 2005. Volatilização e lixiviação de ¹⁴C-hexaclorobenzeno em solo contaminado. *Arquivos do Instituto Biológico* 72 (2): 255-260.
- Nakagawa, L. E.** 2003. Alteração de características do solo para remoção de hexaclorobenzeno de área contaminada. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 66p.
- Nakagawa, L. E., Luchini, L. C., Musumeci, M. R. & Andrea, M. M.** 1995. Comportamento de atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30 (4):

471-476.

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.** 2004. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction. In Section 2: Effects on Biotic Systems, Test nº 202. p.1-12.
- Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R.** 2000 Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 889–893.
- Pavlosthatis, S. G., Prytula, M. T. & Yeh, D. H.** 2002. Potencial and limitations of microbial reductive dechlorination for bioremediation applications. *Water, Air and Soil Pollution* 3: 117-129.
- Pointing, S. B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20–33.
- Rahuman, M., Pistone, L., Trifiró, F. & Miertus, S.** 2000. Destruction technologies for polychlorinated biphenyls (PCB's). ICS (International Centre for Science and High Technology) – Unido Publications, Padriciano 99, 34102 Trieste, Itália.
- Reddy, G. V. B & Gold, M. H.** 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405–413.
- Reddy, G. V. B., Gelpke, M. D. S. & Gold, M. H.** 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology* 180 (19): 5159–5164.
- Rizzo, A. C. L., Leite, S. G. F., Soriano, A. U., Santos, R. L. C. & Sobral, L. G. S.** 2006. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. *Inn Série Tecnologia Ambiental STA-37*. Rio de Janeiro, 59p.
- Roberts, T.R.** 1984. Nonextractable pesticide residues in soil and plants. IUPAC reports on pesticides. *Pure and Applied Chemistry* 56: 945-956.

- Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F. & Munch, J. C.** 1997. Initiation of [³⁶Cl] hexachlorobenzene dechlorination in three different soils under artificially induced anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 115-120.
- Sabata, S., Friesova, A., Rericha, R. & Hetflejš, J.** 1993. Limits to use of KOH/PEG method for destruction of PCB liquids of Czechoslovak production. *Chemosphere* 27 (7): 1201-1210.
- Sandermann Jr., H., Heller, W., Hertkorn, N., Hoque, E., Pieper, D. & Winkler, R.** 1998. A new intermediated in the mineralization of 3,4-dichloroaniline by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3305-3312.
- Saparrat, M. C. N., Martinez, M. J., Cabello, M. N. & Arambarri, A.** 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micologia* 19: 181-185.
- Scheunert, I.** 1993. Transport and transformation of pesticides in soil *Inn: Fate and Prediction of Environmental Chemicals in Soil, Plants and Aquatic System*. Mansour, M. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1-22.
- Schmid, P., Kohler, M., Gujer, E., Zennegg, M. & Lanfranchi, M.** 2007. Persistent organic pollutants, brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote alpine lakes in Switzerland. *Chemosphere* 67: S16-S21.
- Semple, K. T., Reid, B. J. & Fermor, T. R.** 2001. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112: 269-283.
- Shim, S. S. & Kawamoto, K.** 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research* 36: 4445-4454.
- Shiu, W., Ma, K., Varhanířková, D. & Mackay, D.** 1994. Chlorophenols and alkylphenols: A review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment. *Chemosphere* 29 (6): 1155-1224. *Apud Matheus, D. R.* 2003. Otimização da biodegradação de

- HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- Silva, C. M. M. S. & Fay, E. F.** 1997. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. *In*: Fernicola, N. A. G & Oliveira, S. S. (Orgs.). Produtos orgânicos Persistentes – POPs, CRA, Salvador 3: 67-105.
- Silva, R. R., Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G. & Matheus, D. R.** 2005. Crescimento de *Trametes villosa* em solo contaminado com organoclorados tratados quimicamente. *In*: V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasília. Resumos p.277.
- Srebotnik, E. & Boisson, J. N.** 2005. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme Microbiology and Biotchnology* 36: 132-136.
- Stephan, C.E.** 1977. Methods for calculating an LC50. *In*: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: First Symposium. ASTM -STP. Mayer, F. L. & Hamelink, J. L. (eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials. 634p.
- Toledo, H. H. B.** 2002. Hexaclorobenzeno. *In*: Poluentes Orgânicos Persistentes. Fernícola, N. A. G. G.; Oliveira, S. S.– Salvador : CRA, v.13, cap.10, pág.385-416, 2002 (Série Caderno de Referência Ambiental).
- Tortella, G. R., Diez, M. C. & Durán, N.** 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itävaara, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- U.S. Environmental Protection Agency.** 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal CERCLA, EPA/503/8-91/001.
- U.S. Environmental Protection Agency.** 1996. A Citizen's Guide to Chemical dehalogenation,

