



UEFS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



PPGBIOTEC

MARIA VILMÁRIA FONTES CARVALHO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE SOLO
CONTAMINADO POR HPAs SUBMETIDO À
BIODEGRADAÇÃO PELO FUNGO BASIDIOMICETO
*Pycnoporus sanguineus***

Feira de Santana, BA
2010

MARIA VILMÁRIA FONTES CARVALHO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE SOLO
CONTAMINADO POR HPAs SUBMETIDO À
BIODEGRADAÇÃO PELO FUNGO BASIDIOMICETO
*Pycnoporus sanguineus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Azeredo

Feira de Santana, BA
2010

A minha mãe, pelo investimento na minha formação, aos meus irmãos, pelo amor incondicional que sempre nos uniu e ao meu marido Márcio por todo apoio, amor e compreensão em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que me deu força, coragem, ânimo, sabedoria, para superar as dificuldades e alcançar mais esta vitória em minha vida.

Ao meu pai, por tornar seu amor presença espiritual constante a iluminar e preencher com serenidade e sabedoria todos os meus passos. A minha mãe, que com toda ternura é meu maior exemplo de força, coragem e determinação.

A Marcinho, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo em todos os meus projetos.

Aos meus irmãos pela felicidade e orgulho compartilhados nas minhas conquistas.

Ao professor Doutor Antonio Azeredo pela orientação, disponibilidade e confiança no meu trabalho.

Aos professores Doutores Aristóteles Góes Neto e Hélio Kamida, pelo apoio e atenção no decorrer deste trabalho.

Ao professor Me. Pedro Prates pela atenção, disponibilidade e amizade.

A Jacqueline Miranda, um agradecimento especial por tornar a convivência destes dois anos de estudo em uma amizade para a vida toda.

Aos amigos Cleber Miranda, Getúlio Bonfim, por toda a atenção e apoio e a João Ronaldo pela disponibilidade e colaboração.

As amigas Juliana, Tarsila e Célia por compartilharem desta conquista.

Aos treinadores e amigos de corrida pela prática deste célebre provérbio "*mens sana in corpore sano*".

Agradeço também a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e Laboratório de Pesquisa Microbiológica (LAPEM) pela estrutura física para a realização dos meus experimentos.

A todos os estagiários, Biólogos e funcionários do Laboratório de pesquisa em Microbiologia (LAPEM).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC-UEFS/FIOCRUZ- pela minha formação Acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da Bolsa de estudos oferecida durante o curso de Mestrado.

Muito obrigada!!!

“O que quer que você seja capaz de fazer, ou imaginar ser capaz, comece. Ousadia contém gênio, poder e magia”.

Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 HPAS: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	15
2.2 O FUNGO <i>Pycnoporus sanguineus</i>	19
2.3 TESTES DE TOXICIDADE	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 PONTO DE COLETA DO SOLO	23
3.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS	24
3.3 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO PELO METODO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (<i>EXPERIMENTAL DESIGN</i>)	25
3.4 EXTRAÇÃO DOS HPAS DAS AMOSTRAS DE SOLO	26
3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS HPAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)	26
3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EMPREGANDO-SE BIOINDICADORES	27
3.6.1 Teste com semente de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	27
3.6.2 Teste com <i>Artemia salina</i>	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO (EXPERIMENTAL DESIGN)	30
4.2 PERFIL DE HPAS NAS AMOSTRAS (BAGAÇO + SOLO) COM E SEM O FUNGO	36
4.3 TESTES DE TOXICIDADE	44

A) Sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	44
B) Teste com <i>Artemia salina</i>	48
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas	15
TABELA 2. Propriedades físico-químicas dos HPAs	17
TABELA 3. Classificação dos HPAs quanto a sua carcinogenicidade	19
TABELA 4. Variáveis de condição de crescimento.....	26
TABELA 5. Concentrações individuais dos HPAs analisados na solução padrão concentrada.....	26
TABELA 6. Análise de variância (ANOVA) do crescimento do fungo no primeiro ensaio	29
TABELA 7. Resultados obtidos no primeiro ensaio	30
TABELA 8. Análise de variância (ANOVA) do crescimento do fungo no segundo ensaio	33
TABELA 9. Resultados obtidos no segundo ensaio	33
TABELA 10. Valores médios para as amostras do controle	37
TABELA 11. Valores médios para as amostras do Fungo.....	38
TABELA 12. Teste de T - Controle T ₁ - X Controle T ₅ – 90% de probabilidade.....	39
TABELA 13. Teste de T - Controle T ₅ X Fungo T ₅ – 90% de probabilidade	40
TABELA 14. Teste de T - Controle T ₁ - X Controle T ₅ – 95% de probabilidade.....	41
TABELA 15. Redução de massa dos HPAs que tiveram degradação significativa	42
TABELA 16. Diferenças nas percentagens das taxas de inibição da germinação em sementes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo pelo Teste de T (90% de probabilidade)	39
TABELA 17. Diferenças na % de inibição da germinação de sementes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo usando o Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa	40
TABELA 18. Diferenças nas taxas alongação de raízes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo usando o Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa.....	41
TABELA 19. Diferenças nas taxas de alongação (cm de crescimento) das raízes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo pelo Teste de T pareado (90% de probabilidade)	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura molecular dos 16 HPAs mais importantes.de acordo com a EPA MEIRE (2007).....	16
FIGURA 2. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	20
FIGURA 3. Mapa da Bahia e da localização de Feira de Santana em relação a capital, seguido do ponto de coleta das amostras dentro do perímetro urbano	24
FIGURA 4. Placa ilustrando a germinação das sementes	28
FIGURA 5. Teste da <i>A. salina</i> utilizando o sistema de aquário e sementes	29
FIGURA 6. Primeiro ensaio: Tubos Falcon contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo	30
FIGURA 7. Efeito tridimensional das variáveis: tempo, temperatura e crescimento do primeiro ensaio.....	32
Figura 8. Efeito tridimensional das variáveis: bagaço, umidade e crescimento do primeiro ensaio	32
FIGURA 9. Segundo ensaio: Tubos Falcon contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo	33
FIGURA 10. Diagrama de Pareto para o crescimento do fungo	33
FIGURA 11. Efeito tridimensional das variáveis: tempo, temperatura e crescimento do segundo ensaio	35
FIGURA 12. Efeito tridimensional das variáveis: bagaço, umidade e crescimento do segundo ensaio	35
FIGURA 13. Terceiro ensaio: Frascos Erlenmeyers contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo.....	36
FIGURA 14. HPAs NAF (naftaleno), ACTI (acenaftileno), ACTE (acenafteno), FLU (fluoreno), FEN (fenantreno), ANT (antraceno), FLUOR (fluoranteno), PIR (pireno), B(a)A (benzo[a]antraceno), CRI (criseno), B(b)F (benzo[b]fluoranteno), B(k)F (benzo[k]fluoranteno), B(a)P (benzo[a]pireno), I(1,2,3-cd)P (indeno[1,2,3-cd]pireno), DB(ah)A (dibenzo[ah]antraceno) e B(ghi)P (benzo[ghi]perileno)	37
FIGURA 15. Análise gráfica da germinação	45
FIGURA 16. Análise gráfica do crescimento.....	48
FIGURA 17. Histograma de mortes em função das doses	49

RESUMO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio e organizados em anéis aromáticos fusionados formados durante a combustão incompleta de material orgânico, podendo sua emissão ocorrer de fontes naturais ou antropogênicas, fruto da queima e derramamento de petróleo e as variações na composição das misturas é causada principalmente por diferentes fatores físicos, como temperatura e pressão. Estes compostos são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pele de homens e animais. Uma vez absorvidos pelas células, os HPAs são metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares. A formação de adutos de DNA é considerada essencial na carcinogenicidade química desses xenobiontes. Uma estratégia para a redução dos HPAs de solos contaminados é através da biorremediação utilizando fungos de degradação branca, por apresentar baixo custo e eficiência na remoção dos poluentes. O presente trabalho teve por objetivo estudar parâmetros de efeito no crescimento do *Pycnoporus sanguineus*, estimar diferenças nas concentrações de HPAs em solos tratados e não tratados com fungo e avaliar a toxicidade pós tratamento em modelos vegetal (alface *Lactuca sativa*) e invertebrado (*Artemia salina*). Dos 16 hidrocarbonetos prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) foram observadas uma degradação de 8 destes, com redução 44,7% para o fluoranteno e de 100% para o antraceno. Foram observadas diferenças significativas entre taxa de germinação entre solos tratados e não tratados com *P. sanguineus*. A Concentração Efetiva para causar 50% de inibição da taxa de germinação em sementes de alface (CE_{50}) calculada para de solo inoculado com fungo foi de 0,32 g/mL e de 0,45 g/mL para solo não inoculado, todos aos 35 dias. A Concentração Letal (CL_{50}) foi de 3,84 µg/mL para extratos de solos inoculados com fungo e de 23,3 µg/mL para solos não inoculados com fungo. Tanto o ensaio com sementes de alface como o teste de CL_{50} com *Artemia salina* demonstraram aumento da toxicidade após o tratamento de solos com HPAs com o fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Palavras-chave: HPAs, *Pycnoporus sanguineus*, Biorremediação.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are organic compounds exclusively formed by carbon and hydrogen atoms and organized in different arrangements produced during the incomplete combustion of the organic matter, being resulted from natural and antropogenic sources. The presence of PAHs is due to the burning processes and oil spills and the identity of the mixture of the PAHs in different sources depends on the some physical factors such as temperature and pressure. These compounds present very good solubility in lipids and are easily absorbed in the lungs, intestines and skin of the human and animals. PAHs are metabolized by enzymes in activated compounds reactive with nucleophilic groups present in cellular macromolecules. The DNA adducts formation is a crucial step to the chemical carcinogenicity of these xenobiotics. A strategy to the PAH reduction in contaminated soils is the bioremediation using the white rot fungi species, by its low costs and efficiency in the decrease of these compounds. The present work aimed to evaluate parameters in the *Pycnoporus sanguineus* growing, estimate differences in the PAH concentrations in soils treated or not with fungi, and evaluate the toxicity post treatment in vegetal model using lettuce (*Lactuca sativa*) and in invertebrate (*Artemia salina*). Among the 16 priority PAHs listed by United States Environmental Protection Agency (US EPA) 8 compounds presented degradation with reduction percents varying from 44.7%, in the case of the fluoranthene, to 100% considering the anthracene. It were observed significant differences in the germination rate between non inoculated and inoculated samples. The Effective Concentration to the inhibition of 50% of the germination in lettuce seeds (EC_{50}) was 0.32 g/mL and 0.45 g/mL considering the treated and non treated soil respectively, 35 days after the fungi inoculation. The concentration necessary to result death of 50% of the exposed group (LC_{50}) was 3.84 μ g/ to inoculated soil with fungi and 23.3 μ g/mL to non inoculated one. Both seed and LC_{50} tests showed an increase of the toxicity of the PAH contaminated soils after the *Pycnoporus sanguineus* treatment.

Keywords: PAHs; *Pycnoporus sanguineus*; Bioremediation

1 INTRODUÇÃO

Os HPAs são de grande interesse ambiental, em virtude do seu potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico. Estes compostos são introduzidos no ambiente por fontes naturais e antrópicas, que incluem a queima natural de florestas, as emissões vulcânicas e os afloramentos naturais de petróleo (processos petrogênicos). Alguns organismos, tais como bactérias, algas e fungos, também podem produzir naturalmente HPAs (processos biogênicos), todavia as fontes naturais são infinitamente insignificantes frente às fontes antrópicas. (CAVALCANTE; SILVEIRA; FREIRE, 2007).

Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), classifica os HPAs com base nos potenciais carcinogênicos de 60 destes, frente as diversas exposições ocupacionais a estes compostos, onde estudos recentes demonstram a indução de tumores de pulmão e de pele em animais após a ativação metabólica (KURT et al., 2005).

No solo, HPAs encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores. Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estes compostos é significativo (PEREIRA - NETO, 2000).

Uma estratégia para eliminação dos HPAs dos solos contaminados é através da biorremediação, que é a utilização de processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (HOLLINGER et al., 1997). Esta tecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Segundo Kamida et al., (2005), os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos basidiomicetos degradadores de lignina como eficientes na degradação de grande variedade de compostos, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados.

Os organismos mais efetivos na biodegradação dos materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca (degradam todos os componentes da madeira) e os de decomposição parda (degradam principalmente

polissacarídeos). A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branda (podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades mais baixas). (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Na natureza, os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem principalmente sobre madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal. A elucidação do processo de degradação da lignina conduziu a inúmeras pesquisas para a utilização do fungo da podridão branca em processos biotecnológicos (MELO; AZEVEDO, 1997).

