

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESTUDO DE DIOXINAS
PRESENTES NA CINZA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE CEPAS
MICROBIANAS EM COMPOSTAGEM AERÓBICA”***

Bruno Perlatti*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Moacir Rossi Forim

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P451dm Perlatti, Bruno.
Desenvolvimento de métodos para estudo de dioxinas presentes na cinza do bagaço da cana-de-açúcar : avaliação do potencial biorremediador de cepas microbianas em compostagem aeróbica / Bruno Perlatti. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
134 f.

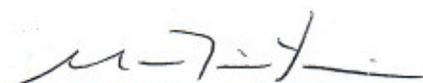
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química orgânica. 2. Microorganismos. 3. Biorremediação. 4. Dioxina. I. Título.

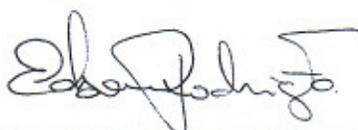
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

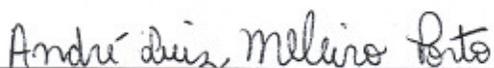
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato Bruno Perlatti, realizada em 30 de março de 2012:



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Aos meus pais, Luiz Ernani e Cleusa, e aos
meus irmãos Priscilla e Fabio, que me
ensinaram a voar pra longe sem olhar para trás,
com compreensão e paciência me permitiram
chegar onde estou; e a minha mulher Jakelline,
que plenamente me apoia, me conforta e me completa.

"All things are poison, and nothing is without poison; only the dose permits something not to be poisonous."

Paracelsus 1493-1541

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria realizado sem o apoio de diversas pessoas, as quais cabem aqui os meus sinceros reconhecimentos e agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por ter me aceito e me acolhido em seu grupo durante o período de realização deste projeto, apostando em meu trabalho e me orientando com muita serenidade e segurança, sempre disposto a ajudar em todos os aspectos. Além de um orientador, um companheiro de trabalho, um amigo.

Ao Eng. Roberto Antonio Malimpence, sócio da empresa Baraúna Comércio e Indústria Ltda. EPP, pelo apoio financeiro e pelo fornecimento das amostras específicas da indústria sucroalcooleira e sucroenergética para a realização dos experimentos em conjunto com Usina São José da Estiva S/A - Açúcar e Álcool, representada pelo Eng. Julio Vieira de Araújo.

À Coordenação de Pós-Graduação, ao Programa de Excelência Acadêmica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Proex – CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho do DQ/UFSCar e a Luiz Antônio do Nascimento Louza Umbelino, sócio da empresa Krión AgroSciences, pelo fornecimento das cepas de micro-organismos utilizadas nos experimentos

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Prof. Dr. Edson Rodrigues da Silva, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim e a Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela utilização do espaço físico e da instrumentação do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Praga (INCT-CBIP), sediado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, sob a coordenação da Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelo uso do laboratório de Bioensaios e pelo uso do equipamento de HPLC-MS/MS para a análise dos experimentos.

À Prof.^a Dr.^a Rose Maria Carlos, pelas medidas de absorbância no UV-Visível obtidas em seu laboratório, realizadas pelo M.Sc. Guilherme Luiz Chinini.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e a Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelas contribuições e conselhos dados no exame de qualificação.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof.^a Dr.^a Arlene Gonçalves Correa, Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Prof.^a Dr.^a Quézia Bezerra Cass, pelas disciplinas de excelente conteúdo ministradas com maestria.

Ao Dr. Leonardo Toffano e Evandro Prieto, pela grande ajuda com a manipulação e preparo dos experimentos de microbiologia.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais pelo apoio não só profissional como também pessoal. Agradeço em especial os alunos de pós-graduação do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Moacir Rossi Forim: Eveline, Fabiana, Inajá, Karen, Patrícia e Luiz Antônio, pelos laços de amizade e profissionalismo construídos sob um olhar de ajuda e companheirismo, na formação de um grupo de pesquisa forte e produtivo.

Aos funcionários do Departamento de Química e da Secretária de Pós-Graduação, que atuam por trás dos bastidores para que a pesquisa esteja sempre em primeiro plano para os estudantes e pesquisadores do Departamento de Química.

Aos amigos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, por tornar os dois últimos anos repletos de alegria e diversão, pois nem só de trabalho vive o homem.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, irmãos, cunhados e sobrinhos, por completarem minha vida pessoal e apoiarem cegamente minhas decisões.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Composição química de cinzas provenientes de usinas da região central do estado de São Paulo. SBA-J: Jaú, SBA-I: Ibaté, SBA-B: Barra Bonita, SBA-A: Araraquara.	5
TABELA 1.2 - Manifestações clínicas causadas por dioxinas descritas na literatura.	11
TABELA 1.3 - Congêneres das dioxinas, furanos e bifenilas policloradas que apresentem toxicidade relacionada com o receptor AhR.....	12
TABELA 1.4 - Comparação entre concentrações de dose letal para diversos compostos.....	13
TABELA 1.5 - Média norte-americana de consumo diário de dioxinas através da alimentação.....	16
TABELA 1.6 - Valores de Fator de Toxicidade Equivalente (TEF) para cada congêneres que apresenta características de dioxinas.	18
TABELA 3.1 - Tratamentos utilizados na avaliação do crescimento microbiano para aferição da influência dos constituintes das leiras de compostagem em seu crescimento. Em negrito está destacada a sigla utilizada para identificação dos experimentos	33
TABELA 3.2 - Variáveis cromatográficas exploradas para otimização da seletividade cromatográfica para o corante RBBR.	38
TABELA 3.3 - Gradiente exploratório usado na análise qualitativa da degradação do corante RBBR.	42
TABELA 3.4 - Rampa de temperatura do forno de coluna para as análises de 1,2,3,4-TCDD por GC-MS.....	45
TABELA 4.1 - Análise qualitativa de descoloração do corante RBBR por micro-organismos.	53
TABELA 4.2 - Valores de IVCM obtidos para os fungos analisados, nos tratamentos descritos na seção 3.4.2.	54
TABELA 4.3 - Condições cromatográficas após otimização do método para RBBR.	71
TABELA 4.4 - Parâmetros dependentes do analito para formação de fragmentos do íon precursor para o RBBR.....	74