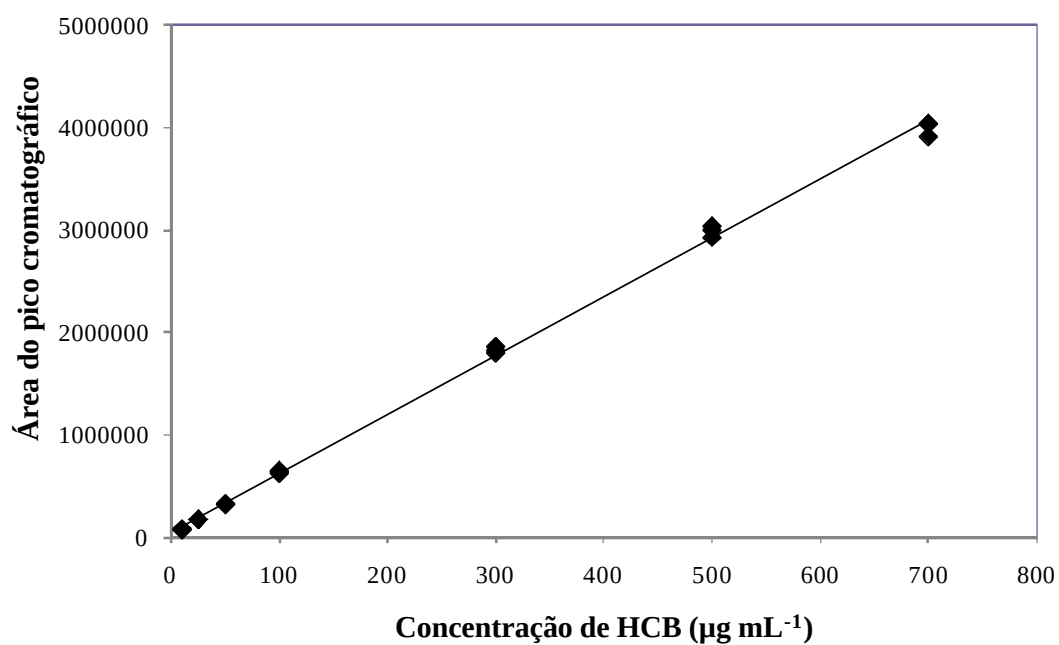
- Ullah, M. A., Kadhim, H., Rastall, R. A. & Evans, C. S.** 2000. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:832-837.
- Verschueren, K.** 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York. 363p.
- Verstraete, W. & Devliegher, W.** 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspective for site remediation. *Biodegradation* 7: 471-485.
- Vieira, S. & Hoffmann, R.** Estatística Experimental. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.
- Vitali, V. M. V.** 2004. Biodegradação de hexaclorobenzeno por *Eupenicillium* spp. e *Psilocybe castanella* em solos contaminados com organoclorados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 116p.
- Vitali, V. M. V., Machado, K. M. G., Andrea, M. M. & Bononi, V. L. R.** 2006. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 256- 261.
- Wu, F., Ozaki, H., Yutaka, T., Imada, T. & Ohkouchi, Y.** 1996. Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability. *Water Science and Technology* 34 (7-8): 68-78.
- Xu, F., Deussen, H. J. W., Lopez, B., Lam, L. & Li, K.** 2001. Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds: Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability. *European Journal Biochemistry* 268: 4169-4176.
- Yamanaka, R., Soares, C. F., Matheus, D. R. & Machado, K. M. G.** 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *World Journal of Microbiology in press*.
- Yuan, S., Shu, Z., Wan, J. & Lu, X.** 2007. Enhanced desorption of hexachlorobenzene from kaolin by single and mixed surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 167-175.

- Yuan, S., Tian, M. & Lu, X.** 2006. Electrokinetic movement of hexachlorobenzene in clayed soils enhanced by Tween 80 and β -cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials* 137 (2): 1218-1225.
- Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D. & Hamilton, A.** 2007. Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere* 67: 1368-1374.
- Zhang, J., Zheng, Z., Luan, J., Yang, G., Song, W., Zhong, Y. & Xie, Z.** 2007. Degradation of hexachlorobenzene by electron beam irradiation. *Journal of Hazardous Materials* 142: 431–436.

ANEXO 1

Curva padrão de concentrações conhecidas de hexaclorobenzeno (HCB), utilizada para quantificação do hexaclorobenzeno (HCB) recuperado nos extratos do solo

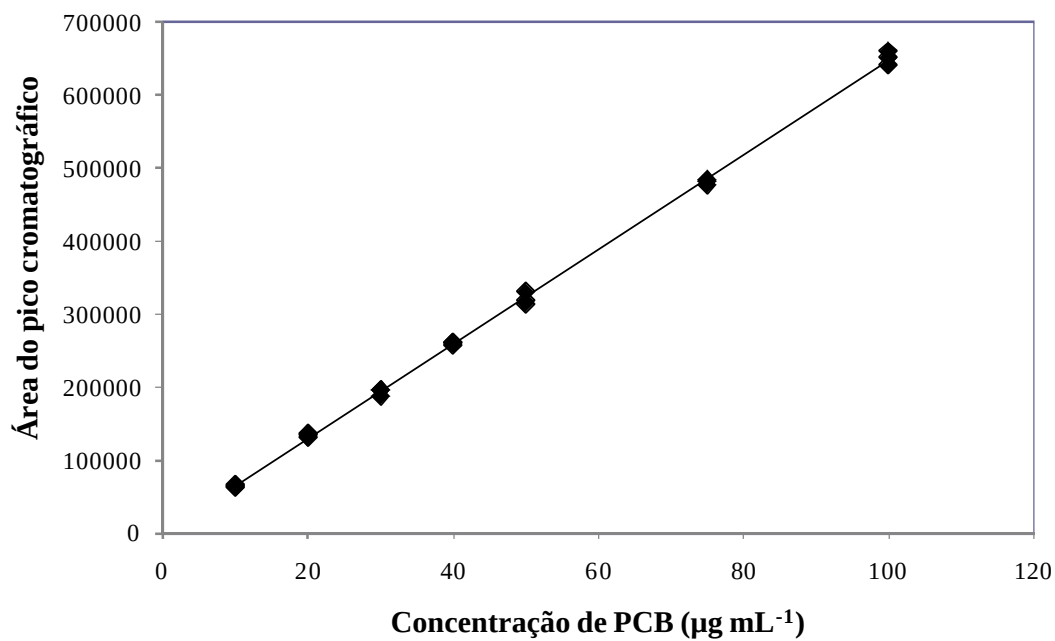
Equação da reta $y = 5766x + 44720$, $r^2 = 0,9985$.