Pelo acima exposto, o presente trabalho teve como objetivo submeter solos contaminados à biodegradação por ação de enzimas fúngicas e avaliar o potencial tóxico dos produtos resultantes com base em modelos vegetal e invertebrado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Submeter solos contaminados à biodegradação por ação de fungo ligninolítico e avaliar o potencial tóxico dos produtos resultantes com base em modelos vegetal alface (*Lactuca sativa*) e invertebrado (*Artemia salina*).

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar através do planejamento experimental o efeito da temperatura, quantidade de bagaço de cana umidade e tempo de incubação no crescimento do fungo em solos contaminados com HPAs;
- ❖ Verificar o perfil de HPAs em solo, submetidos ou não a biodegradação pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*;
- ❖ Avaliar as taxas de germinação de sementes e alongação de raízes de alface expostas ao extrato aquoso do solo inoculado e não inoculado com fungo e calcular a CE_{50} ;
- ❖ Determinar a concentração letal dos extratos aquosos dos compostos para *Artemia salina* (CL_{50})

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HPAs: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos semi-voláteis formados em processos de combustão a alta temperatura (MIGUEL et al, 2001). O processo de queima incompleta de materiais orgânicos, que contém cadeias carbônicas em sua estrutura, é a principal fonte de emissão de HPAs (FANG et al, 2004; MARTINI et al, 2002; VASCONCELLOS et al, 1998). A queima de combustível fóssil em processos industriais, motores de automóveis, sistemas de aquecimento, incineração de resíduos domésticos e industriais, fumaça de cigarros, refinarias de petróleo, contribuem com a emissão. Ainda, várias fontes naturais, incluindo a queima de biomassa em florestas e erupções vulcânicas são consideradas emissoras de HPAs (WISE et al, 1993; PELTONEN et al, 1995; LOPES et al, 1996; VASCONCELLOS et al, 1998; PEREIRA NETTO et al, 2000).

Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados (PEREIRA NETTO et al, 2000). Estas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais como o ar, água e sedimento, em diferentes níveis de concentração (WISE et al, 1993; HLAVAY et al, 1997). Os níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas são mostrados na Tabela 1 (PEREIRA NETTO et al, 2000).

TABELA 1 – Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng.m ⁻³
Solo	0,8 ng.Kg ⁻¹ a 100 mg.kg ⁻¹
Água	2,5 a 500 ng.L ⁻¹
Plantas	< 150 µg.Kg ⁻¹
Alimentos	0,1 a 20 µg.kg ⁻¹

Fonte: Pereira Netto *et al*, (2000).

As estruturas de alguns dos 16 HPAs identificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) como os principais carcinogênicos e/ou mutagênicos são mostrados na Figura 1 (PELTONEN et al, 1995). São eles: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pirileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (POTIN et al., 2004).

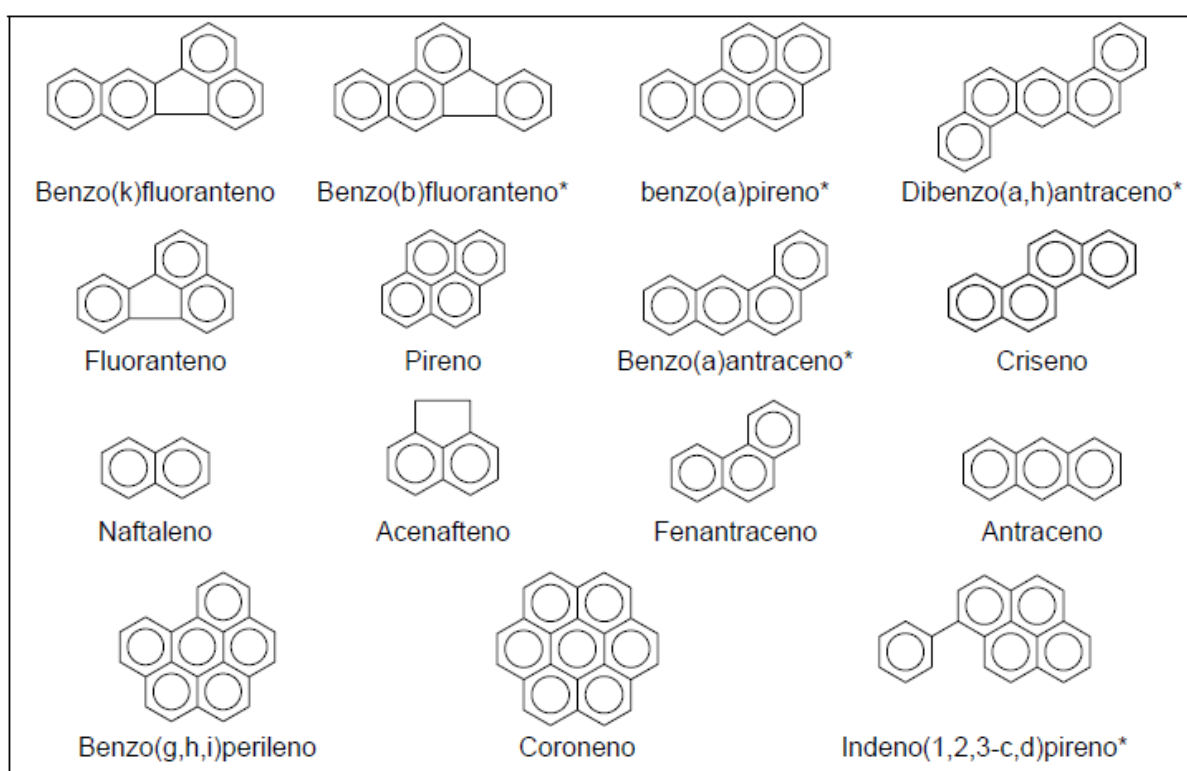


FIGURA 1 – Estrutura molecular dos 16 HPAs mais importantes, de acordo com a EPA MEIRE (2007).

Os HPAs são gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção industrial dos HPAs (fabricação de corantes, fibras sintéticas, preservantes de madeira), à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HPAs devido aos postos de combustíveis,

que podem chegar ao ar, solo, subsolo e às águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HPAs nas cidades (LIMA et al., 1998).

HPAs como benzo(a)pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, criseno etc., quando presentes em resíduo são suficientes para classificá-los como resíduo perigoso, dado as suas características lipofílicas e as características de cada compartimento ambiental (SISINNO et al., 2003). Características físico-químicas podem contribuir para entendimento do comportamento ambiental e biológico destes compostos (Pereira Neto, 2000). O que foi representado pelo composto naftaleno que possui um baixo peso molecular e elevada volatilidade (Tabela 2).

TABELA 2 - Propriedades físico-químicas dos HPA;

HPAs	Nº Anéis	PM (g.mol ⁻¹)	S (mg.L ⁻¹)	PV (Pa)	H (Pa m ³ .mol ⁻¹)	Log K _{oa}
NAFTALENO	2	128	31	10,4	43,01	3,37
ACENAFTILENO	3	150	16,1	0,9	8,4	4,00
ACENAFTENO	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
FLUORENO	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
FENANTRENO	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
ANTRACENO	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
FLUORANTENO	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
PIRENO	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
B(A)ANTRACENO	4	228	0,011	2,80.10 ⁻⁵	0,581	5,91
CRISENO	4	228	nd*	5,70.10 ⁻⁷	0,065	5,86
B(B)FLUORANTENO	5	252	0,0015	nd*	nd*	5,80
B(K)FLUORANTENO	5	252	0,0008	5,20.10 ⁻⁸	0,016	6,00
B(A)PIRENO	5	252	0,0038	7,00.10 ⁻⁷	0,046	6,04
INDENO[1,2,3-ED]PIRENO	6	278	nd*	nd*	0,003	nd*
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	5	278	0,0006	3,70.10 ⁻¹⁰	nd*	6,75
BENZO(G,H,I)PERILENO	6	268	0,00026	nd*	0,075	6,50

PM, peso molecular (g.mol⁻¹); *S*, solubilidade (mg.L⁻¹); *PV*, pressão vapor (Pa-Pascal); *H*, constante de Henry (Pa m³.mol⁻¹), *Log Koa*, coeficiente de partição (ectanol/água). *nd- não determinado. Adaptado de Meire et al. (2007).

A alta lipossolubilidade dos HPAs levam estes a rápida absorção pelos pulmões, intestinos e pela pele de animais. Estudos sobre a retenção pulmonar de HPAs na forma cristalina e de HPAs em solução após instilação intra-traqueal em ratas indicaram que eles são rapidamente absorvidos pelo trato respiratório. Todavia, HPAs inalados são predominantemente absorvidos sob a forma de partículas de fuligem. Após a deposição nas vias aéreas as partículas podem ser eliminadas por reflexo bronquial. Os HPAs podem ser parcialmente removidos das partículas por transporte na mucosa ciliada ou podem penetrar nas células do epitélio bronquial, onde são metabolizados (WHO, 1987).

Percival Pott, em 1775, foi que primeiro relacionou a exposição ocupacional humana à fuligem com a formação de tumores de pele e escroto em limpadores de chaminé na Europa (IARC, 1985). Estudos demonstram a indução de tumores de pulmão e de pele em animais após a ativação metabólica de HPAs (KURT et al., 2005).

A relação com o mecanismo de carcinogênese e a estrutura molecular dos HPAs, são apresentados pela IARC (WHO, 2005) de acordo com uma classificação de HPAs e de alguns materiais que os contêm, conforme os dados disponíveis na Tabela 3.

TABELA 3 - Classificação dos HPAs quanto a sua carcinogenicidade.

HPAs	GRUPO SEGUNDO IARC	RESULTADO
BENZO(A)PIRENO	1	Suficientes evidências em animais e fortes evidências em seres humanos.
CICLOPENTA(C,D)PIRENO	2 ^a	Provável carcinógeno para seres humanos e suficientes evidências para animais.
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	2 ^a	
DIBENZO(A,L)PIRENO	2 ^a	
BENZO(A)ANTRACENO	2b	Possíveis carcinógenos para seres humanos baseado em suficientes evidências com animais.
BENZO(B)FLUORATENO	2b	
BENZO(J)FLUORATENO	2b	
BENZO(K)FLUORATENO	2b	
CRISENO	2b	
DIBENZO(A,H)PIRENO	2b	
DIBENZO(A,I)PIRENO	2b	
INDENO(1,2,3-C,D)PIRENO	2b	
5-METIL-CRISENO	2b	
BENZO(J)ACENTRILENO	2b	
BENZO(C)FENATRENO	2b	

Fonte: IARC – International Agency for Research on Cancer adaptado de WHO (2005).

Uma estratégia para eliminação dos HPAs dos solos contaminados é através da biorremediação, que é a utilização de processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (HOLLINGER et al., 1997). Esta tecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

2.2 O FUNGO *Pycnoporus sanguineus*

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo filamentosos, basidiomiceto, da ordem Polyporales e Família Polyporaceae. Encontra-se amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em regiões de clima mais ameno e em florestas tropicais como a Amazônia. O *P. sanguineus* é conhecido popularmente como orelha-de-pau, sendo encontrado em madeira, onde fixam e se alimentam (ESPOSITO et al., 1993).

A degradação de lignina (polímero natural presente na estrutura das plantas superiores) por fungos de decomposição branca tem sido estudado há mais de meio século. Foi somente no início dos anos 80, entretanto, que uma melhor compreensão sobre o mecanismo da degradação da lignina foi conseguido. O processo envolve a ação de pelo menos três enzimas: LiP (Lignina Peroxidase), MnP (manganês Peroxidase) e Lacase, sendo que as duas primeiras são consideradas mais importantes no processo de degradação (CAMERON et. al, 2000). A lacase pode participar tanto da despolimerização quanto da polimerização (SCHAUER et. al, 2001).



FIGURA 2 - *Pycnoporus sanguineus*. Foto: www.ccb.ufsc.br/bot/micologia/fotos.html

Os fungos constituem um grupo diverso de organismos que possuem características de elevado interesse econômico e biotecnológico. Estes são definidos de forma geral como: “organismos eucarióticos, caracteristicamente miceliais, mas apresentando também organismos unicelulares (leveduras), heterotróficos, que se nutrem por absorção e se reproduzem por esporos” (GUSMÃO & MAIA, 2006).