TABELA 4.5 - Parâmetros dependente da fonte ESI- avaliados para a análise do corante RBBR.....	77
TABELA 4.6 - Condições experimentais para o método de quantificação de RBBR.....	78
TABELA 4.7 - Estabilidade da amostra de RBBR com relação ao tempo de repouso no auto injetor e com ciclos de degelo.....	79
TABELA 4.8 - Valores de recuperação do analito e efeito de matriz.....	81
TABELA 4.9 - Precisão e exatidão para do método validado.....	83
TABELA 4.10 - Otimização dos parâmetros dependentes do analito 1,2,3,4-TCDD e da fonte de ionização por APCI	94
TABELA 4.11 - Parâmetros utilizados na otimização da fragmentação do íon m/z 301 no experimento de íons produto (MS^2).	96
TABELA 4.12 - Condições experimentais otimizadas para a análise da 1,2,3,4-TCDD por LC-MS/MS	96
TABELA 4.13 - Valores de eficiência do processo de extração obtidos para o experimento*.....	102
TABELA 4.14 - Valores de precisão e exatidão para o método de análise da 1,2,3,4-TCDD avaliado.....	103
TABELA 4.15 Concentrações extraídas das alíquotas retiradas durante o experimento de degradação da 1,2,3,4-TCDD.	104
TABELA 4.16 - Comparação entre a concentração de 1,2,3,4-TCDD encontrada no meio de cultura após 30 dias, no erlenmeyer de polipropileno usado para realização do experimento e na massa micelial.....	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Processo produtivo da cana-de-açúcar destacando os produtos e subprodutos gerados (BERTONCINI, 2008).....	3
FIGURA 1.2 – Etapas da cinza do bagaço da cana-de-açúcar na indústria.....	6
FIGURA 1.3 - Leiras de compostagem aeróbica em diversos estágios de produção. Usina São José da Estiva, Novo Horizonte – SP.....	7
FIGURA 1.4 - Estrutura molecular das classes de substâncias comumente chamadas de ‘dioxinas’.....	9
FIGURA 1.5 - Representação das propriedades estruturais das dioxinas e furanos.	10
FIGURA 1.6 – Mecanismo de interação das dioxinas com o receptor AhR.	11
FIGURA 1.7 – Molécula de 2,3,7,8-TCDD, a mais tóxica dos congêneres.....	13
FIGURA 1.8 - Formação de dioxinas em processos de combustão.....	15
FIGURA 1.9 – Estrutura do corante Remazol Brilliant Blue R.	25
FIGURA 1.10 – Estrutura da molécula 1,2,3,4-tetracloro dibenzo- <i>p</i> -dioxina (1,2,3,4-TCDD).....	25
FIGURA 3.1 – Experimentos de crescimento microbiano em meio sólido. Na foto, placas de BDA contendo diversos tratamentos em estufa B.O.D.	34
FIGURA 3.2 – Representação dos experimentos de cultivo de micro-organismos em meio líquido com corante RBBR.	37
FIGURA 3.3 - Esquema ilustrativo da otimização por injeção em fluxo para a 1,2,3,4-TCDD.....	45
FIGURA 4.1 - Caracterização microscópica e morfológica da cepa 01-10, reconhecida como <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
FIGURA 4.2 - Placas inoculadas com bactérias após 15 dias de crescimento. A) <i>Sphingomonas capsulata</i> , A1) com corante e A2) sem corante e B) cepa 02-1, B1) sem corante e B2) com corante.	49
FIGURA 4.3 - A) Placa com corante RBBR inoculada com <i>P. chrysosporium</i> após 24 horas, e B) Após 15 dias, mostrando a diferença de coloração entre as culturas B1) com corante e B2) sem corante.	50
FIGURA 4.4 - Crescimento de <i>Aspergillus aculeatus</i> em meio BDA com RBBR após A) 3 dias e B) 15 dias, mostrando o micro-organismo em meio BDA B1) sem corante e B2) com corante RBBR.....	50

FIGURA 4.5 - Crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i> em meio BDA após 15 dias A) Meio com corante, e B) sem corante. Pode ser observada a ausência do corante em partes do meio de cultura com corante e dificuldades na observação da adsorção do corante pelo micélio.	51
FIGURA 4.6 – Cultivo de <i>Aspergillus flavus</i> em meio BDA. A) Ilustrando a capacidade de descoloração do corante após 4 dias de crescimento. B) Após 15 dias de experimento, pode-se observar a diferença de cores entre o fungo cultivado B1) sem corante e B2) com corante.	52
FIGURA 4.7 - Agrupamento de médias de crescimento por Scott-Knott, para o fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	55
FIGURA 4.8 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Verde, a2 = Azul, a3 = Laranja, a4 = Preto	56
FIGURA 4.9 - Agrupamento de médias de crescimento por Scott-Knott aplicado aos tratamentos experimentais para o fungo <i>Aspergillus aculeatus</i>	57
FIGURA 4.10 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo <i>Aspergillus aculeatus</i> . Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Vermelho, a2 = Azul, a3 = Verde.	58
FIGURA 4.11 - Gráfico de agrupamento de médias pelo método de Scott-Knott para o fungo <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
FIGURA 4.12 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> . Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Verde, a2 = Preto, a3 = Vermelho.....	61
FIGURA 4.13 - Modelo de agrupamento de média usando o método de Scott-Knott para avaliação da influência dos tratamentos no crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	62
FIGURA 4.14 - Análise de agrupamento para o fungo <i>Aspergillus flavus</i> . Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Vermelho, a2 = Azul, a3 = Preto.....	64
FIGURA 4.15 - a) Comparações dos valores de IVCM obtidos para as quatro espécies de fungos avaliados. b) Imagem ampliada do IVCM com intervalo até 1,0, mostrando com mais detalhes a variação entre as espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	65