ANEXO 2

Curva padrão de concentrações conhecidas de pentaclorobenzeno (PeCB), utilizada para quantificação do pentaclorobenzeno (PeCB) recuperado nos extratos do solo

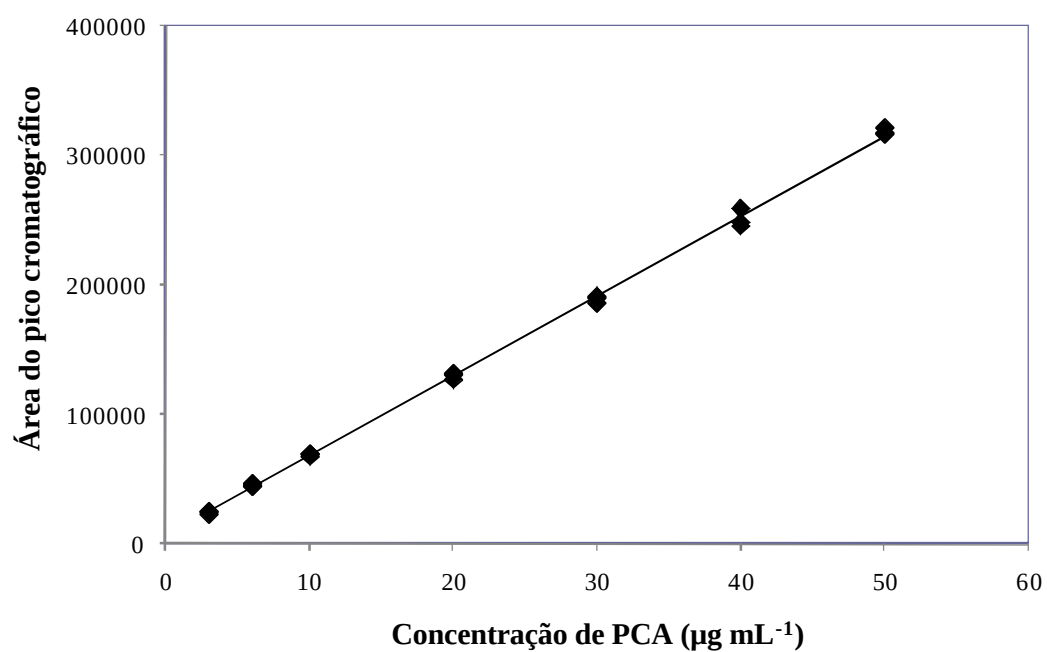
Equação da reta $y = 6482,2x - 705,1$, $r^2 = 0,9992$.



ANEXO 3

Curva padrão de concentrações conhecidas de pentacloroanisol (PCA), utilizada para quantificação do pentacloroanisol (PCA) recuperado nos extratos do solo

Equação da reta $y = 6162,6x + 6822,3$, $r^2 = 0,999$.



ANEXO 4

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB convertido em $^{14}\text{CO}_2$ por *Trametes villosa*

CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % $^{14}\text{CO}_2$ transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % $^{14}\text{CO}_2$ versus % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % $^{14}\text{CO}_2$, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,0003089	0,0003089	0,0001545	1,32	0,304
Fungo	1	0,0011821	0,0011821	0,001182	10,09	0,008***
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,0020382	0,0020382	0,001019	8,69	0,005***
Erro	12	0,0014065	0,0014065	0,0001172		
Total	17	0,0049357				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% (P < 0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% (P < 0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% (P < 0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	0,01621	0,005104	0,0080***

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE) E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	CCB176 0,0%	-0,01387	0,008840	0,6314
	Controle 2,5%	-0,01402	0,008840	0,6213
	CCB176 2,5%	0,01623	0,008840	0,4803
	Controle 5,0%	-0,02440	0,008840	0,1331
	CCB176 5,0%	0,00784	0,008840	0,9426
CCB176*0,0%	Controle 2,5%	-0,00015	0,008840	1,0000
	CCB176 2,5%	0,03010	0,008840	0,0463
	Controle 5,0%	-0,01053	0,008840	0,8330

Continuação

	CCB176 5,0%	0,02171	0,008840	0,2120
Controle*2,5%	CCB176 2,5%	0,03025	0,008840	0,0449
	Controle 5,0%	-0,01037	0,008840	0,8409
	CCB176 5,0%	0,02186	0,008840	0,2066
CCB176*2,5%	Controle 5,0%	-0,04063	0,008840	0,0063***
	CCB176 5,0%	-0,00839	0,008840	0,9253
Controle*5,0%	CCB176 5,0%	0,03224	0,008840	0,0308***

ANEXO 5

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB convertido em ^{14}C -compostos voláteis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos voláteis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos voláteis *versus* % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS VOLÁEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,03368	0,03368	0,01684	1,01	0,393
Fungo	1	0,13059	0,13059	0,13059	7,85	0,016**
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,01166	0,01166	0,00583	0,35	0,712
Erro	12	0,19975	0,19975	0,01665		
Total	17	0,37569				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-0,1704	0,06082	0,0160**

ANEXO 6

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB convertido em ^{14}C -compostos extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos extraíveis *versus* % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,054836	0,054836	0,027418	12,3	0,001***
Fungo	1	0,144724	0,144724	0,144724	65,0	0,000***
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,002178	0,002178	0,001089	0,49	0,625
Erro	12	0,026684	0,026684	0,002224		
Total	17	0,228423				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% (P < 0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% (P < 0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% (P < 0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-0,0711	0,02723	0,0551**
	5,0%	-0,1351	0,02723	0,0009***
2,5 % óleo	5,0%	-0,06400	0,02723	0,0866*