Várias enzimas de origem fúngica têm sido utilizadas ou são potencialmente úteis para as diversas atividades industriais, sendo necessárias mais pesquisas sobre as enzimas de fungos presentes em áreas ainda pouco exploradas. O semi-árido ainda é uma área pouco estudada quanto a sua diversidade e potencial biotecnológico, por isso, se constitui em um ambiente de grande interesse na prospecção de novas moléculas bioativas (ALVES, 2008).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* possui como característica a capacidade de degradar enzimaticamente a estrutura da lignina presente na parede celular vegetal. Tais enzimas são de interesse em muitas atividades industriais e de pesquisa destacando-se o tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose e na

biorremediação de solos contaminados dentre outras (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Em geral, os fungos basidiomicetos ligninolíticos são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (BARR & AUST 1994). Porém, a presença do poluente orgânico nas culturas fúngicas pode interferir em processos metabólicos vitais para o organismo, incluindo alterações na produção e na atividade das enzimas ligninolíticas. Em organismos eucariotos, os xenobióticos podem promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais (JONSSON, 2005).

Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: (1) transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos, e (2) o uso de enzimas extraídas do meio de cultura. Contudo, a escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições ambientais empregadas durante o processo de biorremediação (TRUPKIN et al. 2003).

2.3 TESTES DE TOXICIDADE

A Toxicologia tem como objeto fundamental estudar a intoxicação sob todos os aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação (clínica e/ou laboratorial) de efeitos adversos que revelam um estado patológico causado pela interação de um toxicante, isto é, de um agente químico com um organismo. Os agentes tóxicos são, portanto, substâncias químicas capazes de quebrar o equilíbrio orgânico, ou seja, substâncias que provocam alterações na homeostase do organismo (SOUZA, 2008).

Desse modo, a toxicidade é uma propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo. Esta maior ou menor gravidade de ação dependerá de fatores relacionados com a substância química, com o organismo e com o ambiente onde a ação ocorre (SOUZA, 2008).

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda são expressos através da concentração letal mediana (CL_{50}) que é a concentração da substância química testada capaz de causar efeito ou mortalidade a 50% da população em

estudo. Valores elevados da CL_{50} ameaçam a integridade, sobrevivência da espécie e o equilíbrio e dinâmica do ecossistema (SOUZA, 2008).

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda são expressos através das concentrações efetivas medianas (CE_{50}) ou concentrações letais medianas (CL_{50}) que são as concentrações da substância química testada capazes de causar efeito ou mortalidade a 50% da população em estudo. Valores acima da CE_{50} ou CL_{50} ameaçam a integridade, sobrevivência da espécie e o equilíbrio e dinâmica do ecossistema (SOUZA, 2008).

Testes rápidos, fáceis e cuidadosos predizem sobre a segurança ou risco à exposição humana e de outros organismos vivos, a compostos puros ou complexas misturas químicas. Cada vez mais os bioensaios, passam a ser importantes na análise de riscos ambientais. O uso de sementes tem sido recomendado pelo *National Water Research Institute (NWR)* do Canadá para a avaliação de toxicidade de efluentes, solo ou sedimentos. São utilizadas sementes de alface ou outras de crescimento rápido que tenham pouca reserva de energia. Comumente avalia-se a inibição da germinação e também a alongação da raiz, cujo crescimento é inibido por pequenas concentrações do composto tóxico, tornando-se um indicador mais sensível dos efeitos biológicos (KAMIDA, 2004).

O custo da implantação e manutenção da cultura de *Artemia salina* é muito baixo, o que faz desta, um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da biologia. Esta é amplamente conhecida como indicador de toxicidade em bioensaio (*Brine Shrimp Test*), utilizando-se a Concentração Letal (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PONTO DE COLETA DO SOLO

As amostras de solo foram coletadas na cidade de Feira de Santana, estas foram georreferenciadas (GPS-Garmin, Edge 705) com coordenadas 12° 15' 24" de latitude Sul e 38° 57'53" longitude oeste, a escolha da área considerou locais com maior incidência e deposição de material particulado de derivados do petróleo. Assim o ponto determinado foi próximo a um posto de combustível em uma área de muita movimentação de veículos. As amostras foram coletadas no período de estiagem e levadas ao laboratório para o devido acondicionamento após o processo de retirada de partículas maiores através do processamento em peneira com 0,074mm, o solo foi seco em estufa de temperatura fixa 110°C em seguida acondicionado em recipientes de vidro e fora do alcance da luz, para evitar perdas nas quantidades dos diferentes HPAs, permanecendo em temperatura ambiente até o início das análises.



Figura 3 - Mapa de Feira de Santana, localização dos pontos de coleta das amostras. Foto: A autora (2010)

3.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

O fungo *Pycnoporus sanguineus* testado para a degradação dos HPAs foi isolado da região do semi-árido baiano e será depositado na Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB), localizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). O mesmo foi ativado em meio Ágar-Extrato de Malte e Levedura. O inóculo foi distribuído em placas contendo partes do micélio. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28°C por sete dias. Após esse período, foi observado o crescimento do fungo, posteriormente conservados a 4°C, quando então foram repicados para os meios das amostras testes nos ensaios e posteriormente em frascos *Erlenmeyers*.

3.3 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO PELO MÉTODO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (*EXPERIMENTAL DESIGN*)

Dois ensaios foram realizados a fim de determinar as condições ideais de crescimento do fungo e as variáveis estudadas foram: temperatura, tempo, umidade, quantidade do bagaço de cana-de-açúcar. As amostras com solo foram preparadas em meio contendo bagaço, micélio do fungo e água, atendendo a uma condição determinada de umidade (Tabela 4) e distribuídas em tubos do tipo Falcon, em seguida foram acondicionadas em BOD. As medidas de crescimento do micélio foram feitas utilizando régua milimetrada. Os dados foram analisados pelo método do planejamento experimental usando o programa Statistica 6.0.

TABELA 4: Variáveis de condição de crescimento

ENSAIOS	1			2			
	CÓDIGO	-1	0	+1	-1	0	+1
T(°C)		21	28	35	30	35	40
T(DIAS)		5	10	15	10	15	20
BAGAÇO (%)		5	10	15	10	15	20
UMIDADE (%)		40	60	80	60	75	90

3.4 EXTRAÇÃO DOS HPAs DAS AMOSTRAS DE SOLO

A extração foi baseada no método EPA 3560. Foram pesadas cerca de 10 gramas das amostras em cartucho de celulose. A amostra foi fortalecida com padrões surrogates 2-Fluor Bifenila e p-Terfenil-d14 e extraídas com diclorometano em soxhlet por 16 horas. O extrato total foi então reduzido em um concentrador do tipo Kuderna-Danish até um volume de 1 mL.

3.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS HPAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

O método usado para separação e detecção dos HPAs foi feito de acordo com o estabelecido pela EPA (Método 8270). O extrato final obtido na etapa de extração foi injetado em um Cromatógrafo Gasoso (CG) Agilent 7890 acoplado a espectrômetro de massas 5975N. A fase móvel utilizada foi Hélio com fluxo de 1,5 mL/min e uma coluna de fase estacionária DB-5 2 marca J&W com tamanho de 30 metros, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de fase estacionária 250 μm .

A programação do forno CG foi a descrita a seguir. injeção *splitless*, com o injetor a 290 °C. Temperatura inicial da coluna: 50 °C. Isotérmica por 2 minutos e taxa de aquecimento de 35 °C/min até 100 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min até 310 °C, com isotérmica em 310 °C por 15 minutos. O espectrômetro operou em monitoramento seletivo de íons (Modo SIM). As concentrações das amostras foram calculadas com base em soluções de padrão analítico dos 16 HPAS prioritários pela EPA com concentrações individuais na solução concentrada conforme a Tabela 5.

TABELA 5 - Concentrações individuais dos HPAs analisados na solução padrão concentrada.

HPA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)
NAFTALENO	2009
ACENAFTENO	2003
ACENAFTILENO	2001
FLUORENO	2005
FENANTRENO	2009
ANTRACENO	2003
FLUORANTENO	2002
PIRENO	2004
BENZO(A)ANTRACENO	2003
CRISENO	2003
BENZO(B)FLUORANTENO	2000
BENZO(K)FLUORANTENO	2006
BENZO(A)PIRENO	2006
INDENO(1,2,3-CD)PIRENO	2006
DIBENZO(AH)ANTRACENO	2002
BENZO(GHI)PERILENO	2002

3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EMPREGANDO-SE BIOINDICADORES

3.6.1 Teste com semente de alface (*Lactuca sativa* L.)

Três marcas de sementes comercializadas no mercado foram testadas em um ensaio prévio de acordo com as condições pré-determinadas, utilizando água como substrato com a finalidade de confirmação da viabilidade da taxa de germinação descrita pelo fabricante. A partir destes resultados, foi escolhida a marca das sementes que foram aplicadas nos testes para avaliar o efeito dos extratos aquosos obtidos do solo (sem e com fungo aos 35 dias) sobre a germinação das sementes e alongação das raízes.

O material obtido da extração, foi filtrado em membrana (Millipore – 0,22 µm) utilizando cinco concentrações de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% (v/v%) de uma solução “mãe” feita com 40 g de solo e 70 mL de água, que correspondem a 0,57; 0,43; 0,29 e 0,14 g/mL para o volume final de 2 mL. Cada solução obtida foi utilizada para embeber discos de papel de filtro (Whatman n.1) colocados em Placas de Petri

(9 cm de diâmetro), onde foram distribuídas 20 sementes de alface por placa. As placas foram incubadas em temperatura ambiente, envoltas em papel alumínio e após 48 horas, avaliadas quanto ao teste das sementes e do tamanho das raízes germinadas foi medido com auxílio de régua milimetrada. A avaliação foi feita em triplicata. Os resultados foram submetidos ao teste de Tukey e teste de T. A CE_{50} foi calculada através de análise de regressão linear (r^2) com base na equação da reta gerada. A metodologia utilizada para este estudo baseou-se em Dutka (1997) com algumas adaptações.



FIGURA 4 - Placa ilustrando germinação de sementes. Foto: A autora (2010)

3.6.2 Teste com *Artemia salina*

O bioensaio com *A. salina* foi baseado na técnica descrita por Sánchez- Bayo (2006) com algumas modificações. Foram utilizados 10mg de cistos viáveis de *A. salina* em 1 L de água preparada com 30 g de sal marinho sintético. Os ovos de *A. salina* foram incubados sob a iluminação artificial por 48h em sistema de aquário (25 x 24 x 12 cm) com bombeamento para que houvesse a eclosão das larvas (Figura 5). Foram utilizadas para este teste extratos aquosos do tempo 5 (35 dias) das amostras inoculada e não inoculada com o fungo e estes foram diluídos nas concentrações de 0, 5, 50 e 500 mg/mL por adição de solução salina (NaCl a 0,45%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata para as amostras contendo o fungo e amostras controle, com 10 larvas por tubos durante 24hrs. A CL_{50} foi calculada pelo teste dos Probitos usando o programa SPSS 9.0.

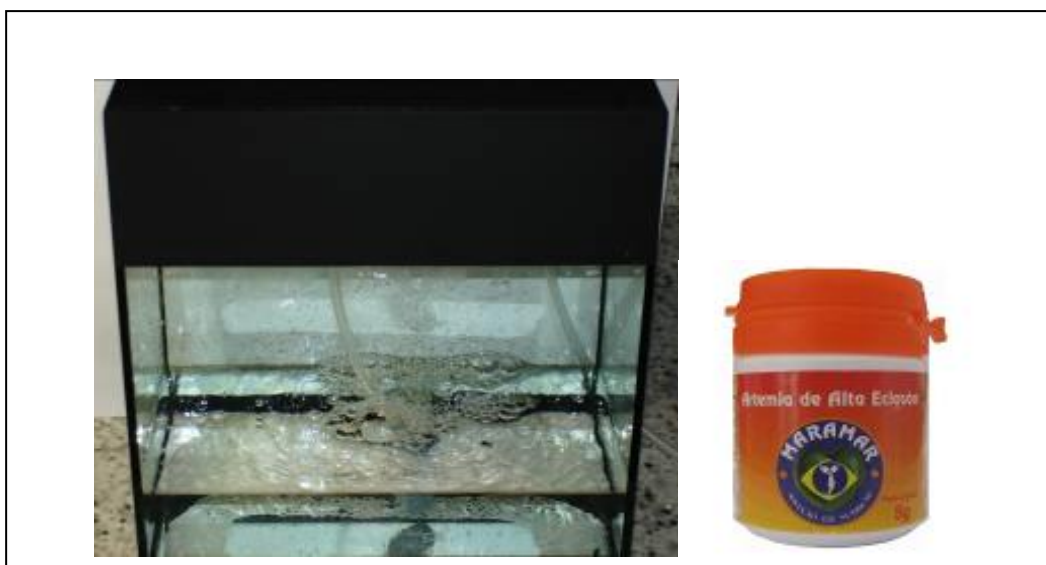


FIGURA 5 - Teste da *A. salina* utilizando o sistema de aquário e sementes Foto: A autora (2010)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DO FUNGO (EXPERIMENTAL DESIGN)

No primeiro planejamento experimental foram testadas três condições de temperatura (21, 28 e 35°C), três tempos (5, 10 e 15 dias), três percentagens de bagaço na mistura (5, 10 e 15% do peso de bagaço) (Figura 6) e três níveis de umidade (40, 60 e 80%). Neste ensaio nenhuma das condições testadas foi significativa ($p < 0,05$) e o F calculado (1,03) fornecido pela ANOVA da regressão foi menor que o F tabelado (1% = 5,81; 5% = 3,35; 10% = 2,54 e 25 % = 1,63) e o coeficiente de regressão também foi considerado baixo ($r^2 = 0,56291$) (Tabela 6).