FIGURA 4.16 - Espectro de absorção no UV-Vis de uma solução de RBBR 10-4M em ACN:H ₂ O (35:65 v/v). O traço colorido representa a amostra de RBBR; o traço preto indica o controle obtido pela análise da mistura da fase móvel sem adição de corante.	67
FIGURA 4.17 - A-J) Cromatogramas obtidos na fase de desenvolvimento cromatográfico do método de análise do corante RBBR.	69
FIGURA 4.18 - Desenho representativo do instrumento API 2000™, com uma fonte <i>TurboIonSpray</i> ®, e um arranjo de triplo quadrupolo, indicando o local de atuação das variáveis passíveis de otimização..	72
FIGURA 4.19 - Fragmentação do corante RBBR sob condições otimizadas. Em detalhe, o padrão isotópico do pico <i>m/z</i> 290, indicando incrementos de 0,5 unidades de massa.	74
FIGURA 4.20 - Proposta de formação dos fragmentos no experimento de íons produto (MS ₂) para o íon precursor <i>m/z</i> 290.	75
FIGURA 4.21 - Espectro de íons produto para o íon <i>m/z</i> 483.	76
FIGURA 4.22 - Fragmentação do íon <i>m/z</i> 290 do corante RBBR no Q2.....	76
FIGURA 4.23 - Cromatograma no modo SRM obtido utilizando as condições otimizada para uma amostra padrão de corante RBBR a 100ng.mL ⁻¹	78
FIGURA 4.24 - Cromatogramas usados na avaliação da estabilidade da amostra do corante RBBR sobrepostos.....	79
FIGURA 4.25 - Cromatograma comparando amostras com e sem corante, demonstrando a seletividade do método proposto. Legenda: Vermelho – Amostra de RBBR em meio com <i>Aspergillus flavus</i> com 25 dias de cultivo. Azul – Controle de crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> com 25 dias de cultivo, sem adição do corante.	80
FIGURA 4.26 - Cromatogramas utilizados na determinação do A) LOQ e B) LOD. Na legenda, o valor de Y _n representa a altura máxima alcançada pelo ruído, e Y _s a altura correspondente ao sinal do analito na concentração analisada.....	82
FIGURA 4.27 - Curva de calibração usada para quantificação do corante RBBR. ...	83
FIGURA 4.28 - Degradação de RBBR por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> durante 30 dias.	85
FIGURA 4.29 - Degradação de RBBR por <i>Aspergillus fumigatus</i> durante 30 dias... ..	85
FIGURA 4.30 - Degradação de RBBR por <i>Aspergillus aculeatus</i> durante 30 dias... ..	86
FIGURA 4.31 - Degradação de RBBR por <i>Aspergillus flavus</i> durante 30 dias.....	87

FIGURA 4.32 – Eficiência de degradação dos fungos durante 30 dias.....	87
FIGURA 4.33 – Comportamento dos íons monitorados nas amostras de <i>Aspergillus flavus</i> durante os 30 dias de experimento.....	88
FIGURA 4.34 - XIC (m/z 318) das amostras de RBBR degradadas por <i>Aspergillus flavus</i> , durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.	89
FIGURA 4.35 - XIC (m/z 336) das amostras de RBBR degradadas por <i>Aspergillus flavus</i> , durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.	90
FIGURA 4.36 - XIC (m/z 165) das amostras de RBBR degradadas por <i>Aspergillus flavus</i> , durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.	91
FIGURA 4.37 – XIC (m/z 188) das amostras de RBBR degradadas por <i>Aspergillus flavus</i> , durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.	91
FIGURA 4.38 – Proposta do mecanismo de degradação do corante RBBR pelo fungo <i>Aspergillus flavus</i>	92
FIGURA 4.39 - <i>Full scan</i> da molécula 1,2,3,4-TCDD no modo negativo, usando APCI como fonte de ionização.	94
FIGURA 4.40 - Padrão isotópico observado para fragmentos contendo de 0 à 7 átomos de cloro. Fonte Wellington Labs, 2009.	95
FIGURA 4.41 - Curva de calibração construída para a 1,2,3,4-TCDD, com a equação de regressão linear e seu coeficiente de correlação.	97
FIGURA 4.42 - Fragmentação para a molécula 1,2,3,4-TCDD por GC-MS usando uma fonte de EI+.....	97
FIGURA 4.43 - Comparação entre cromatogramas de 1,2,3,4-TCDD obtidos por: A) LC-MS/MS ($20\mu\text{g.mL}^{-1}$) e B) GC/MS (20ng.mL^{-1}).	99
FIGURA 4.44 - A) Fragmentação obtida para a molécula 1,2,4,5-tetraclorobenzeno. B) Cromatograma de GC-MS no modo SIM obtido após a injeção de uma solução padrão de 1,2,3,4-TCDD em concentração de $2\mu\text{g.mL}^{-1}$, dopada com 1,2,4,5-tetraclorobenzeno na concentração de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$	100
FIGURA 4.45 - Curva de calibração para a 1,2,3,4-TCDD por GC-MS, com 1,2,4,5-tetraclorobenzeno como padrão interno.....	100

FIGURA 4.46 - Representação da seletividade de método proposto, em uma amostra extraída de meio de cultura de <i>Aspergillus flavus</i> incubados durante 30 dias com 1,2,3,4-TCDD.....	101
FIGURA 4.47 - Cromatograma de amostras de 1,2,3,4-TCDD de mesma concentração preparadas em meio de cultura BD (rosa) e água (preto) e extraídas com acetato de etila. A) 1 µg.mL ⁻¹ B) 100 µg.mL ⁻¹	102
FIGURA 4.48 - Amostras de 10ng.mL ⁻¹ (S/N = 9,9) representando o LOQ (esquerda) e 2ng.mL ⁻¹ (S/N = 4,1) representando o LOD (direita) obtidos para a molécula 1,2,3,4-TCDD por GC-MS no modo SIM (<i>m/z</i> 322.00).....	103
FIGURA 4.49- Variação relativa da quantidade de 1,2,3,4-TCDD em meio de cultura BD inoculado com os fungos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> durante um período de 30 dias.	105
Figura 4.50 – Concentrações de 1,2,3,4-TCDD encontrada nas amostras analisadas.	108
FIGURA 4.51 - Possíveis metabólitos da biodegradação da 1,2,3,4-TCDD.....	110
FIGURA 4.52 - Comparação dos cromatogramas obtidos para amostras com 30 dias de cultivo com 1,2,3,4-TCDD (preto) e o controle (rosa) para cada espécie. A) <i>Aspergillus aculeatus</i> ; B) <i>Aspergillus flavus</i> ; C) <i>Aspergillus fumigatus</i> e D) <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	111
FIGURA 4.53 - Proposta de biodegradação da 1,2,3,4-TCDD pelo fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	112

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ESTUDOS DE DIOXINAS PRESENTES NA CINZA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE CEPAS MICROBIANAS EM COMPOSTAGEM AERÓBICA