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	0,1793	0,02223	0,0000***

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	CCB176 0,0%	0,2103	0,03850	0,0016***
	Controle 2,5%	-0,0466	0,03850	0,8243
	CCB176 2,5%	0,1146	0,03850	0,0941
	Controle 5,0%	-0,1132	0,03850	0,0996*
	CCB176 5,0%	0,0533	0,03850	0,7357
CCB176*0,0%	Controle 2,5%	-0,2569	0,03850	0,0003***
	CCB176 2,5%	-0,0957	0,03850	0,2029
	Controle 5,0%	-0,3235	0,03850	0,0000***
	CCB176 5,0%	-0,1570	0,03850	0,0149**
Controle*2,5%	CCB176 2,5%	0,1611	0,03850	0,0124**
	Controle 5,0%	-0,0666	0,03850	0,5384
	CCB176 5,0%	0,0998	0,03850	0,1724
CCB176*2,5%	Controle 5,0%	-0,2279	0,03850	0,0008***
	CCB176 5,0%	-0,0613	0,03850	0,6174
Controle*5,0%	CCB176 5,0%	0,1665	0,03850	0,0098***

ANEXO 7

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB convertido em ^{14}C -compostos não extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos não extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos não extraíveis *versus* % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS NÃO EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,054836	0,054836	0,027418	12,3	0,001***
Fungo	1	0,144724	0,144724	0,144724	65,0	0,000***
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,002178	0,002178	0,001089	0,49	0,625
Erro	12	0,026684	0,026684	0,002224		
Total	17	0,228423				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-0,0711	0,02723	0,0551**
	5,0%	-0,1351	0,02723	0,0009***
2,5% óleo	5,0%	-0,06400	0,02723	0,0866**

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	0,1793	0,02223	0,0000***

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	CCB176 0,0%	0,2103	0,03850	0,0016***
	Controle 2,5%	-0,0466	0,03850	0,8243
	CCB176 2,5%	0,1146	0,03850	0,0941**
	Controle 5,0%	-0,1132	0,03850	0,0996
	CCB176 5,0%	0,0533	0,03850	0,7357
CCB176*0,0%	Controle 2,5%	-0,2569	0,03850	0,0003***
	CCB176 2,5%	-0,0957	0,03850	0,2029
	Controle 5,0%	-0,3235	0,03850	0,0000***
	CCB176 5,0%	-0,1570	0,03850	0,0149
Controle*2,5%	CCB176 2,5%	0,1611	0,03850	0,0124**
	Controle 5,0%	-0,0666	0,03850	0,5384
	CCB176 5,0%	0,0998	0,03850	0,1724
CCB176*2,5%	Controle 5,0%	-0,2279	0,03850	0,0008***
	CCB176 5,0%	-0,0613	0,03850	0,6174
Controle*5,0%	CCB176 5,0%	0,1665	0,03850	0,0098***

ANEXO 8

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em $^{14}\text{CO}_2$ por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % $^{14}\text{CO}_2$ transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % $^{14}\text{CO}_2$ versus % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % $^{14}\text{CO}_2$, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,166905	0,166905	0,083453	10,2	0,008***
Fungo	1	0,015766	0,015766	0,015766	54,4	0,000***
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,001553	0,001553	0,000777	0,51	0,615
Erro	12	0,018395	0,018395	0,001533		
Total	17	0,202620				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% (P < 0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% (P < 0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% (P < 0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	0,2015	0,02260	0,0000***
	5,0%	0,2069	0,02260	0,0000***
2,5 % óleo	5,0%	0,005390	0,02260	0,9692

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	0,05919	0,01846	0,0075***

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	Controle 2,5%	0,2004	0,03197	0,0005***
	Controle 5,0%	0,1867	0,03197	0,0009***
	CCB176 0,0%	0,0450	0,03197	0,7225
	CCB176 2,5%	0,2475	0,03197	0,0001 ***
	CCB176 5,0%	0,2721	0,03197	0,0000 ***
Controle*2,5%	Controle 2,5%	-0,0138	0,03197	0,9976
	CCB176 2,5%	-0,1555	0,03197	0,0040 ***
	Controle 5,0%	0,0471	0,03197	0,6853
	CCB176 5,0%	0,0717	0,03197	0,2877
Controle*5,0%	CCB176 2,5%	-0,1417	0,03197	0,0082
	Controle 5,0%	0,0609	0,03197	0,4438
	CCB176 5,0%	0,0854	0,03197	0,1526
CCB176*0,0%	Controle 5,0%	0,2026	0,03197	0,0004 ***
	CCB176 5,0%	0,2271	0,03197	0,0002
CCB176*2,5%	CCB176 5,0%	0,0245	0,03197	0,9680 ***

ANEXO 9

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -compostos voláteis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos voláteis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos voláteis *versus* % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS VOLÁEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,0260206	0,0260206	0,0130103	86,9	0,000***
Fungo	1	0,0001901	0,0001901	0,0001901	1,27	0,282
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,0000632	0,0000632	0,0000316	0,21	0,813
Erro	12	0,0017954	0,0017954	0,0001496		
Total	17	0,0280694				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-0,06774	0,007062	0,0000***
	5,0%	-0,08922	0,007062	0,0000***
2,5 % óleo	5,0%	-0,02148	0,007062	0,0257

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE) E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	Controle 2,5%	-0,06356	0,009987	0,0004***

Continuação

	Controle 5,0%	-0,08549	0,009987	0,0000***
	CCB176 0,0%	-0,00123	0,009987	1,0000
	CCB176 2,5%	-0,07315	0,009987	0,0001***
	CCB176 5,0%	-0,09418	0,009987	0,0000***
Controle*2,5%	Controle 2,5%	-0,02193	0,009987	0,3068
	CCB176 2,5%	0,06234	0,009987	0,0005***
	Controle 5,0%	-0,00958	0,009987	0,9223
	CCB176 5,0%	-0,03062	0,009987	0,0814**
Controle*5,0%	CCB176 2,5%	0,08426	0,009987	0,0000***
	Controle 5,0%	0,01234	0,009987	0,8119
	CCB176 5,0%	-0,00869	0,009987	0,9468
CCB176*0,0%	Controle 5,0%	-0,07192	0,009987	0,0001***
	CCB176 5,0%	-0,09295	0,009987	0,0000***
CCB176*2,5%	CCB176 5,0%	-0,02103	0,009987	0,3456