FIGURA 6 - Primeiro ensaio: Tubos Falcon contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo. Foto: A autora (2009)

TABELA 6: Análise de variância (ANOVA) do crescimento do fungo no primeiro ensaio.

	SQ	GL	MQ	FCALC	FTAB	r^2
REGRESSÃO	17,2500	10	1,7250	1,0300	1% - 5,81	0,56291
RESÍDUO	13,3942	8	1,6743		5% - 3,35	
FALTA DE AJUSTE	11,9342	6			10% - 2,54	
ERRO PURO	1,4600	2			25% - 1,63	
TOTAL	30,6442	18				

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; QM=quadrado médio; Fcalc= valor de F calculado; Ftab= valor de F tabelado; r^2 = coeficiente de regressão.

A falta de significância dos efeitos neste primeiro planejamento pode ter sido causada pela ausência de resposta (cm de crescimento) em muitas das parcelas testadas como mostra a Tabela 7. Mesmo não sendo significativas as superfícies de resposta mostraram que o aumento de magnitude nos parâmetros testados poderia fazer com que houvesse uma melhor resposta no crescimento do fungo (Figuras 7 e 8).

TABELA 7 - Resultados obtidos no primeiro ensaio

Amostra (N)	T (°C)	Temp. (dias)	Bagaço (%)	Umidade (%)	Resp. (cm)	Solo (g)	Bag. (g)	M. S (g)	H ₂ O (mL)
1	35	15	15	80	4,3	4,25	0,75	5	4
2	35	15	15	40	S/R	4,25	0,75	5	2
3	35	15	5	80	S/R	4,75	0,25	5	4
4	35	15	5	40	1	4,75	0,25	5	2
5	35	5	15	80	3	4,25	0,75	5	4
6	35	5	15	40	S/R	4,25	0,75	5	2
7	35	5	5	80	S/R	4,75	0,25	5	4
8	35	5	5	40	1	4,75	0,25	5	2
9	21	15	15	80	1,5	4,25	0,75	5	4
10	21	15	15	40	1	4,25	0,75	5	2
11	21	15	5	80	1	4,75	0,25	5	4
12	21	15	5	40	S/R	4,75	0,25	5	2
13	21	5	15	80	S/R	4,25	0,75	5	4
14	21	5	15	40	S/R	4,25	0,75	5	2
15	21	5	5	80	S/R	4,75	0,25	5	4
16	21	5	5	40	S/R	4,75	0,25	5	2
17	28	10	10	60	1,5	4,5	0,5	5	3
18	28	10	10	60	3,2	4,5	0,5	5	3
19	28	10	10	60	2,2	4,5	0,5	5	3

S/R – sem resposta

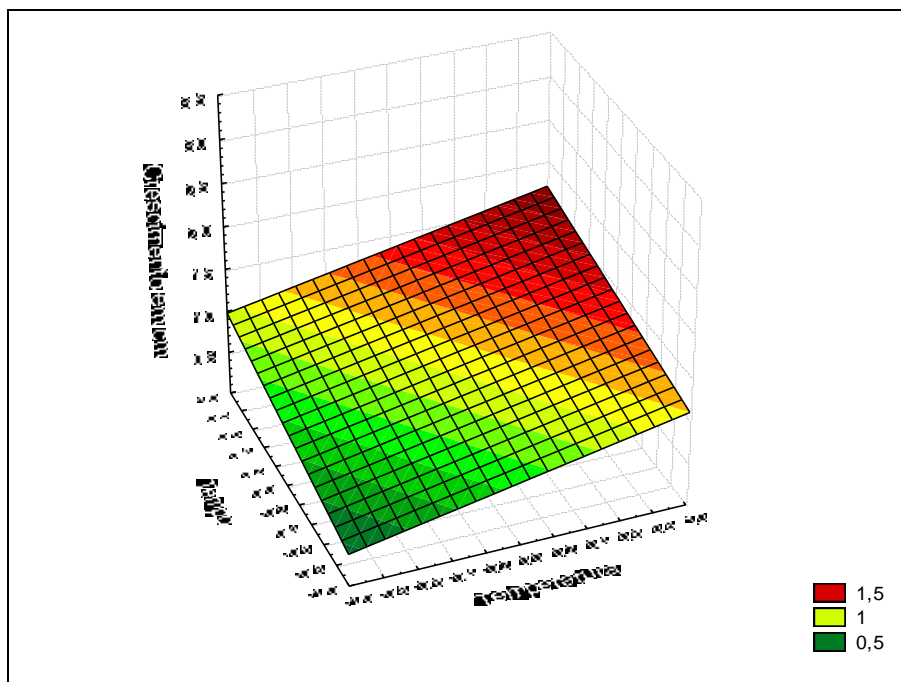


FIGURA 7 - Efeito tridimensional das variáveis: tempo, temperatura e crescimento do primeiro ensaio

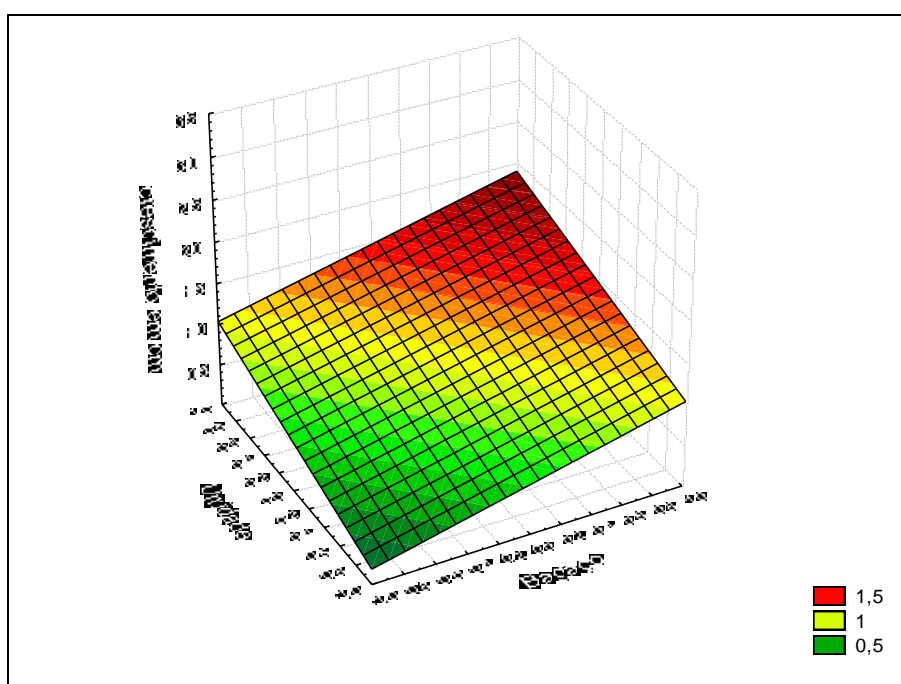


FIGURA 8 - Efeito tridimensional das variáveis: bagaço, umidade e crescimento do primeiro ensaio

Com base nestes resultados partiu-se para a estratégia de um segundo planejamento experimental e foram testadas novas condições de temperatura (30, 35, e 40°C), tempos (10, 15 e 20 dias), percentagens de bagaço na mistura (10, 15 e 20% do peso de bagaço) (Figura 9) e níveis de umidade (60, 75 e 90%).



FIGURA 9 - Segundo ensaio: Tubos Falcon contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo Foto: A autora (2009)

A temperatura ou parâmetro (1) A do gráfico de Pareto (Figura 10) foi a única considerada significativa dentre as quatro variáveis estudadas neste segundo planejamento experimental. A ANOVA da regressão mostrou um bom coeficiente de regressão ($r^2=0,9640$) (Tabela 8).

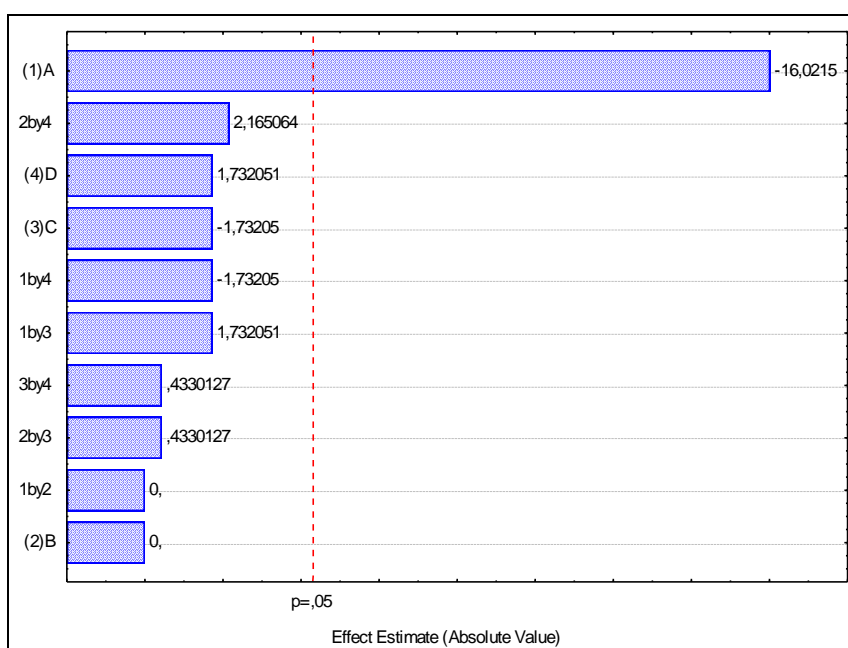


FIGURA 10 - Diagrama de Pareto para o crescimento do fungo

TABELA 8: Análise de variância (ANOVA) do crescimento do fungo no segundo ensaio.

	SQ	GL	MQ	FCALC	FTAB	r ²
REGRESSÃO	91,2499	10	9,1249	21,2412	1% - 5,81	0,9640
RESÍDUO	3,4079	8	0,4259		5% - 3,35	
					10% - 2,54	
FALTA DE AJUSTE	2,7412	6				
ERRO PURO	0,6667	2			25% - 1,63	
TOTAL	94,6578	18				

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; QM=quadrado médio;
Fcalc= valor de F calculado; Ftab= valor de F tabelado; r²= coeficiente de regressão.

O F calculado (21,24) fornecidos pela ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado (1% = 5,81; 5 % = 3,35; 10% = 2,54 e 25% = 1,63) mostrando que o modelo de regressão pode ser explicado com 99% de probabilidade, ou seja, foi significativo e preditivo para o crescimento do fungo nas condições estudadas (Tabela 9).

TABELA 9- Resultados obtidos no segundo ensaio

Amostr a (N)	T (°C)	Temp. (dias)	Bagaço (%)	Umidad e (%)	Resp. (cm)	Solo (g)	Bag. (g)	Mas (g)	H ₂ O (mL)
1	40	20	20	90	S/R	4,0	1,0	5	4,5
2	40	20	20	60	S/R	4,0	1,0	5	3,0
3	40	20	10	90	S/R	4,5	0,5	5	4,5
4	40	20	10	60	S/R	4,5	0,5	5	3,0
5	40	10	20	90	S/R	4,0	1,0	5	4,5
6	40	10	20	60	S/R	4,0	1,0	5	3,0
7	40	10	10	90	S/R	4,5	0,5	5	4,5
8	40	10	10	60	S/R	4,5	0,5	5	3,0
9	30	20	20	90	5,5cm	4,0	1,0	5	4,5
10	30	20	20	60	3,0cm	4,0	1,0	5	3,0
11	30	20	10	90	6,0cm	4,5	0,5	5	4,5
12	30	20	10	60	4,0cm	4,5	0,5	5	3,0
13	30	10	20	90	4,0cm	4,0	1,0	5	4,5
14	30	10	20	60	4,0cm	4,0	1,0	5	3,0
15	30	10	10	90	5,0cm	4,5	0,5	5	4,5
16	30	10	10	60	5,5cm	4,5	0,5	5	3,0
17	35	15	15	75	1,0cm	4,25	0,75	5	3,75
18	35	15	15	75	2,0cm	4,25	0,75	5	3,75
19	35	15	15	75	2,0cm	4,25	0,75	5	3,75

*S/R – sem resposta

As superfícies de resposta gerada nesta análise (Figura 11 e 12) mostra que a variável crescimento do fungo tem o comportamento de diminuir nas parcelas com maiores quantidades de bagaço e em menores umidades.