A cinza do bagaço da cana-de-açúcar é um subproduto da indústria sucroalcooleira que apresenta potencial para aplicação no campo. Porém, a presença de contaminantes orgânicos como dioxinas torna necessário o desenvolvimento de estratégias para a remoção destes poluentes, como a biorremediação. Por serem as dioxinas extremamente tóxicas, é sensato o desenvolvimento de métodos eficazes e de baixo risco para avaliação inicial da capacidade microbiana de degradação destes compostos usando alternativas menos perigosas como ferramentas de triagem e seleção de micro-organismos candidatos à biorremediação. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o uso de modelos estatísticos para avaliação do crescimento microbiano em componentes de uma composteira já utilizada para tratamentos de outros resíduos sucroalcooleiros, bem como o desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos de avaliação da capacidade microbiana de degradação do corante RBBR e da 1,2,3,4-TCDD, moléculas selecionadas como modelos. O agrupamento de médias por Scott-Knott apresentou bons resultados na avaliação do crescimento microbiano, apontando inibição do crescimento de todos os fungos pela composteira, e promoção de crescimento das cepas de *Aspergillus* no meio com cinza. Ademais, foi desenvolvido e validado um método para quantificação do corante RBBR direto do meio de cultura líquido usando a técnica *dilute-and-shoot* seguido por LC-MS/MS, onde foi possível detectar até 4,8pM de corante, sendo observada uma degradação entre 40-99% do corante em 30 dias. Da maneira similar, foi desenvolvido e validado um método por GC-MS para quantificação da 1,2,3,4-TCDD em meio líquido após extração, com limites de detecção de 10ppb, onde foi observada uma remoção de até 20% da dioxina em 30 dias de cultivo. Outro ponto avaliado foi a identificação dos produtos de degradação do RBBR durante o experimento, sendo observada a presença de quatro metabólitos do corante nas amostras, o que nos permitiu propor a rota de degradação do corante por *Aspergillus flavus*.

Palavras-chave: Micro-organismos, Biorremediação, RBBR, Dioxina, Validação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE STUDY OF DIOXINS IN SUGARCANE BAGASSE ASH: EVALUATION OF BIOREMEDIATION POTENTIAL OF MICROBIAL STRAINS IN AEROBIC COMPOSTING

Sugarcane bagasse ash is a byproduct of sugar and alcohol industry with potential for field application. However, the presence of organic contaminants such as dioxins turns necessary the development of strategies for removal of those pollutants, such as bioremediation. Because of the high toxicity of dioxins, it is wise to develop effective and low risk methods for initial evaluation of microbial degradation capacity of those compounds by using less dangerous alternatives such as screening tools to select possible microorganisms as candidates for bioremediation. In such context, this work aimed to apply statistical models to evaluate microbial growth capacity under influence of components of a compost windrow already used for other sugarcane industry residues, and also development of qualitative and quantitative methods to evaluate microbial degradation of the dye RBBR and 1,2,3,4-TCDD, molecules selected as model compounds. The Scott-Knott method grouping multiple means showed good results, indicating microbial growth inhibition of all fungi in culture medium with compost windrow, and microbial growth promotion for *Aspergillus* strains in sugarcane ash doped medium. Furthermore, quantification of RBBR dye in liquid broth was developed, validated and applied through a dilute-and-shoot technique followed by LC-MS/MS, where it was possible to detect up to 4,8pM of dye, being observed a degradation from 40-99% of dye over 30 days. In a similar way, it was developed and validated a GC-MS method to quantify 1,2,3,4-TCDD in liquid broth after extraction, with detection limits of 10ppb, observing a removal of up to 20% of dioxin after 30 days. Another point evaluated was the identification of RBBR degradation products, where it was observed the presence of four dye metabolites during the course of the experiment, which allowed us to propose a degradation pathway of RBBR dye by *Aspergillus flavus*.

Keywords: Microorganisms, Bioremediation, RBBR, Dioxin, Validation

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
1.1 – A indústria Sucroalcooleira.....	2
1.2 – Dioxinas	9
1.3 – Biodegradação de poluentes.....	21
1.4 – Estratégias qualitativas e quantitativas para seleção de micro-organismos e determinação da eficiência de degradação.....	23
1.4.1 – <i>Uso de corante como ferramenta de triagem para escolha de micro-organismos candidatos à biorremediação.....</i>	<i>24</i>
1.4.2 – <i>Utilização de congêneres de menor toxicidade.....</i>	<i>25</i>
2 - Objetivos	27
3 – Materiais e Métodos	29
3.1 – Soluções e Reagentes	29
3.1.1 - <i>Solventes</i>	<i>29</i>
3.1.2 – <i>Meios de cultivo</i>	<i>29</i>
3.1.3. - <i>Padrões analíticos</i>	<i>29</i>
3.2 – Micro-organismos, fungos e amostras de campo.....	30
3.3 – Espaço físico e instrumentação.....	31
3.3.1 – <i>Laboratório de Microbiologia.....</i>	<i>31</i>
3.3.2 – <i>Cromatógrafos</i>	<i>31</i>
3.3.3 – <i>Espectrômetros de Massas.....</i>	<i>32</i>
3.4 – Metodologias.....	32
3.4.1 – <i>Análise Qualitativa da degradação do corante RBBR.....</i>	<i>32</i>
3.4.2 – <i>Avaliação da influência de componentes da leira de compostagem no crescimento microbiano</i>	<i>33</i>
3.4.3 – <i>Análise qualitativa e quantitativa da capacidade de biodegradação do corante RBBR.</i>	<i>36</i>
3.4.4 – <i>Análise qualitativa e quantitativa da degradação da 1,2,3,4-TCDD</i>	<i>42</i>
4 - Resultados e Discussões.....	47
4.1 – Análise qualitativa da degradação do corante RBBR.....	48

4.2 – Avaliações da influência de componentes da leira de compostagem no crescimento microbiano	53
4.3 – Análise qualitativa e quantitativa da capacidade de biodegradação do corante RBBR.	66
4.3.1 - <i>Otimização e validação de método para análise do corante RBBR por HPLC-ESI-MS/MS</i>	66
4.3.2 – <i>Validação do método quantitativo para análise do corante RBBR por HPLC-(ESI)-MS/MS</i>	79
4.3.3 – <i>Avaliação da capacidade de degradação do corante RBBR por micro-organismos</i>	84
4.3.4 – <i>Identificação de possíveis produtos de degradação e proposta de mecanismo de degradação</i>	88
4.4 – Análise Quantitativa da degradação de 1,2,3,4-TCDD.....	92
4.4.1- <i>Otimização instrumental e avaliação da capacidade microbiana de degradação da 1,2,3,4-TCDD</i>	93
4.4.2 – <i>Busca por produtos de degradação e elucidação das rotas metabólicas</i>	109
5 – Conclusões	113
6 – Referências Bibliográficas	115
ANEXO I	131

1 – Introdução

O crescimento populacional e a melhoria das condições de vida ocasionada pelo aumento da produtividade industrial no último século têm causado um grande impacto sobre a humanidade. Estudos de KRAUSMANN *et al.* (2009) mostraram que enquanto no século XX a população aumentou quatro vezes, a produção econômica global medida pelo Produto Interno Bruto (PIB) cresceu em mais de 20 vezes, com um aumento de oito vezes no consumo de materiais no mundo. Como consequência deste aumento demográfico e da geração de bens e consumo dos mesmos, quantidades enormes de diversos tipos de resíduos são gerados, podendo apresentar riscos à integridade humana e causar um grande impacto no ambiente.