ANEXO 10

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -compostos extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos extraíveis *versus* % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,020990	0,020990	0,010495	1,00	0,379
Fungo	1	0,164705	0,164705	0,164705	16,5	0,002***
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,017707	0,017707	0,008854	0,89	0,437
Erro	12	0,119765	0,119765	0,009980		
Total	17	0,323167				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% (P < 0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% (P < 0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% (P < 0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-0,1913	0,04709	0,0016***

ANEXO 11

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -compostos não extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos não extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos não extraíveis versus % Fungo; Óleo vegetal

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3
Fungo	fixo	2	1; 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS NÃO EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
% Óleo vegetal	2	0,020990	0,020990	0,010495	1,00	0,379
Fungo	1	0,164705	0,164705	0,164705	6,50	0,002**
% Óleo vegetal*Fungo	2	0,017707	0,017707	0,008854	0,89	0,437
Erro	12	0,119765	0,119765	0,009980		
Total	17	0,323167				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% (P < 0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% (P < 0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% (P < 0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-0,1913	0,04709	0,0016***

ANEXO 12

Análise de variância da concentração de HCB ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de HCB versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE HCB ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	103846765	103846765	103846765	53,51	0,000***
Tratamento	2	25246400	25246400	12623200	6,50	0,012**
Fungo*Tratamento	2	6411780	6411780	3205890	1,65	0,232
Error	12	23289862	23289862	1940822		
Total	17	158794807				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-2499	804,3	0,0229**
	5,0%	-2525	804,3	0,0216**
2,5 % óleo	5,0%	-25,64	804,3	0,9994

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-4804	656,7	0,0000***

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	Controle 2,5%	-1077	1137	0,9262
	Controle 5,0%	-1522	1137	0,7600
	CCB176 0,0%	-3187	1137	0,1246
	CCB176 2,5%	-7109	1137	0,0005***
	CCB176 5,0%	-6715	1137	0,0008***
Controle*2,5%	Controle 2,5%	-445	1137	0,9985
	CCB176 2,5%	-2110	1137	0,4702
	Controle 5,0%	-6032	1137	0,0020***
	CCB176 5,0%	-5638	1137	0,0035***
Controle*5,0%	CCB176 2,5%	-1665	1137	0,6914
	Controle 5,0%	-5587	1137	0,0037***
	CCB176 5,0%	-5193	1137	0,0066***
CCB176*0,0%	Controle 5,0%	-3922	1137	0,0431 **
	CCB176 5,0%	-3528	1137	0,0767
CCB176*2,5%	CCB176 5,0%	394,1	1137	0,9992

ANEXO 13

Análise de variância da concentração de pebtaclorobenzeno (PeCB) ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de PeCB versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE PeCB ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	103846765	103846765	103846765	53,51	0,000***
Tratamento	2	25246400	25246400	12623200	6,50	0,012**
Fungo*Tratamento	2	6411780	6411780	3205890	1,65	0,232
Error	12	23289862	23289862	1940822		
Total	17	158794807				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-2499	804,3	0,0229**
	5,0%	-2525	804,3	0,021**6
2,5 % óleo	5,0%	-25,64	804,3	0,9994

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-4804	656,7	0,0000***

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	Controle 2,5%	-1077	1137	0,9262
	Controle 5,0%	-1522	1137	0,7600
	CCB176 0,0%	-3187	1137	0,1246
	CCB176 2,5%	-7109	1137	0,0005***
	CCB176 5,0%	-6715	1137	0,0008***
Controle*2,5%	Controle 2,5%	-445	1137	0,9985
	CCB176 2,5%	-2110	1137	0,4702
	Controle 5,0%	-6032	1137	0,0020***
	CCB176 5,0%	-5638	1137	0,0035***
Controle*5,0%	CCB176 2,5%	-1665	1137	0,6914
	Controle 5,0%	-5587	1137	0,0037***
	CCB176 5,0%	-5193	1137	0,0066***
CCB176*0,0%	Controle 5,0%	-3922	1137	0,0431**
	CCB176 5,0%	-3528	1137	0,0767
CCB176*2,5%	CCB176 5,0%	394,1	1137	0,9992

ANEXO 14

Análise de variância da concentração de HCB ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de HCB versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE HCB ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	231184	231184	231184	2,42	0,146
Tratamento	2	847633	847633	423817	4,44	0,036**
Fungo*Tratamento	2	95717	95717	47859	0,50	0,618
Error	12	1145541	1145541	95462		
Total	17	2320075				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-8,3	178,4	0,9988
	5,0%	-464,4	178,4	0,0560**
2,5 % óleo	5,0%	-456,1	178,4	0,0607*

ANEXO 15

Análise de variância da concentração de tetraclorodietóxibenzeno (TCDB) ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de TCDB versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE TCDB ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	1388723	1388723	1388723	4,50	0,055*
Tratamento	2	3006641	3006641	1503320	4,87	0,028**
Fungo*Tratamento	2	781575	781575	390787	1,27	0,317
Error	12	3701057	3701057	308421		
Total	17	8877996				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo > 99% ($P < 0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo > 95% ($P < 0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo > 90% ($P < 0,1$)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE % DE ÓLEO VEGETAL

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
0% óleo	2,5%	-222,3	320,6	0,7718
	5,0%	-956,5	320,6	0,0286**
2,5 % óleo	5,0%	-734,2	320,6	0,0960