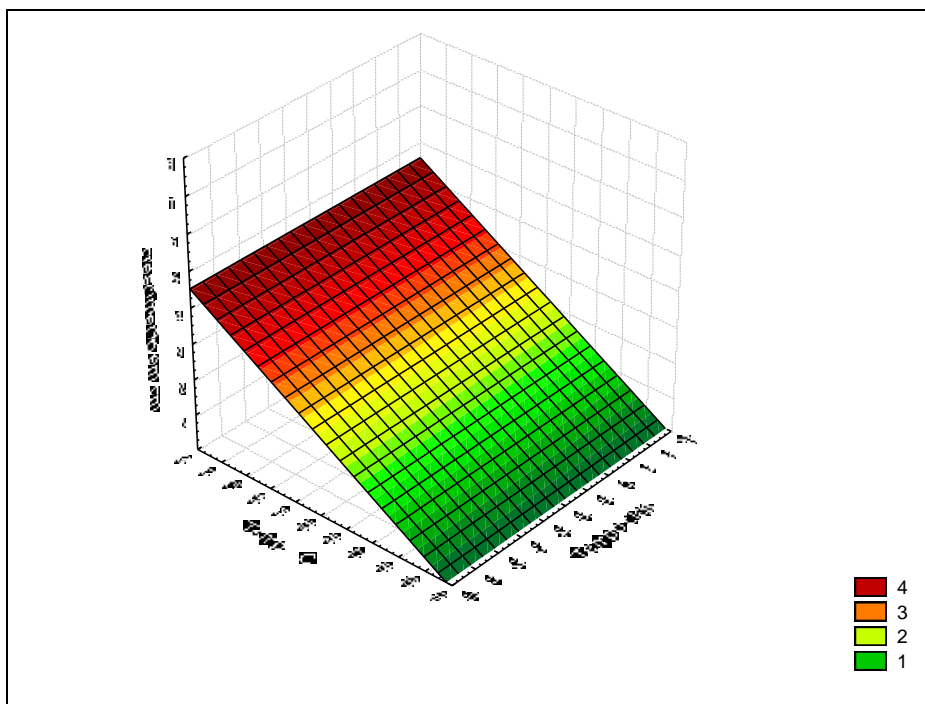


FIGURA 11 - Efeito tridimensional das variáveis: tempo, temperatura e crescimento do segundo ensaio

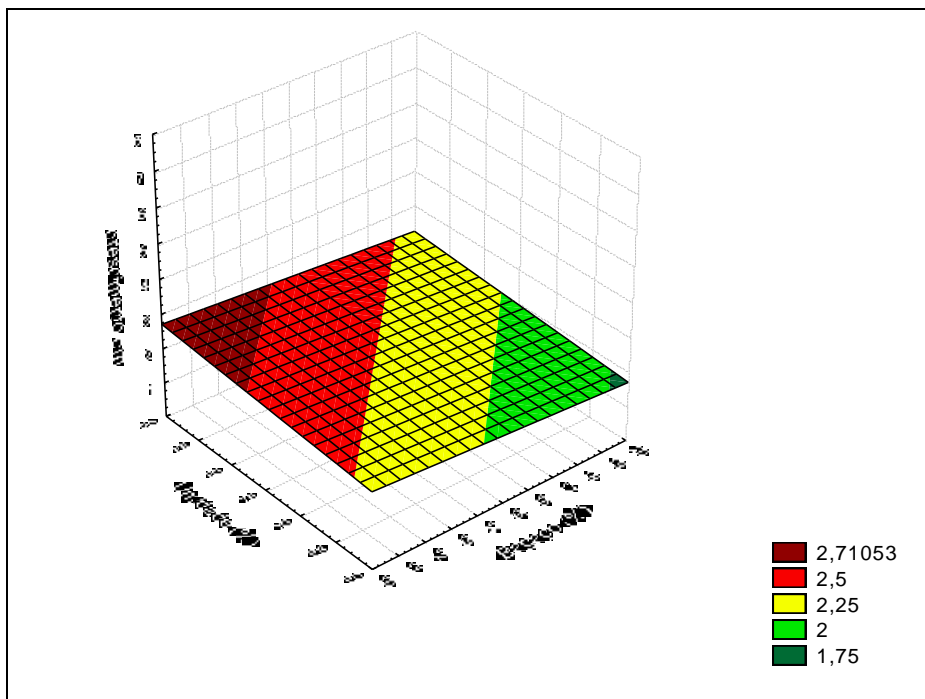


FIGURA 12 - Efeito tridimensional das variáveis: bagaço, umidade e crescimento do segundo ensaio

Foi ainda observada uma resposta considerável de crescimento do fungo no final do sétimo dia e prosseguindo com crescimento estável até o final, contudo não foi observado um crescimento gradativo ao longo do período, mostrando-se que a temperatura elevada e a perda da umidade por um período mais prolongado pode ser um fator limitante para o desenvolvimento do mesmo.

Os parâmetros das melhores condições repetidos no segundo ensaio foram reproduzidos em frascos Erlenmeyer de 500mL (Figura 13) para todos os ensaios de degradação dos HPAs e de toxicidade.



FIGURA 13 - Terceiro ensaio: Frascos Erlenmeyers contendo meio (solo + bagaço de cana + água) inoculados com o fungo Foto: A autora (2009)

4.2 PERFIL DE HPAs NAS AMOSTRAS (BAGAÇO + SOLO) COM E SEM O FUNGO

A metodologia de avaliação aplicada apresentou limites de detecção variando de 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o dibenzo(ah)antraceno a 16,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o naftaleno, dentro do descrito pela literatura (ZHENG et al., 2002). Dos 16 HPAs considerados de interesse ambiental pela EPA, foram encontrados 15 compostos nas amostras, com exceção do acenaftileno. (Figura 14).

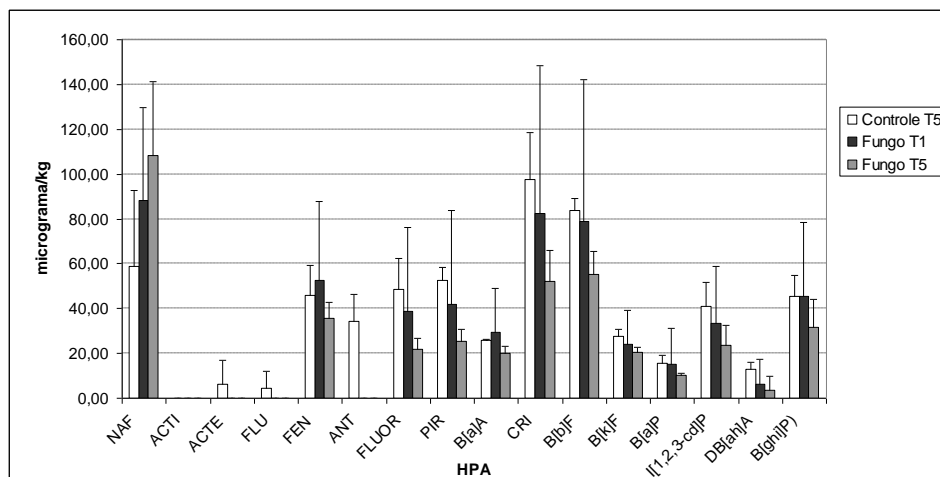


FIGURA 14 - HPAs: NAF (naftaleno), ACTI (acenaftileno), ACTE (acenafteno), FLU (fluoreno), FEN (fenantreno), ANT (antraceno), FLUOR (fluoranteno), PIR (pireno), B(a)A (benzo[a]antraceno), CRI (criseno), B(b)F (benzo[b]fluoranteno), B(k)F (benzo[k]fluoranteno), B(a)P (benzo[a]pireno), I(1,2,3-cd)P (indeno[1,2,3-cd]pireno), DB(ah)A (dibenzo[ah]antraceno) e B(ghi)P (benzo[ghi]perileno).

Os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação dos HPAs analisados são mostrados na Tabela 10 e 11. As concentrações médias dos HPAs para os controles variaram de não detectado (ND) para o acenaftileno, acenafteno e o fluoreno até 97,78 µg/kg de criseno. Nas amostras inoculadas com o fungo as concentrações médias variaram de ND o acenaftileno, acenafteno e o fluoreno até 82,32 µg/kg de criseno.

TABELA 10: Valores médios para as amostras do controle

VALORES ($\mu\text{G/KG}$)	CT1 MÉDIA \pm DP	CT1 CV (%)	CT5 MÉDIA \pm DP	CT5 CV (%)
NAFTALENO	23,61 \pm 12,41	52,54	58,86 \pm 33,72	57,29
ACENAFTILENO	ND		ND	
ACENAFTENO	ND		6,20 \pm 10,75	173,21
FLUORENO	ND		4,35 \pm 7,54	173,21
FENANTRENO	27,57 \pm 33,97	123,24	46,12 \pm 12,99	28,17
ANTRACENO	4,93 \pm 4,83	98,03	34,14 \pm 12,32	36,09
FLUORANTENO	20,42 \pm 23,34	114,33	48,68 \pm 13,92	28,59
PIRENO	24,17 \pm 26,66	110,30	52,70 \pm 5,79	10,99
B(A)ANTRACENO	20,58 \pm 9,49	46,10	25,71 \pm 0,64	2,50
CRISENO	66,39 \pm 35,76	53,87	97,78 \pm 20,70	21,18
B(B)FLUORANTENO	66,10 \pm 32,92	49,81	83,85 \pm 5,35	6,38
B(K)FLUORANTENO	21,83 \pm 10,31	47,24	27,54 \pm 3,42	12,42
B(A)PIRENO	39,88 \pm 53,30	133,66	15,47 \pm 3,51	22,65
INDENO	19,63 \pm 20,97	106,80	41,20 \pm 10,63	25,81
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	6,85 \pm 7,69	112,25	12,86 \pm 3,30	25,65
BENZO(G,H,I)PERILENO	27,32 \pm 30,14	110,33	45,37 \pm 9,24	20,36

M=média aritmética; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação. ND- não detectado

TABELA 11: Valores médios para as amostras do Fungo

VALORES (µG/KG)	FT1	FT1	FT5	FT5
	MÉDIA ± DP	CV (%)	MÉDIA ± DP	CV (%)
NAFTALENO	88,45±41,34	46,74	108,38±32,89	30,35
ACENAFTILENO	ND		ND	
ACENAFTENO	ND		ND	
FLUORENO	ND		ND	
FENANTRENO	52,65± 35,33	67,11	35,58±6,99	19,65
ANTRACENO	ND		0	
FLUORANTENO	38,65± 37,45	96,87	21,78±4,76	21,84
PIRENO	42,04± 41,67	99,11	25,25±5,45	21,59
B(A)ANTRACENO	29,51±19,64	66,56	20,24±3,10	15,29
CRISENO	82,32±66,11	80,30	52,33±13,84	26,45
B(B)FLUORANTENO	79,09±62,96	79,62	55,22±10,30	18,65
B(K)FLUORANTENO	24,22±15,01	61,98	20,35±2,51	12,31
B(A)PIRENO	15,17±16,01	105,55	10,31±0,92	8,89
INDENO	33,57±25,34	75,48	23,78±8,89	37,37
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	6,35±11,00	173,21	3,57±6,19	173,21
BENZO(G,H,I)PERILENO	45,66±32,75	71,73	31,50±12,44	39,50

M=média aritmética; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação. ND- não detectado

Pelo teste de T com 90% de probabilidade verificou-se diferenças significativas nas concentrações de HPAs entre o controle (não inoculado) e o tratamento com fungo após 35 dias de incubação (Tabela 13). Entre os tratamentos com fungo nos dias 7 e 35 após a incubação não foram detectadas diferenças significativas pelo teste de T com 90% de probabilidade (Tabela 12).

TABELA 12 - Teste de T – Fungo T₁ X Fungo T₅ – 90% de probabilidade.