Ao contrário de outros países que já possuem legislações para diferentes tipos de resíduos, no Brasil a preocupação com a manipulação e destinação correta de resíduos ainda é um pensamento incipiente, refletido na escassez de normas, leis e fiscalização e conscientização populacional (JURAS, 2001). A Constituição Federal, em seu artigo 23º, incisos VI e VII determina a competência comum da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios para proteger o meio ambiente e combater a poluição em qualquer de suas formas, (BRASIL, 1988), porém a falta de estudos integrados na área de gestão de resíduos sólidos, juntamente com a falta de recursos destinados ao setor, o despreparo e desinteresse das administrações municipais e a falta de cobrança por parte do Ministério Público e da sociedade como um todo vem trazendo sérios problemas junto a órgãos ambientais que, na dúvida ou na falta de conhecimentos técnicos, classificavam alguns resíduos como perigosos e assim inviabilizavam o seu reuso de forma adequada (JURAS, 2001). Apenas nas últimas décadas os esforços estão voltados para a elaboração de políticas públicas para instruir e fiscalizar a sociedade para o correto tratamento e uso dos resíduos gerados, focando a proteção da saúde pública e da qualidade ambiental, como a Lei nº 6.938/81, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente; a Lei nº 9.605/98 que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente também conhecida como Lei dos Crimes Ambientais; e a Lei nº 9.795/99, que dispõe sobre a educação ambiental e institui a Política Nacional de Educação Ambiental (BRASIL, 1981; BRASIL, 1998; BRASIL, 1999). Esta situação prevaleceu

até 02 de agosto de 2010 quando foi sancionada pelo Presidente da República a Lei 12.305/10 que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos, a qual entrou em vigor no dia 23 de dezembro de 2010 com o Decreto 7.404 que regulamentou esta Lei. (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b).

1.1 – A indústria Sucroalcooleira

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, originária do sudeste asiático. As primeiras mudas foram trazidas para o Brasil por Martim Afonso de Souza em 1525, no início da colonização portuguesa (TÁVORA, 2011). Os primeiros cultivos de cana foram realizados principalmente no litoral nordestino, sendo a aproximação com Portugal um fator essencial para o desenvolvimento da cana no Nordeste, fazendo desta atividade o núcleo central da economia da época conhecida como Brasil-colônia (1500-1670) (FAUSTO *apud* NARITOMI, 2007).

Dentro do processo de agroindustrialização do cenário brasileiro, a indústria canavieira passou por quatro fases distintas de desempenho, definidas pelo Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL). A primeira fase (1975 - 1978) foi caracterizada pelo crescimento moderado, destacando a produção de álcool anidro em destilarias anexadas a usinas de produção de açúcar, que era adicionado à gasolina devido a alta do preço do petróleo. A segunda fase (1979 - 1989) foi caracterizada pela expansão acelerada, destacando a produção de álcool hidratado (álcool combustível). A terceira fase (1990 - 1999) caracterizou-se pela desaceleração e crise do Programa, na qual o setor passou por um processo de desregulamentação estatal, pelo excesso de produção de etanol e conseqüentemente a queda de preços. A quarta fase, após 2000, iniciou-se com a renovação do PROÁLCOOL, marcada por ações corporativas articulando cada vez mais segmentos econômicos, sociais e políticos, pela liberação de preços dos produtos setoriais, introdução dos veículos bicombustíveis, aumento nas exportações de etanol e patamares de preços elevados nos curto e médio prazo, de petróleo no mercado mundial (BRAY *et al.*, 2000; ANDRADE e CARVALHO, 2002; FILHO e RAMOS, 2006; RISSARDI JÚNIOR e SHIKIDA, 2007).

Devido a fatores climáticos e geológicos favoráveis de cultivo, a produção de cana hoje em dia ocupa uma ampla área geográfica que se estende do

estado do Pará ao Rio Grande do Sul, sendo a área total plantada em 2011 de 8.442.800 hectares, com produtividade média de 76 t/ha (CONAB, 2011a). O comportamento da safra da cana no Brasil nos últimos quarenta anos confirma a tendência constante de crescimento da produção com a produtividade crescendo mais de oito vezes, passando de aproximadamente 80.000t por safra em 1970 para uma produção de 641.982t em 2011 (CONAB, 2011a).

Através do ciclo produtivo de beneficiamento da cana-de-açúcar obtém-se uma gama de produtos de alto valor comercial, com destaque do ponto de vista econômico para o açúcar e o etanol. Todavia, durante o processo de produção destas importantes *commodities*, grandes quantidades de diversos resíduos são gerados concomitantemente (CORTEZ *et al.*, 2002). Entre os principais, destacam-se as águas residuais, o vinhoto ou vinhaça, a torta de filtro e o bagaço, cujas quantidades geradas por tonelada de cana prensada estão descritas na FIGURA 1.1.