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	-555,5	261,8	0,0554*

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E % DE ÓLEO VEGETAL (0, 2,5 e 5)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*0,0%	Controle 2,5%	-682	453,4	0,6681
	Controle 5,0%	-1378	453,4	0,0850
	CCB176 0,0%	-1143	453,4	0,1923
	CCB176 2,5%	-906	453,4	0,3969
	CCB176 5,0%	-1678	453,4	0,0281**
Controle*2,5%	Controle 2,5%	-695,9	453,4	0,6510
	CCB176 2,5%	-461,0	453,4	0,9036
	Controle 5,0%	-223,3	453,4	0,9955
	CCB176 5,0%	-995,9	453,4	0,3064
Controle*5,0%	CCB176 2,5%	234,9	453,4	0,9944
	Controle 5,0%	472,5	453,4	0,8946
	CCB176 5,0%	-300,0	453,4	0,9831
CCB176*0,0%	Controle 5,0%	237,7	453,4	0,9941
	CCB176 5,0%	-534,9	453,4	0,8382
CCB176*2,5%	CCB176 5,0%	-772,5	453,4	0,5541

ANEXO 16

Análise de variância da concentração de pentacloroanisol (PCA) ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de PCA versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE PCA ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	141	141	141	0,09	0,775
Tratamento	2	4550	4550	2275	1,37	0,290
Fungo*Tratamento	2	433	433	216	0,13	0,879
Error	12	19862	19862	1655		
Total	17	24986				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% ($P<0,1$)

ANEXO 17

Análise de variância da concentração de 1,2,3,5 tetracloro-4-etóxi-benzeno (1,2,3,5 TCEB) ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de 1,2,3,5 TCEB versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 1,2,3,5 TCEB ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	5676	5676	5676	0,92	0,355
Tratamento	2	34220	34220	17110	2,79	0,101
Fungo*Tratamento	2	22732	22732	11366	1,85	0,199
Error	12	73639	73639	6137		
Total	17	136266				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% ($P<0,1$)

ANEXO 18

Análise de variância da concentração de tetraclorometóxifenol (TCMF) ao final de 112 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com adição de diferentes concentrações de óleo vegetal ao sistema de cultivo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de TCMF versus % Fungo; Óleo vegetal**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
% Óleo vegetal	fixo	3	1; 2; 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE TCMF ($\mu\text{g g}^{-1}$), UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	12163	12163	12163	1,11	0,312
Tratamento	2	2200	2200	1100	0,10	0,905
Fungo*Tratamento	2	20897	20897	10448	0,96	0,412
Error	12	131040	131040	10920		
Total	17	166299				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% ($P<0,01$); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% ($P<0,05$); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% ($P<0,1$)

ANEXO 19

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -Compostos voláteis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com diferentes relações C/N

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos voláteis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos voláteis versus % Fungo; C/N solo

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS VOLÁTEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	0,025419	0,025419	0,025419	13,10	0,002***
Relação C/N solo	3	0,016791	0,016791	0,005597	2,88	0,068
Fungo*Relação C/N solo	3	0,026439	0,026439	0,008813	4,54	0,017**
Erro	16	0,031045	0,031045	0,001940		
Total	23	0,099695				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE FUNGO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
CCB 176	CONTROLE	0,06509	0,01798	0,0023***

TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE) E RELAÇÃO C/N DO SOLO (30, 80, 160 e 320)

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*C/N 30	Controle C/N80	0,024985	0,03597	0,9960
	Controle C/N160	-0,000170	0,03597	1,0000
	Controle C/N320	-0,002786	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N30	0,022138	0,03597	0,9981
	CCB176 C/N80	0,009553	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N160	0,155593	0,03597	0,0095***
	CCB176 C/N 320	0,095100	0,03597	0,2098
Controle*C/N 80	Controle C/N160	-0,02515	0,03597	0,9958
	Controle C/N320	-0,02777	0,03597	0,9924

Continuação

	CCB176 C/N30	-0,00285	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N80	-0,01543	0,03597	0,9998
	CCB176 C/N160	0,13061	0,03597	0,0363**
	CCB176 C/N 320	0,07012	0,03597	0,5402
Controle*C/N 160	Controle C/N320	-0,002617	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N30	0,022308	0,03597	0,9980
	CCB176 C/N80	0,009723	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N160	0,155762	0,03597	0,0094***
	CCB176 C/N 320	0,095270	0,03597	0,2083
Controle*C/N 320	CCB176 C/N30	0,02492	0,03597	0,9960
	CCB176 C/N80	0,01234	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N160	0,15838	0,03597	0,0082***
	CCB176 C/N 320	0,09789	0,03597	0,1852
CCB176*C/N 30	CCB176 C/N80	-0,01258	0,03597	1,0000
	CCB176 C/N160	0,13345	0,03597	0,0313***
	CCB176 C/N 320	0,07296	0,03597	0,4942
CCB176*C/N 80	CCB176 C/N160	0,14604	0,03597	0,0159**
	CCB176 C/N 320	0,08555	0,03597	0,3136
CCB176*C/N 160	CCB176 C/N 320	-0,06049	0,03597	0,6980

ANEXO 20

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -Compostos extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com diferentes relações C/N

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos extraíveis versus % Fungo; C/N solo

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	0,013277	0,013277	0,013277	4,25	0,056
Relação C/N solo	3	0,006449	0,006449	0,002150	0,69	0,572
Fungo*Relação C/N solo	3	0,020499	0,020499	0,006833	2,19	0,129
Erro	16	0,049945	0,049945	0,003122		
Total	23	0,090171				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

ANEXO 21

Análise de variância da porcentagem de ^{14}C -HCB oxidado convertido em ^{14}C -Compostos não extraíveis por *Trametes villosa* CCB 176 em solo, com diferentes relações C/N

Delineamento experimental inteiramente casualizado

Valores de % ^{14}C -compostos não extraíveis transformados em arcoseno [raiz (porcentagem/100)]

General Linear Model: % ^{14}C -compostos não extraíveis versus % Fungo; C/N solo