	T	GL	SIGNIFICÂNCIA
NAFTALENO	-2,554	2	0,125 ns
FENANTRENO	0,790	2	0,512 ns
FLUORANTENO	0,694	2	0,559 ns
PIRENO	0,622	2	0,598 ns
BENZO(A)ANTRACENO	0,827	2	0,495 ns
CRISENO	0,666	2	0,574 ns
BENZO(B)FLUORANTENO	0,565	2	0,629 ns
BENZO(K)FLUORANTENO	0,387	2	0,736 ns
BENZO(A)PIRENO	0,532	2	0,648 ns
INDENO(1,2,3-CD)PIRENO	0,530	2	0,649 ns
DIBENZO(AH)ANTRACENO	0,319	2	0,780 ns
BENZO(GHI)PERILENO	0,585	2	0,618 ns

T₁; T₅– Tempo 1 e 5, T – Tcalculado, ns - não significativo; resultados significativos; GL - grau de liberdade

Estes resultados sugerem que há um efeito significativo na diminuição dos HPAs nas amostras inoculadas com o fungo e que a degradação de HPAs em tempo maior que sete dias não reduz significativamente os valores. Resultados semelhantes de degradação deste grupos de compostos por fungos basidiomicetos são descritos na literatura (ZHENG, 2001; POTIN, 2004; CHUPUNGARS, 2008).

Nos experimentos para confecção da superfície de resposta observou-se que após os sete primeiros dias a perda de água ocasionada pela temperatura da BOD estacionava o crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram encontrados por EGGEN (1997), onde a remoção HPAs foi mais intensa no início da incubação de sete semanas para duas linhagens de *Pleorotus ostreatus*, com atividades de redução máxima de 89%. O mesmo autor constatou mudanças na degradação de

benzo(a)pireno dependendo da linhagem do fungo estudada. Potin, (2004), trabalhando com *Cladosporium s.*, fungo filamentosso deuteromiceto, obteve taxas de degradação significativa com 4 dias de incubação em cultura líquida.

Os HPAs naftaleno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, apresentaram resultados diferentes significativamente entre o controle e amostras inoculadas com o *P. sanguineus* aos 35 dias (Tabela 13). Resultados semelhantes foram relatados por Eggen (1999) testando o fungo *Pleorotus ostreatus* na biorremediação de solo contaminado obteve uma taxa de remoção significativa entre os HPAs de 3, 4 e 5 anéis, com uma remoção de 86% do total de 16 destes compostos. Já MANCERA-LOPEZ (2007), trabalhando com três linhagens de fungos filamentosos na biorremediação de HPA em solo, obteve menores taxas de redução (entre 17% e 36%).

TABELA 13 - Teste de T - Controle T₅ X Fungo T₅ – 90% de probabilidade.

	T	GL	SIGNIFICÂNCIA
NAFTALENO	-8,110	2	0,015*
ACENAFTENO	1,000	2	0,423 ns
FLUORENO	1,000	2	0,423 ns
FENANTRENO	1,262	2	0,334 ns
ANTRACENO	4,798	2	0,041*
FLUORANTENO	3,769	2	0,064*
PIRENO	4,537	2	0,045*
BENZO(A)ANTRACENO	2,894	2	0,102 ns
CRISENO	6,403	2	0,024*
BENZO(B)FLUORANTENO	3,292	2	0,081*
BENZO(K)FLUORANTENO	2,998	2	0,096*
BENZO(A)PIRENO	3,389	2	0,077*
INDENO(1,2,3-CD)PIRENO	1,778	2	0,217 ns
DIBENZO(AH)ANTRACENO	1,900	2	0,198 ns
BENZO(GHI)PERILENO	1,063	2	0,399 ns

T₅ – Tempo 5, T – Tcalculado, ns-não significativo;

* resultados significativos; GL - grau de liberdade

Outros HPAs não apresentaram redução significativa, o que pode ser atribuído ao alto desvio entre as replicatas, ou uma relação direta com a baixa concentração e homogeneidade nas amostras sólidas. Dados da literatura apontados por Zhang (2006), demonstram a presença de alguns fatores da amostra que podem interferir na redução de HPAs, onde a atividade de água pode mudar a cinética de degradação, onde compostos com baixa solubilidade em água apresentam menor grau de degradação. Investigando fatores que afetam a oxidação de HPAs com 2, 3 e 4 anéis, VALENTÍN (2006) menciona propriedades físico-química tais como solubilidade em água, pressão de vapor atuam no comportamento ambiental destes compostos refletindo em um menor grau de degradação para compostos menos hidrossolúveis. O mesmo autor cita o potencial de ionização (PI) como um importante fator para a ação de enzimas lignolíticas, em virtude da energia necessária para remoção de elétron e formação do cátion HPA radical. ZHENG (2001), avaliando o efeito de oxidação de HPAs por fungo de degradação branca, demonstra que a taxa de dissolução de HPAs é um fator limitante no processo degradativo destes.

Todos os resultados de concentração para os HPAs foram iguais estatisticamente quando comparados os tempos 1 e 5 do grupo controle (Tabela 14). Isto demonstra que não foram observadas interferências no método experimental entre as concentrações iniciais e finais das amostras não tratadas com fungo e podemos, com isso, inferir que as modificações nas concentrações individuais dos HPAs podem ser atribuídas ao tratamento com o fungo.

TABELA 14 - Teste de T - Controle T₁- X Controle T₅– 95% de probabilidade.

	T	GL	SIGNIFICÂNCIA
NAFTALENO	1,334	2	0,314 ns
ACENAFTENO	1,000	2	0,423 ns
FLUORENO	1,000	2	0,423 ns
FENANTRENO	0,808	2	0,504 ns
ANTRACENO	3,144	2	0,088 ns
FLUORANTENO	1,329	2	0,315 ns
PIRENO	1,607	2	0,249 ns
BENZO(A)ANTRACENO	0,982	2	0,430 ns
CRISENO	1,048	2	0,405 ns
BENZO(B)FLUORANTENO	0,832	2	0,493 ns
BENZO(K)FLUORANTENO	0,768	2	0,523 ns
BENZO(A)PIRENO	-0,745	2	0,534 ns
INDENO(1,2,3-CD)PIRENO	1,623	2	0,246 ns
DIBENZO(AH)ANTRACENO	1,202	2	0,352 ns
BENZO(GHI)PERILENO	1,063	2	0,399 ns

T₁ – Tempo 1, T₅-Tempo 5, T – Tcalculado, ns-não significativo;
 * resultados significativos; GL - grau de liberdade

A redução de massa apresentada pelo antraceno (100%) assemelha-se com outros dados da literatura onde a taxa de degradação é maior para compostos com menor número de anéis aromáticos (Zheng, 2001). Já os resultados obtidos na degradação de HPA com 5 anéis foram bastante significativos com redução de 66,6% para benzo(a)pireno e 65,9% e 73,9% para o benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno respectivamente, valores estes, superiores aos obtidos na redução dos compostos de 4 anéis, fluoranteno 44,7%, pireno 47,9%, criseno 53,5% (Tabela 15). Neste estudo foram observadas maiores taxas de redução do que as encontradas por EGGEN(1999), onde o mesmo obteve a menor taxa para compostos de 5 anéis, quando comparados com hidrocarbonetos de 3 e 4 anéis. Clemente et al. (2001) testando 13 linhagens fúngicas de Deuteromicetos para degradar HPAs encontrou redução de 69% para o naftaleno, 65% para o antraceno e 12% para o fenantreno. Já Chupungars (2008) utilizando fungos de degradação branca, encontrou valores de 99% para fluoreno, em 6 dias de tratamento, 99% e

92% para fenantreno e antraceno, respectivamente, (21 dias) e 80% para fluoranteno e 75% para o pireno, em 30 dias.

TABELA 15- Redução de massa dos HPAs que tiveram degradação significativa

HPA	ANÉIS AROMÁTICOS	REDUÇÃO DE MASSA (%)
ANTRACENO	3	100
FLUORANTENO	4	44,7
PIRENO	4	47,9
BENZO(A)ANTRACENO	4	78,7
CRISENO	4	53,5
BENZO(B)FLUORANTENO	5	65,9
BENZO(K)FLUORANTENO	5	73,9
BENZO(A)PIRENO	5	66,6

4.3 TESTES DE TOXICIDADE

A. Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)

O teste de T pareado com 90% de probabilidade (Tabela 16) não mostrou diferenças significativas entre as diluições 0% sem fungo e 0% com fungo (controles) como era de se esperar. A (Figura 15), mostra as percentagens de inibição da taxa de germinação das sementes de alface para todas as diluições da solução “mãe” usadas nas amostras tratada e não tratada com o fungo. As diferenças entre as soluções geradas com 25% da solução “mãe”, que corresponde a 0,14 g de solo /mL de água, sem fungo e com fungo não foram calculadas pelo programa por não haver diferença no erro padrão das respectivas médias. Para as diluições de 50; 75 e 100% (0,29; 0,43 e 0,57 de solo /mL de água) foram encontradas diferenças significativas entre amostras inoculadas com fungo e as não inoculadas mostrando que os extratos aquosos das amostras de solo submetidas a biodegradação aumentam mais a inibição da taxa de germinação que as amostras sem o fungo no tempo de 35 dias.

Tabela 16 - Diferenças nas percentagens das taxas de inibição da germinação em sementes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo pelo Teste de T (90% de probabilidade)

COMPARAÇÃO	T	P	SIGNIFICATIVO (P>0,1)
0% sem Fungo X 0% com Fungo	-0,277	0,808	NS
25% sem Fungo X 25% com Fungo	NC	NC	NC
50% sem Fungo X 50% com Fungo	3,024	0,094	*
75% sem Fungo X 75% com Fungo	10,000	0,010	*
100% sem Fungo X 100% com Fungo	8,000	0,015	*

*- Significativo; NC – não calculado; NS – Não significativo; T – Tukey; P - Probabilidade.

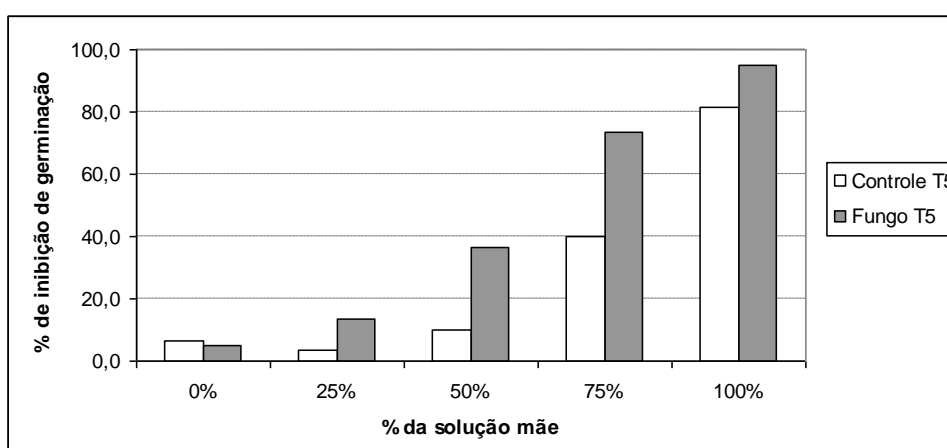


FIGURA 15 - Análise gráfica da germinação

Quando feito o teste de Tukey a 95% de probabilidade observa-se que as diluições com 0 e 25% da solução “mãe” não se diferenciam estatisticamente quando considerada a amostra inoculada com o fungo, apresentando valores semelhantes de inibição da taxa de germinação. As diluições com 50; 75 e 100% mostraram-se diferentes das com 0 e 25% e também foram diferentes entre si, sendo que quanto mais concentrada a solução, maior a taxa de inibição de germinação (Tabela 17). Levando em conta as amostras não inoculadas, a soluções geradas com 0; 25 e 50% da solução “mãe” não apresentaram diferenças significativas. Também, nas amostras não inoculadas, a diluição com 75% apresentou diferença significativa para as concentrações com 0; 25 e 50% e também

para a diluição com 100%, que foi considerada a que mais inibiu a germinação das sementes de alface.

Tabela 17 - Diferenças na % de inibição da germinação de sementes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo usando o Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa.

	COM FUNGO (%)	SEM FUNGO (%)
0%	5,0 a	6,7 a
25%	13,3 a	3,3 a
50%	36,7 b	10,0 a
75%	73,3 c	40,0 b
100%	95,0 d	81,7 c

Quando considerada a alongação das raízes, o teste de Tukey a 95% de probabilidade mostrou que as diluições com 0 e 25% da solução mãe não se diferenciaram estatisticamente quando considerada a amostra inoculada como fungo, apresentando valores semelhantes de média tanto para amostras com fungo quanto para amostras sem fungo (Tabela 18). As diluições com 50; 75 e 100% foram diferentes entre si e também foram diferentes das diluições com 0 e 25% da solução “mãe” nas amostras inoculadas. Já nas amostras não inoculadas, a diluição com 100% foi diferente significativamente da com 50% e das diluições com 0 e 25% da solução “mãe” (Tabela 18). A diluição com 75% para amostras não inoculadas foi semelhante as com 50 e 100%, tendo apresentado diferença significativa somente nas diluições com 0 e 25% da solução “mãe”.