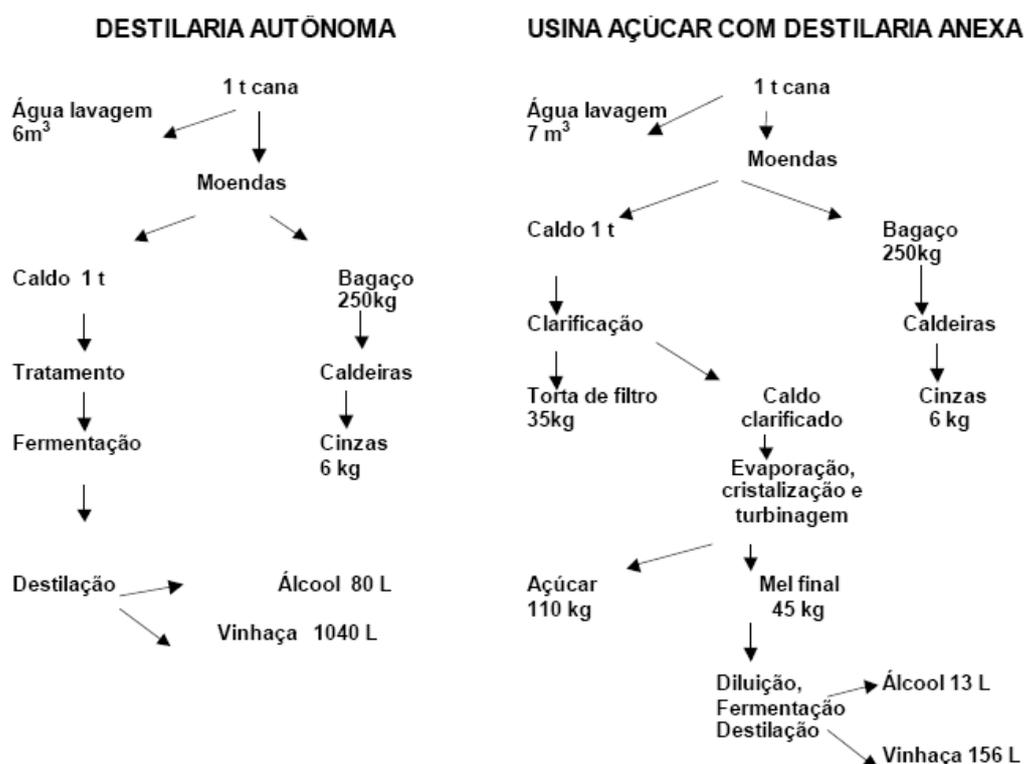


FIGURA 1.1 - Processo produtivo da cana-de-açúcar destacando os produtos e subprodutos gerados (BERTONCINI, 2008).

Além dos resíduos supracitados, a colheita mecanizada, prática esta crescente cada vez mais devido às restrições impostas à queimada de canaviais precedendo a colheita no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2002) ainda gera como resíduo de 8 a 15 toneladas de palhada de cana por hectare de canavial colhido (BERTONCINI, 2008). Embora haja melhora na fertilidade da cana quando a palha é deixada por cima da terra via processo de mineralização, o grande excesso torna a palha da cana um resíduo potencialmente poluidor, além de prejudicar a rebrota da cana, imobilizar nutrientes e propiciar a proliferação de pragas como a cigarrinha (FOLTRAN, 2008).

Devido às grandes quantidades de resíduos (ou subprodutos) de grande impacto ambiental gerados no processo de beneficiamento da cana-de-açúcar, estratégias de reaproveitamento (reciclagem) dos mesmos se tornam extremamente necessárias. Dentre as opções de disposição, a reutilização de resíduos é, sem dúvida, a opção mais interessante sob o ponto de vista econômico, ambiental, e, muitas vezes, social (PIRES E MATTIAZZO, 2008). De fato, todos os resíduos apresentados na FIGURA 1.1 encontram um novo destino na própria cadeia produtiva da cana-de-açúcar (PIACENTE, 2005). A água de lavagem e os efluentes secundários são tratados e juntamente com o vinhoto retornam para as lavouras na forma de fertirrigação. A torta de filtro em proporções adequadas pode ser utilizada como fertilizante (ALVARENGA e QUEIROZ, 2009). O bagaço da cana não encontra uma aplicação direta na lavoura e se caracteriza um problema devido ao grande volume gerado, acumulado nos pátios das usinas. Entre os possíveis destinos do bagaço de cana sendo avaliados destacam-se a utilização como componente de rações animais, em especial para a cultura de bovinos (LEME *et al.*, 2003) e para a queima em caldeiras para cogeração de energia (FULMER, 1991).

O termo “cogeração” se refere ao fato da produção e aproveitamento de mais de um tipo de energia simultaneamente, no caso energia térmica pelo aquecimento do vapor e eletromecânica pelo movimento de turbinas (CONAB, 2011b). Este tipo de cogeração elétrica proveniente da queima do bagaço e da palha da cana vem sendo utilizado em diversas usinas brasileiras e estrangeiras para a autossustentabilidade energética no processo produtivo. A cogeração elétrica tem recebido muita atenção devido ao seu alto potencial energético excedente. Uma vez em funcionamento, a cogeração elétrica de uma usina é capaz de torná-la autossustentável em termos de energia elétrica e térmica, além de gerar renda

através de uma quantidade excedente de energia elétrica que pode ser exportada para a rede elétrica urbana e pela venda de créditos de carbono, o que já vem sendo realizado por algumas usinas do estado de São Paulo (ALVES *et al.*, 2008). De fato, em levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em março de 2011 (CONAB, 2011b), cerca de 5,6% da matriz energética brasileira já é composta pela energia excedente de usinas que possuem sistema de queima de biomassa para geração elétrica, contribuindo para o desenvolvimento do setor energético no país.

Apesar dos inúmeros resultados positivos com a queima da biomassa da cana-de-açúcar para a cogeração elétrica, surge um novo problema: após a queima de matéria orgânica em caldeiras, cinzas são produzidas como resíduo (FIGURA 1.2.a). Somente na safra 2009-2010 estima-se que houve uma produção de aproximadamente 3.200 toneladas de cinzas em caldeiras através da queima da cana (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Para cada tonelada de bagaço de cana queimado, são gerados em média 6Kg de cinzas (BERTONCINI, 2008). A cinza proveniente da queima do bagaço de cana-de-açúcar é um material em sua maioria inorgânico, apresentando como principal composto químico o dióxido de silício (SiO₂), normalmente em quantidade acima de 60% (m/m) (CORDEIRO *et al.*, 2009). A cinza ainda é composta de diversos outros componentes, como mostra a TABELA 1.1.

TABELA 1.1 - Composição química de cinzas provenientes de usinas da região central do estado de São Paulo. SBA-J: Jaú, SBA-I: Ibaté, SBA-B: Barra Bonita, SBA-A: Araraquara. Fonte: SALES e LIMA, 2010

Composto	SBA-J (%)	SBA-I (%)	SBA-B (%)	SBA-A (%)
SiO ₂	88,2	96,2	62,7	93,5
Fe ₂ O ₃	5,1	1,7	8,8	2,6
Al ₂ O ₃	2,3	0,2	4,5	1,2
K ₂ O	1,3	0,3	1,8	0,8
Na ₂ O	0,1	-	0,1	<0,1
Ti ₂ O	1,0	0,2	3,1	0,5
CaO	0,6	0,1	0,9	0,4
P ₂ O ₅	0,4	0,1	0,7	0,2
MgO	0,4	<0,1	0,6	0,3
SO ₃	<0,1	0,1	0,2	<0,1
LOI	0,35	1,04	16,28	0,34

LOI: Loss on Ignition (Perda ao fogo).