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA % ^{14}C -COMPOSTOS NÃO EXTRAÍVEIS, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	0,002269	0,002269	0,002269	0,70	0,417
Relação C/N solo	3	0,010503	0,010503	0,003501	1,07	0,389
Fungo*Relação C/N solo	3	0,014227	0,014227	0,004742	1,45	0,265
Erro	16	0,052236	0,052236	0,003265		
Total	23	0,079235				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

ANEXO 22

Análise de variância da concentração de HCB ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de HCB versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE HCB, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	425629	425629	425629	2,25	0,153
Relação C/N solo	3	3783080	3783080	1261027	6,68	0,004***
Fungo*Relação C/N solo	3	3195409	3195409	1065136	5,64	0,008***
Erro	16	3021329	3021329	188833		
Total	23	10425447				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE RELAÇÃO C/N DO SOLO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
C/N 30	C/N 80	-243	250,9	0,7690
	C/N 160	-206	250,9	0,8429
	C/N 320	-1041	250,9	0,0038***
C/N 80	C/N 160	36,5	250,9	0,9989
	C/N 320	-798,5	250,9	0,0267
C/N 160	C/N320	-834,9	250,9	0,0200

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E RELAÇÃO C/N DO SOLO (30, 80, 160 e 320)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*C/N 30	Controle C/N80	-232	354,8	0,9972
	Controle C/N160	-469	354,8	0,8771
	Controle C/N320	-1929	354,8	0,0011***
	CCB176 C/N30	-836	354,8	0,3237
	CCB176 C/N80	-1090	354,8	0,1019
	CCB176 C/N160	-779	354,8	0,4020
	CCB176 C/N 320	-990	354,8	0,1656
Controle*C/N 80	Controle C/N160	-238	354,8	0,9968
	Controle C/N320	-1697	354,8	0,0039***
	CCB176 C/N30	-604	354,8	0,6856
	CCB176 C/N80	-859	354,8	0,2955
	CCB176 C/N160	-548	354,8	0,7743
	CCB176 C/N 320	-758	354,8	0,4339
Controle*C/N 160	Controle C/N320	-1459	354,8	0,0144**
	CCB176 C/N30	-367	354,8	0,9619
	CCB176 C/N80	-621	354,8	0,6587
	CCB176 C/N160	-310	354,8	0,9845
	CCB176 C/N 320	-520	354,8	0,8136
Controle*C/N 320	CCB176 C/N30	1092,9	354,8	0,1005
	CCB176 C/N80	838,8	354,8	0,3202
	CCB176 C/N160	1149,5	354,8	0,0754
	CCB176 C/N 320	939,1	354,8	0,2089
CCB176*C/N 30	CCB176 C/N80	-254,2	354,8	0,9951
	CCB176 C/N160	56,6	354,8	1,0000
	CCB176 C/N 320	-153,8	354,8	0,9998
CCB176*C/N 80	CCB176 C/N160	310,7	354,8	0,9843
	CCB176 C/N 320	100,4	354,8	1,0000
CCB176*C/N 160	CCB176 C/N 320	210,4	354,8	0,9985

ANEXO 23

Análise de variância da concentração de PeCB ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de PeCB versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE PeCB, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	505	505	505	0,39	0,540
Relação C/N solo	3	13196	13196	4399	3,42	0,043**
Fungo*Relação C/N solo	3	9151	9151	3050	2,37	0,109
Erro	16	20599	20599	1287		
Total	23	43451				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE RELAÇÃO C/N DO SOLO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
C/N 30	C/N 80	-11,45	20,72	0,9445
	C/N 160	26,26	20,72	0,5953
	C/N 320	-39,06	20,72	0,2727
C/N 80	C/N 160	37,71	20,72	0,3003
	C/N 320	-27,61	20,72	0,5565
C/N 160	C/N320	-65,32	20,72	0,0283**

ANEXO 24

Análise de variância da concentração de PCA ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de PCA versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE PCA, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	897	897	897	0,78	0,389
Relação C/N solo	3	7788	7788	2596	2,27	0,119
Fungo*Relação C/N solo	3	5512	5512	1837	1,61	0,227
Erro	16	18287	18287	1143		
Total	23	32483				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

ANEXO 25

Análise de variância da concentração de 1,2,3,5 tritaclo-ro-4-etóxi-benzeno (1,2,3,5 TCEB) ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ¹⁴C-HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de 1,2,3,5 TCEB versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N s olo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE 1,2,3,5 TCEB, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	6635	6635	6635	2,72	0,118
Relação C/N solo	3	46720	46720	15573	6,39	0,005**
Fungo*Relação C/N solo	3	32863	32863	10954	4,50	0,018***
Erro	16	38977	38977	2436		
Total	23	125196				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE RELAÇÃO C/N DO SOLO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
C/N 30	C/N 80	-72,6	28,50	0,0897
	C/N 160	-108,5	28,50	0,0076***
	C/N 320	-107,7	28,50	0,0080***
C/N 80	C/N 160	-35,81	28,50	0,6018
	C/N 320	-35,04	28,50	0,6180
C/N 160	C/N320	0,7752	28,50	1,000