Considerando os resultados da inibição da taxa de germinação e valor da alongação das raízes, o teste de Tukey foi considerado sensível para ver diferenças crescentes na resposta tóxica dos extratos, que no caso deste estudo teve um comportamento dose dependente.

TABELA 18 - Diferenças nas taxas alongação de raízes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo usando o Teste de Tukey a 95% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa.

	COM FUNGO (CM)	SEM FUNGO (CM)
0%	0,9a	0,9 a
25%	0,9a	0,9 a
50%	0,6b	0,6b
75%	0,4c	0,4bc
100%	0,1d	0,4 c

Considerando as diferenças na alongação das raízes, o teste de T pareado a 90% de probabilidade não detectou diferenças significativas entre as amostras inoculadas e não inoculadas com o *P. sanguineus* (Tabela 19). A (Figura 16) mostra as quantidades de alongação das raízes de alface (em centímetros) para todas as diluições da solução “mãe” usadas nas amostras tratada e não tratada com o fungo. Isto indica que o parâmetro inibição de taxa de germinação foi mais sensível que a alongação das raízes para detectar diferenças entre amostras tratadas e não tratadas com o fungo.

A CE_{50} para taxa de germinação foi calculada pelas equações da reta obtidas por regressão linear. A CE_{50} para o extrato aquoso do solo inoculado com fungo foi de 0,32 g/mL calculada com a equação $y=167,76x - 3,3123$ ($r^2=0,9634$) e 0,45 g/mL ($y=130,06x - 8,864$ ($r^2=0,7843$)) para amostras não inoculadas com o fungo. Esta diferença de valores de CE_{50} mostram que extratos aquosos produzidos com as amostras inoculadas com *P. sanguineus* são mais tóxicas que as não inoculadas.

TABELA 19 - Diferenças nas taxas de alongação (cm de crescimento) das raízes de alface expostas a diferentes diluições de extratos aquosos de solo pelo Teste de T pareado (90% de probabilidade)

COMPARAÇÃO	T	P	SIGNIFICATIVO (P>0,1)
0% sem Fungo X 0% com Fungo	0,584	0,618	NS
25% sem Fungo X 25% com Fungo	-0,520	0,655	NS
50% sem Fungo X 50% com Fungo	-0,202	0,859	NS
75% sem Fungo X 75% com Fungo	-0,435	0,706	NS
100% sem Fungo X 100% com Fungo	-4,833	0,130	NS

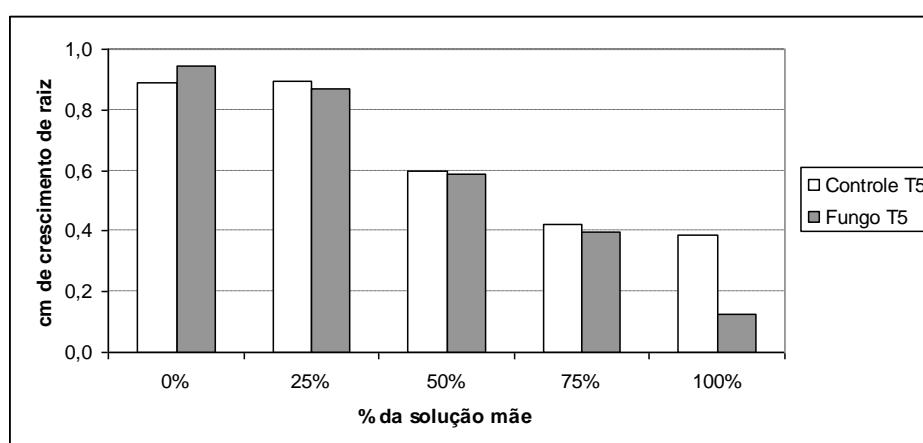


FIGURA 16 - Análise gráfica do crescimento

B. Teste com *Artemia salina*

Todos os extratos obtidos no tempo de 35 dias, das amostras contendo o fungo e das amostras controle (somente com solo e bagaço de cana), foram testados em *A. salina* nas diluições de 0; 5,0; 50 e 500 mg/mL. Os resultados apresentados no Figura 17 mostram que ambos os extratos (com e sem fungo) mostraram toxicidade para *A. salina* sugerindo que, embora o extrato do composto de solo e bagaço de cana tratado com o *P. sanguineus* tenha sido mais tóxicos ($CL_{50}=3,84$ mg/mL), as amostras não inoculadas com fungo ao mesmo tempo (35 dias) também apresentavam toxicidade para este microcrustáceo ($CL_{50}=23,38$ mg/mL). Isso sugere que solos com cargas tóxicas submetidos à biorremediação nas

condições escolhidas neste estudo tendem a aumentar a toxicidade sob o *end point* morte, efeito similar aos resultados observados nos testes com sementes de alface que mostrou menor taxa de germinação e de crescimento nas amostras tratadas com o *P. sanguineus*.

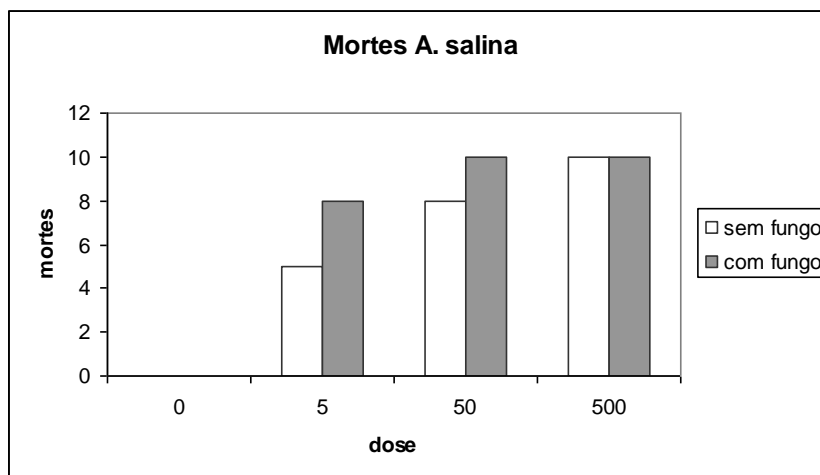


FIGURA 17 - Histograma de mortes em função das doses

A *A. salina* pode ser considerada um organismo adequado para o presente estudo, visto que foi observado sensibilidade do organismo e aumento das mortes dependente das magnitudes das doses. No trabalho de Sanchez-Bayo (2005) comparando CL_{50} de HPAs em Anostraca (*Artemia* spp.) e Copepodas foi observado que a *Artemia* spp. ($CL_{50}=295$ ng/mL) foi considerada mais sensível que os organismos integrantes do segundo grupo ($CL_{50}=1055$ ng/mL).

A toxicidade inerente ao solo sem o fungo pode ser atribuída a outras espécies químicas a exemplo de metais tóxicos que estão presentes em solos contaminados. Também não pode ser descartada a possibilidade de haver alguma(s) substância(s) produzida(s) pelo metabolismo do fungo que tornaram as CL_{50} das amostras tratadas com fungo maiores que as amostras sem inoculadas com o *P. sanguineus*. Todavia não foi objetivo deste estudo traçar o perfil de contaminação por contaminantes inorgânicos ou outros contaminantes orgânicos além dos HPAs.

Conclusão

- ✓ Foi possível estabelecer os fatores importantes: temperatura, tempo, umidade e matéria seca para o crescimento do *P. sanguineus* usando o método do planejamento experimental
- ✓ O tratamento proposto mostrou bons resultados, proporcionando uma redução considerável na concentração total de HPAs;
- ✓ A redução dos HPAs pode ter sido responsável pelo aumento da toxicidade observada nos testes com semente de alface e *Artemia salina*, sugerindo que os produtos resultantes da degradação não foram mineralizados em sua totalidade, o que não nos permite afirmar que o tratamento seja capaz de tornar os solos menos tóxicos;
- ✓ O fungo *Pycnoporus* mostrou-se uma importante ferramenta biotecnológica para degradação com uma redução de massa de 100% para alguns compostos.
- ✓ Os testes toxicológicos revelaram um comportamento dose X efeito dose dependente.

REFERÊNCIAS

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

CAVALCANTE, R. M.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S. S. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, v.30, n.3, p.560-564, 2007.

DUTKA, B. J. Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), **Environmental Canada**. 1997

EGGEN, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation** 44, 117±126. 1999.

EOM, I.C. RAST, C., VEBER, A. M., VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67, 190–205. 2007

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Educus, 2004.

HOLLINGER, C. et al. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.

HLAVAY, József; KISS, Gyula; GELENCSEÉR, András; KRIVÁSCSY, Zoltán. Occurrence and determination of organic pollutants in aerosol, precipitation, and sediment samples collected at Lake Balaton. **Journal of Chromatography A**, Finland, n. 774, p. 349-361, 1997.

IARC - **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER** 1983. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Polycyclic Aromatic Compounds*. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, v.32. Lyon, France.

IARC - **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER** 1985. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans*, v.35. Lyon, France.

KAMIDA, H. M. et al. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.629-632, 2005

KURT, S. et.al. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, **Policy Watch**, v. 6, p. 931-932, dez, 2005. Disponível em: [http:// oncology.thelancet.com](http://oncology.thelancet.com). Acesso em: 30 set. 2007.

KUWAHARA, M. et al. **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters, v. 169, p. 247-250, 1984.

LIMA, C.B.S. et. al. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p.157-158.

LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, 1996.

MANCERA-LOPEZ, M.E. GARCIA, MEZB, B. C., -VAZQUEZA, R. R, Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 61, 151–160. 2008

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 440p. 1997.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 440p. 1997.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Oecol. Bras.** V.11, n.2, p.188-201, 2007.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v.45, p.31-34, 1982.

NETTO, A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

OLGUIM, C. de F. A. et al. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* baker. **Varia Scientia**, v.05, n.10, p.137-143, dez. de 2005.

PELTONEN, Kimmo; KULJUKKA, Terhi. Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography A**, Finlang, n. 710, p. 93-108, 1995.

PEREIRA NETTO, A. D. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, p. 765-773, 2000.

POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

SISINNO, C. L. S. et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. Rio de Janeiro: **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n.2, p.671-676, mar-abr, 2003.

SOUZA, J. P. Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento. **Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Aqüicultura**. 2008.

TIEN & KIRK, T. K. **Lignin degrading enzyme from phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase**. Proceedings of the National Academy of Science USA, v.81, p. 2280 – 2284, 1984.

VASCONCELLOS, Pérola de Castro; ARTAXO, Paulo Eduardo; CICCIONI, Paulo; CECINATO, Ângelo; BRANCALEONI, Enzo; FRATTONI, Massimiliano. **Química Nova**, São Paulo, v. 21. n. 4, p. 385-393, 1998.

WISE, Stephen A.; SANDER, Lane C.; MAY, Willie E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Gaithersburg, n. 642, p. 329-349, 1993.

WHO - **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. 2005. *Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAH)*. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group(IARC) for Lyon, France. *Policy Watch*. v..6, p.931-932.

WHO - **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. 1987. *Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH)*. In: Air quality guidelines for Europe. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe.