O destino corrente destes resíduos tem sido o acúmulo nos pátios das usinas (FIGURA 1.2.b), que encontraram uma forma de diminuir o volume acumulado através da sua utilização no solo das áreas plantadas com cana-de-açúcar (FIGURA 1.2.c). O uso das cinzas em áreas cultivadas se justifica por ser uma fonte de macro e micro nutrientes essenciais para a produção agrícola, sendo o potássio o principal elemento, pela capacidade de corrigir o pH do solo, melhora nas propriedades físicas e químicas do solo, elevada capacidade de retenção de água ajudando na conservação de água no solo melhorando o desenvolvimento da cultura e reduzindo impactos ambientais provocados pela irrigação. Além disso o reuso da cinza fecha um ciclo, contribuindo para a economia na produção com diminuição dos custos de aquisição de fertilizantes potássicos, calcário, despesas de transporte e de disposição final das cinzas em aterros industriais (BRUNELLI, 2006). Outras aplicações para as cinzas também vêm sendo avaliadas, como a incorporação da cinza no cimento como pozolana, substituindo a areia (HERNÁNDEZ *et al.*, 1998; CORDEIRO *et al.*, 2008). O fato de reaproveitar a cinza, no entanto, ignora a possibilidade da presença de contaminantes como agroquímicos persistentes aplicados na plantação que acompanham o bagaço e não são destruídos e/ou outros componentes orgânicos que são formados no processo de queima (SALES e LIMA, 2010).



FIGURA 1.2 – Etapas da cinza do bagaço da cana-de-açúcar na indústria. a) Retirada da cinza da caldeira após queima do bagaço Fonte: Sales e Lima, 2010. b) Acúmulo das montanhas de cinza no pátio da usina São José da Estiva, situada em Novo Horizonte-SP. c) Aplicação da cinza no campo, durante o plantio da cana planta.

Uma nova alternativa para os subprodutos da indústria sucroalcooleira e sucroenergética está sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Professor Moacir Rossi Forim da UFSCar, em parceria com o Departamento de Ciência de solo da ESALQ-USP, as empresas Baraúna Comércio e Indústria Ltda.-EPP (Catanduva – SP) e a Usina São José da Estiva S/A (Novo Horizonte – SP), para desenvolvimento de um fertilizante organomineral através da compostagem aeróbica dos resíduos de processos da cana como bagaço, torta de filtro e cinza, no próprio pátio da usina. A FIGURA 1.3 mostra um exemplo das leiras de compostagem, que atingem altura e largura de 2,0 x 2,0 metros, com até 100 metros de comprimento.



FIGURA 1.3 - Leiras de compostagem aeróbica em diversos estágios de produção. Usina São José da Estiva, Novo Horizonte – SP.

A compostagem, aplicada para controlar a decomposição de materiais orgânicos tem como finalidade obter, no menor tempo possível, um material estável, rico em húmus e nutrientes minerais, com atributos físicos, químicos e biológicos superiores àqueles encontrados nas matérias-primas. Além disso, busca promover alterações físico-químicas nestes resíduos, ajudando a acabar com um contrassenso que geralmente prevalece nos órgãos responsáveis pelos licenciamentos ambientais no que concerne à correta disposição dos resíduos gerados pelo processo produtivo da cana-de-açúcar. O processo visa proporcionar uma solução mais viável para a destinação destes resíduos, pois o composto orgânico resultante da compostagem atende todas as exigências de qualidade com baixos índices de contaminantes exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA) e assim se torna apto a receber o registro de fertilizante orgânico ou organomineral por este órgão de acordo com a Lei nº 6.894/80, sancionada apenas em 2004 pelo decreto nº 4.954 (BRASIL, 1980; BRASIL, 2004), que dispõe sobre a fiscalização da produção e comércio de fertilizantes. Em concordância com a Lei nº 6894/80, no dia 21 de dezembro de 2010 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do Governo Paulista, publicou a Decisão de Diretoria nº 388/2010/P que em sua premissa 1.13 afirma:

“A aplicação em solo agrícola de resíduos ou efluentes que possuam registro no MAPA como fertilizantes não depende de manifestação da CETESB, uma vez que resíduos ou efluentes registrados no MAPA são enquadrados como produto agrônomo” (SÃO PAULO, 2010).

Assim, a aplicação eficiente dos resíduos do beneficiamento da cana-de-açúcar na lavoura como fertilizante apresenta vantagens ambientais e econômicas, diminuindo o uso de adubos sintéticos, além de evitar que estes efluentes potencialmente tóxicos como vinhaça, água de lavagem e torta de filtro sejam depositados diretamente em corpos d'água ou outros ambientes que sofreriam consequências desastrosas (UNICA, 2007). Do ponto de vista financeiro, estima-se que apenas a vinhaça, em função do fornecimento de potássio, de nitrogênio e de água quando aplicada ao solo como fertilizante seja responsável por economizar cerca de US\$ 75 por hectare, quando retornada à plantação de maneira ambientalmente correta (ROSSETO, 2004).

Todavia, a incorporação da cinza como componente na produção de fertilizante organomineral dos resíduos da indústria sucroalcooleira apresentam um grande inconveniente. Como observado na Tabela 1.2 referente à composição química da cinza, existe um resíduo denominado perda ao fogo (*Loss On Ignition*, LOI). Dentro desta classe estão compostos orgânicos resultantes da combustão incompleta do material, incluindo carvão, restos de biomassa não carbonizada e traços de diversos compostos que contenham carbono orgânico formados sob as condições presentes nas caldeiras e que ficam adsorvidos na matriz carbônica, como por exemplo, as dioxinas. YIVE e TIROUMALECHETTY (2008) analisaram amostras de cinzas de diversas etapas do processo de combustão do bagaço da cana-de-açúcar, encontrando dioxinas com valores entre 2.2-190 picogramas de toxicidade equivalente de dioxinas (TEQ) por grama de cinza.