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E RELAÇÃO C/N DO SOLO (30, 80, 160 e 320)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*C/N 30	Controle C/N80	-72,3	40,30	0,6324
	Controle C/N160	-137,7	40,30	0,0544
	Controle C/N320	-198,1	40,30	0,0030
	CCB176 C/N30	-92,9	40,30	0,3473
	CCB176 C/N80	-165,9	40,30	0,0143**
	CCB176 C/N160	-172,1	40,30	0,0106**
	CCB176 C/N 320	-110,2	40,30	0,1817
Controle*C/N 80	Controle C/N160	-65,4	40,30	0,7313
	Controle C/N320	-125,9	40,30	0,0931
	CCB176 C/N30	-20,6	40,30	0,9994
	CCB176 C/N80	-93,6	40,30	0,3389
	CCB176 C/N160	-99,9	40,30	0,2713
	CCB176 C/N 320	-37,9	40,30	0,9769
Controle*C/N 160	Controle C/N320	-60,44	40,30	0,7971
	CCB176 C/N30	44,77	40,30	0,9450
	CCB176 C/N80	-28,23	40,30	0,9958
	CCB176 C/N160	-34,44	40,30	0,9864
	CCB176 C/N 320	27,55	40,30	0,9963
Controle*C/N 320	CCB176 C/N30	105,21	40,30	0,2212
	CCB176 C/N80	32,21	40,30	0,9907
	CCB176 C/N160	26,00	40,30	0,9974
	CCB176 C/N 320	87,99	40,30	0,4090
CCB176*C/N 30	CCB176 C/N80	-73,00	40,30	0,6220
	CCB176 C/N160	-79,21	40,30	0,5307
	CCB176 C/N 320	-17,22	40,30	0,9998
CCB176*C/N 80	CCB176 C/N160	-6,211	40,30	1,0000
	CCB176 C/N 320	55,777	40,30	0,8518
CCB176*C/N 160	CCB176 C/N 320	61,99	40,30	0,7773

ANEXO 26

Análise de variância da concentração de Pentacloroetóxi-benzeno (PCEB) ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de PCEB versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE PCEB, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	11412	11412	11412	0,96	0,342
Relação C/N solo	3	208286	208286	69429	5,84	0,007***
Fungo*Relação C/N sob	3	69901	69901	23300	1,96	0,161
Erro	16	190090	190090	11881		
Total	23	479689				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE RELAÇÃO C/N DO SOLO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
C/N 30	C/N 80	-75,4	62,93	0,6365
	C/N 160	-123,9	62,93	0,2400
	C/N 320	-255,9	62,93	0,0045***
C/N 80	C/N 160	-48,5	62,93	0,8663
	C/N 320	-180,5	62,93	0,0494
C/N 160	C/N320	-132,0	62,93	0,1961

ANEXO 27

Análise de variância da concentração de Tetraclorodietóxibenzeno (TCDB) ao final de 84 dias de incubação de *Trametes villosa* CCB 176 em solo contaminado com ^{14}C -HCB oxidado, com diferentes relações C/N do solo.

Delineamento experimental inteiramente casualizado

General Linear Model: **Concentração de TCDB versus % Fungo; C/N solo**

(Minitab 15 – 2007)

Resumo

Fatores	Tipo	Níveis	Valores
Fungo	fixo	2	1; 2
Relação C/N solo	fixo	4	1; 2;3;4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE TCDB, UTILIZANDO SOMA DOS QUADRADOS (SQ) AJUSTADO

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	SQ ajustada	QM	F	Valor-P
Fungo	1	98092	98092	98092	0,69	0,420
Relação C/N solo	3	3416745	3416745	1138915	7,97	0,002***
Fungo*Relação C/N solo	3	2408168	2408168	802723	5,62	0,008***
Erro	16	2286922	2286922	142933		
Total	23	8209925				

GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = valor F do Teste de Student; *** = Probabilidade de haver efeito significativo>99% (P<0,01); ** = Probabilidade de haver efeito significativo>95% (P<0,05); * = Probabilidade de haver efeito significativo>90% (P<0,1)

TESTE DE TUKEY – COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE NÍVEIS DE RELAÇÃO C/N DO SOLO

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
C/N 30	C/N 80	-289	218,3	0,5609
	C/N 160	-528	218,3	0,1133
	C/N 320	-1029	218,3	0,0012***
C/N 80	C/N 160	-238,8	218,3	0,6981
	C/N 320	-740,0	218,3	0,0177**
C/N 160	C/N320	-501,2	218,3	0,1405

Continuação

**TESTE DE TUKEY – INTERAÇÃO ENTRE FATORES: FUNGO (CCB 176, CONTROLE)
E RELAÇÃO C/N DO SOLO (30, 80, 160 e 320)**

Variável	Subtraído de	Diferença entre as médias	Diferença mínima significativa	Valor-P
Controle*C/N 30	Controle C/N80	-414	308,7	0,8700
	Controle C/N160	-919	308,7	0,1206
	Controle C/N320	-1856	308,7	0,0004***
	CCB176 C/N30	-799	308,7	0,2293
	CCB176 C/N80	-964	308,7	0,0934
	CCB176 C/N160	-936	308,7	0,1092
	CCB176 C/N 320	-1001	308,7	0,0748
Controle*C/N 80	Controle C/N160	-505	308,7	0,7245
	Controle C/N320	-1442	308,7	0,0048***
	CCB176 C/N30	-385	308,7	0,9053
	CCB176 C/N80	-550	308,7	0,6404
	CCB176 C/N160	-522	308,7	0,6920
	CCB176 C/N 320	-587	308,7	0,5675
Controle*C/N 160	Controle C/N320	-937,3	308,7	0,1086
	CCB176 C/N30	119,9	308,7	0,9999
	CCB176 C/N80	-44,8	308,7	1,0000
	CCB176 C/N160	-17,6	308,7	1,0000
	CCB176 C/N 320	-82,7	308,7	1,0000
Controle*C/N 320	CCB176 C/N30	1057,2	308,7	0,0536
	CCB176 C/N80	892,5	308,7	0,1396
	CCB176 C/N160	919,7	308,7	0,1200
	CCB176 C/N 320	854,6	308,7	0,1716
CCB176*C/N 30	CCB176 C/N80	-164,7	308,7	0,9992
	CCB176 C/N160	-137,5	308,7	0,9998
	CCB176 C/N 320	-202,6	308,7	0,9971
CCB176*C/N 80	CCB176 C/N160	27,20	308,7	1,000
	CCB176 C/N 320	-37,89	308,7	1,000
CCB176*C/N 160	CCB176 C/N 320	-65,09	308,7	1,000