ZHENG,Z., OBBARD, J. P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology** 31, 3–9. 2002

ANEXOS

Teste com *A. salina*

Probit SEM FUNGO

Prob	DOSE	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	-43,52283	,	,
,02	-35,68220	,	,
,03	-30,70757	,	,
,04	-26,96535	,	,
,05	-23,92134	,	,
,06	-21,33042	,	,
,07	-19,05868	,	,
,08	-17,02461	,	,
,09	-15,17471	,	,
,10	-13,47187	,	,
,15	-6,42165	,	,
,20	- ,81837	,	,
,25	3,98875	,	,
,30	8,30570	,	,
,35	12,30599	,	,
,40	16,10187	,	,
,45	19,77444	,	,
,50	23,38877	,	,
,55	27,00311	,	,
,60	30,67567	,	,
,65	34,47155	,	,
,70	38,47184	,	,
,75	42,78879	,	,
,80	47,59591	,	,
,85	53,19919	,	,
,90	60,24941	,	,
,91	61,95225	,	,
,92	63,80215	,	,
,93	65,83622	,	,
,94	68,10796	,	,
,95	70,69889	,	,
,96	73,74289	,	,
,97	77,48511	,	,
,98	82,45974	,	,
,99	90,30037	,	,

Probit COM FUNGO

Prob	DOSEF	Lower	Upper
,01	,81214	,	,
,02	1,16755	,	,
,03	1,39305	,	,
,04	1,56268	,	,
,05	1,70066	,	,
,06	1,81811	,	,
,07	1,92109	,	,
,08	2,01329	,	,
,09	2,09715	,	,
,10	2,17433	,	,
,15	2,49392	,	,
,20	2,74791	,	,
,25	2,96581	,	,
,30	3,16150	,	,
,35	3,34283	,	,
,40	3,51490	,	,
,45	3,68137	,	,
,50	3,84521	,	,
,55	4,00904	,	,
,60	4,17552	,	,
,65	4,34758	,	,
,70	4,52891	,	,
,75	4,72460	,	,
,80	4,94250	,	,
,85	5,19650	,	,
,90	5,51608	,	,
,91	5,59327	,	,
,92	5,67712	,	,
,93	5,76933	,	,
,94	5,87230	,	,
,95	5,98975	,	,
,96	6,12773	,	,
,97	6,29736	,	,
,98	6,52286	,	,
,99	6,87827	,	,

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 CRE_CF0	,9467	3	2,887E-02	1,667E-02
CRE_SF0	,8933	3	,1380	7,965E-02
Pair 2 CRE_CF25	,8667	3	8,021E-02	4,631E-02
CRE_SF25	,8967	3	2,082E-02	1,202E-02
Pair 3 CRE_CF50	,5867	3	5,508E-02	3,180E-02
CRE_SF50	,6033	3	9,018E-02	5,207E-02
Pair 4 CRE_CF75	,3967	3	4,509E-02	2,603E-02
CRE_SF75	,4200	3	5,292E-02	3,055E-02
Pair 5 CRE_C100	,1250	2	3,536E-02	2,500E-02
CRE_S100	,4150	2	4,950E-02	3,500E-02

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 CRE_CF0 & CRE_SF0	3	-,649	,551
Pair 2 CRE_CF25 & CRE_SF25	3	-,938	,225
Pair 3 CRE_CF50 & CRE_SF50	3	-,933	,235
Pair 4 CRE_CF75 & CRE_SF75	3	-,796	,414
Pair 5 CRE_C100 & CRE_S100	2	-1,000	,000

Paired Samples Test

	Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 CRE_CF0 - CRE_SF0	5,333E-02	,1582	9,135E-02	-,3397	,4464	,584	2	,618
Pair 2 CRE_CF25 - CRE_SF25	-3,0000E-02	,1000	5,774E-02	-,2784	,2184	-,520	2	,655
Pair 3 CRE_CF50 - CRE_SF50	-1,6667E-02	,1429	8,253E-02	-,3718	,3384	-,202	2	,859
Pair 4 CRE_CF75 - CRE_SF75	-2,3333E-02	9,292E-02	5,364E-02	-,2541	,2075	-,435	2	,706
Pair 5 CRE_C100 - CRE_S100	-,2900	8,485E-02	6,000E-02	-1,0524	,4724	-4,833	1	,130

T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	GER_CF0	5,0000	3	5,0000	2,8868
	GER_SF0	6,6667	3	5,7735	3,3333
Pair 2	GER_CF25	13,3333	3	2,8868	1,6667
	GER_SF25	3,3333	3	2,8868	1,6667
Pair 3	GER_CF50	36,6667	3	12,5831	7,2648
	GER_SF50	10,0000	3	5,0000	2,8868
Pair 4	GER_CF75	73,3333	3	2,8868	1,6667
	GER_SF75	40,0000	3	5,0000	2,8868
Pair 5	GER_C100	95,0000	3	5,0000	2,8868
	GER_S100	81,6667	3	2,8868	1,6667

a The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0.

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	GER_CF0 & GER_SF0	3	-,866	,333
Pair 3	GER_CF50 & GER_SF50	3	-,397	,740
Pair 4	GER_CF75 & GER_SF75	3	,000	1,000
Pair 5	GER_C100 & GER_S100	3	,866	,333

Paired Samples Test

		Paired Differences			95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Pair 1	GER_CF0 - GER_SF0	-1,6667	10,4083	6,0093	-27,5224	24,1891	-,277	2	,808
Pair 3	GER_CF50 - GER_SF50	26,6667	15,2753	8,8192	-11,2792	64,6125	3,024	2	,094
Pair 4	GER_CF75 - GER_SF75	33,3333	5,7735	3,3333	18,9912	47,6755	10,000	2	,010
Pair 5	GER_C100 - GER_S100	13,3333	2,8868	1,6667	6,1622	20,5044	8,000	2	,015

Oneway

ANOVA

GER_CF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	716,933	4	179,233	99,574	,000
Within Groups	18,000	10	1,800		
Total	734,933	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GER_CF

Tukey HSD

(I) AGRUP_C	(J) AGRUP_C	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	90% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	3,00	1,6667	1,0954	,573	-1,4457	4,7790
	5,00	6,3333	1,0954	,001	3,2210	9,4457
	7,00	13,6667	1,0954	,000	10,5543	16,7790
	9,00	18,0000	1,0954	,000	14,8876	21,1124
3,00	1,00	-1,6667	1,0954	,573	-4,7790	1,4457
	5,00	4,6667	1,0954	,011	1,5543	7,7790
	7,00	12,0000	1,0954	,000	8,8876	15,1124
	9,00	16,3333	1,0954	,000	13,2210	19,4457
5,00	1,00	-6,3333	1,0954	,001	-9,4457	-3,2210
	3,00	-4,6667	1,0954	,011	-7,7790	-1,5543
	7,00	7,3333	1,0954	,000	4,2210	10,4457
	9,00	11,6667	1,0954	,000	8,5543	14,7790
7,00	1,00	-13,6667	1,0954	,000	-16,7790	-10,5543
	3,00	-12,0000	1,0954	,000	-15,1124	-8,8876
	5,00	-7,3333	1,0954	,000	-10,4457	-4,2210
	9,00	4,3333	1,0954	,018	1,2210	7,4457
9,00	1,00	-18,0000	1,0954	,000	-21,1124	-14,8876
	3,00	-16,3333	1,0954	,000	-19,4457	-13,2210
	5,00	-11,6667	1,0954	,000	-14,7790	-8,5543
	7,00	-4,3333	1,0954	,018	-7,4457	-1,2210

* The mean difference is significant at the .1 level.

Homogeneous Subsets

GER_CF

Tukey HSD

		N Subset for alpha = .1			
AGRUP_C	N	1	2	3	4
9,00	3	1,0000			
7,00	3		5,3333		
5,00	3			12,6667	
3,00	3				17,3333
1,00	3				19,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	,573

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Oneway

ANOVA

GER_SF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	529,333	4	132,333	165,417	,000
Within Groups	8,000	10	,800		
Total	537,333	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GER_SF

Tukey HSD

(I) AGRUP_S	(J) AGRUP_S	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	90% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2,00	4,00	-,6667	,7303	,886	-2,7416	1,4082
	6,00	,6667	,7303	,886	-1,4082	2,7416
	8,00	6,6667	,7303	,000	4,5918	8,7416
	10,00	15,0000	,7303	,000	12,9251	17,0749
4,00	2,00	,6667	,7303	,886	-1,4082	2,7416
	6,00	1,3333	,7303	,411	-,7416	3,4082
	8,00	7,3333	,7303	,000	5,2584	9,4082
	10,00	15,6667	,7303	,000	13,5918	17,7416
6,00	2,00	-,6667	,7303	,886	-2,7416	1,4082
	4,00	-1,3333	,7303	,411	-3,4082	,7416
	8,00	6,0000	,7303	,000	3,9251	8,0749
	10,00	14,3333	,7303	,000	12,2584	16,4082
8,00	2,00	-6,6667	,7303	,000	-8,7416	-4,5918
	4,00	-7,3333	,7303	,000	-9,4082	-5,2584
	6,00	-6,0000	,7303	,000	-8,0749	-3,9251
	10,00	8,3333	,7303	,000	6,2584	10,4082
10,00	2,00	-15,0000	,7303	,000	-17,0749	-12,9251
	4,00	-15,6667	,7303	,000	-17,7416	-13,5918
	6,00	-14,3333	,7303	,000	-16,4082	-12,2584
	8,00	-8,3333	,7303	,000	-10,4082	-6,2584

* The mean difference is significant at the .1 level.

Homogeneous Subsets

GER_SF

Tukey HSD

AGRUP_S	N	Subset for alpha = .1		
		1	2	3
10,00	3	3,6667		
8,00	3		12,0000	
6,00	3			18,0000
2,00	3			18,6667
4,00	3			19,3333
Sig.		1,000	1,000	,411

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Oneway

ANOVA

CRES_CF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,146	4	,286	99,455	,000
Within Groups	2,592E-02	9	2,880E-03		
Total	1,171	13			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CRES_CF

Tukey HSD

(I) AG_CR_C	(J) AG_CR_C	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	90% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	3,00	8,000E-02	4,381E-02	,416	-4,6533E-02	,2065
	5,00	,3600	4,381E-02	,000	,2335	,4865
	7,00	,5500	4,381E-02	,000	,4235	,6765
	9,00	,8217	4,899E-02	,000	,6802	,9631
3,00	1,00	-8,000E-02	4,381E-02	,416	-,2065	4,653E-02
	5,00	,2800	4,381E-02	,001	,1535	,4065
	7,00	,4700	4,381E-02	,000	,3435	,5965
	9,00	,7417	4,899E-02	,000	,6002	,8831
5,00	1,00	-,3600	4,381E-02	,000	-,4865	-,2335
	3,00	-,2800	4,381E-02	,001	-,4065	-,1535
	7,00	,1900	4,381E-02	,012	6,347E-02	,3165
	9,00	,4617	4,899E-02	,000	,3202	,6031
7,00	1,00	-,5500	4,381E-02	,000	-,6765	-,4235
	3,00	-,4700	4,381E-02	,000	-,5965	-,3435
	5,00	-,1900	4,381E-02	,012	-,3165	-6,3467E-02
	9,00	,2717	4,899E-02	,002	,1302	,4131
9,00	1,00	-,8217	4,899E-02	,000	-,9631	-,6802
	3,00	-,7417	4,899E-02	,000	-,8831	-,6002
	5,00	-,4617	4,899E-02	,000	-,6031	-,3202
	7,00	-,2717	4,899E-02	,002	-,4131	-,1302

* The mean difference is significant at the .1 level.

Homogeneous Subsets

CRES_CF

Tukey HSD

AG_CR_C	N	Subset for alpha = .1			
		1	2	3	4
9,00	2	,1250			
7,00	3		,3967		
5,00	3			,5867	
3,00	3				,8667
1,00	3				,9467
Sig.		1,000	1,000	1,000	,458

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,727.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Oneway

ANOVA

CRES_SF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,732	4	,183	26,883	,000
Within Groups	6,807E-02	10	6,807E-03		
Total	,800	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CRES_SF

Tukey HSD

(I) AG_CR_S	(J) AG_CR_S	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	90% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2,00	4,00	-3,3333E-03	6,736E-02	1,000	-,1947	,1881
	6,00	,2900	6,736E-02	,011	9,861E-02	,4814
	8,00	,4733	6,736E-02	,000	,2819	,6647
	10,00	,5067	6,736E-02	,000	,3153	,6981
4,00	2,00	3,333E-03	6,736E-02	1,000	-,1881	,1947
	6,00	,2933	6,736E-02	,010	,1019	,4847
	8,00	,4767	6,736E-02	,000	,2853	,6681
	10,00	,5100	6,736E-02	,000	,3186	,7014
6,00	2,00	-,2900	6,736E-02	,011	-,4814	-9,8609E-02
	4,00	-,2933	6,736E-02	,010	-,4847	-,1019
	8,00	,1833	6,736E-02	,120	-8,0574E-03	,3747
	10,00	,2167	6,736E-02	,056	2,528E-02	,4081
8,00	2,00	-,4733	6,736E-02	,000	-,6647	-,2819
	4,00	-,4767	6,736E-02	,000	-,6681	-,2853
	6,00	-,1833	6,736E-02	,120	-,3747	8,057E-03
	10,00	3,333E-02	6,736E-02	,986	-,1581	,2247
10,00	2,00	-,5067	6,736E-02	,000	-,6981	-,3153
	4,00	-,5100	6,736E-02	,000	-,7014	-,3186
	6,00	-,2167	6,736E-02	,056	-,4081	-2,5276E-02
	8,00	-3,3333E-02	6,736E-02	,986	-,2247	,1581

* The mean difference is significant at the .1 level.

Homogeneous Subsets

CRES_SF

Tukey HSD

		N Subset for alpha = .1		
AG_CR_S		1	2	3
10,00	3	,3867		
8,00	3	,4200	,4200	
6,00	3		,6033	
2,00	3			,8933
4,00	3			,8967
Sig.		,986	,120	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.