1.2 – Dioxinas

As dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDD - *polychlorinated-p-dibenzodioxins*) e os dibenzofuranos policlorados (PCDF - *polychlorinated dibenzofurans*), são duas classes de compostos aromáticos tricíclicos, compostas de dois anéis aromáticos ligados por uma ou duas ligações carbono-oxigênio-carbono nas PCDDs e nos PCDFs respectivamente. Uma terceira classe de compostos conhecida como bifenilas policloradas (*Polychlorinated byphenyls* - PCBs) também são formadas por dois anéis aromáticos ligados entre si através de uma ligação carbono-carbono simples. Os anéis podem apresentar hidrogênio e cloro como substituintes em todas as combinações, sendo possível a formação de 75 PCDDs, 135 PCDFs e 209 PCBs, como mostram as suas estruturas genéricas dispostas na FIGURA 1.4

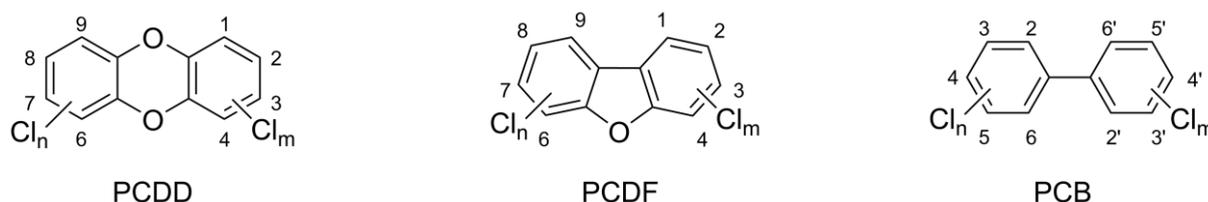


FIGURA 1.4 - Estrutura molecular das classes de substâncias comumente chamadas de 'dioxinas'.

Apesar de apresentarem as mesmas posições nos anéis disponíveis para substituição por átomos de cloro, existem uma maior quantidade de isômeros de furanos policlorados com relação às dioxinas. Esta diferença é observada devido à ausência de simetria nos PCDFs, que possuem os dois anéis aromáticos ligados por duas diferentes conexões, uma ligação éter e uma ligação σ entre dois carbonos sp^2 , enquanto que nas dioxinas policloradas as duas conexões são feitas pelo mesmo tipo de ligação éter, logo não existem estruturas *meso* nos PCDFs, como ocorre nas PCDDs (FIGURA 1.5). No exemplo, pode-se observar que as estruturas 2,7-dicloro-dibenzo-*p*-dioxina e 3,6-dicloro-dibenzo-*p*-dioxina são imagens especulares superponíveis através de uma rotação C_2 no eixo z, e a simetria existente no anel central as tornam isômeros *meso*, indistinguíveis sem a presença de um marcador como um átomo substituído por um isótopo radioativo. Nos furanos, a falta de simetria no anel central torna as moléculas de 2,7-dicloro-dibenzofurano e

3,6-dicloro-dibenzofurano imagens não superponíveis e conseqüentemente distinguíveis entre si. A rotação C_2 no eixo z comprova a falta de similaridade entre as duas estruturas dos PCDFs.

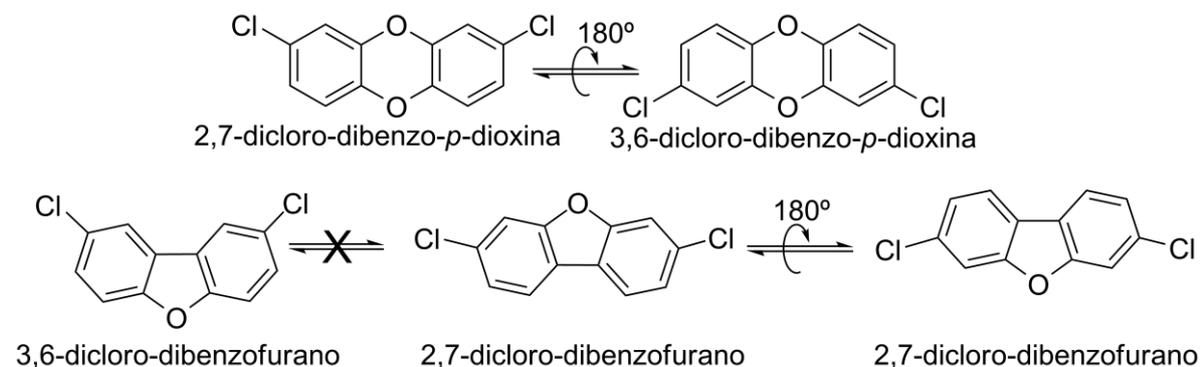


FIGURA 1.5 - Representação das propriedades estruturais das dioxinas e furanos.

O termo 'dioxina' é comumente utilizado para generalizar todos os componentes enquadrados como extremamente tóxicos destas classes de substâncias (PCDDs, PCDFs e PCBs), e será usado durante o texto para facilitar a compreensão. Estes compostos apresentam propriedades físicas e químicas semelhantes, porém a sua ação biológica pode variar drasticamente de acordo com o padrão de substituição dos átomos de cloro presentes nas estruturas aromáticas. Dioxinas em geral são apolares, muito pouco solúveis em água, extremamente lipofílicas e bio-, física- e quimicamente estáveis, o que as tornam candidatas ideais para o acúmulo no meio ambiente. Calcula-se que o tempo de meia-vida de PCDD/Fs em sedimentos naturais seja maior que 100 anos (SINKKONEN e PAASIVERTA, 2000).

Quase todos os efeitos tóxicos e biológicos relacionados com a ação das dioxinas em organismos vivos, resumidos na TABELA 1.2, são mediados através do receptor aril-hidrocarboneto (AhR), uma porção de uma proteína receptora citosólica presente na maioria dos tecidos de vertebrados (POLAND *et al.* 1985; SAFE, 1985). A interação das dioxinas com o receptor AhR está representada na FIGURA 1.6.

TABELA 1.2 - Manifestações clínicas causadas por dioxinas descritas na literatura. Adaptado de SCHECTER *et al.*, 2006

Manifestação Clínica	Composto	Manifestação Clínica	Composto
Câncer	PCDD/Fs	Dano ao fígado	2,3,7,8-TCDD
Imunodeficiência	PCDD/Fs e PCBs	Erupções cutâneas	2,3,7,8-TCDD
Anormalidade Reprodutiva	PCDFs e PCBs	Cloroacne	PCDD/Fs
Anormalidade no desenvolvimento	TCDD	Prurido	PCDFs e PCBs
Patologia de SNC e SNP	PCDFs e PCBs	Hipertricose	2,3,7,8-TCDD
Diabetes	2,3,7,8-TCDD	Conjuntivite hiperpigmentativa	PCBs
Tireoide	2,3,7,8-TCDD	Vômito	2,3,7,8-TCDD
Decréscimo da função pulmonar	PCBs	Perda de apetite	2,3,7,8-TCDD
Aumento de colesterol	2,3,7,8-TCDD	Dor de cabeça	PCDFs e PCBs
Morte por doença cardiovascular	PCDD/Fs	Fadiga	PCDFs e PCBs
Morte por doença isquêmica	PCDD/Fs	Mudança na testosterona	2,3,7,8-TCDD

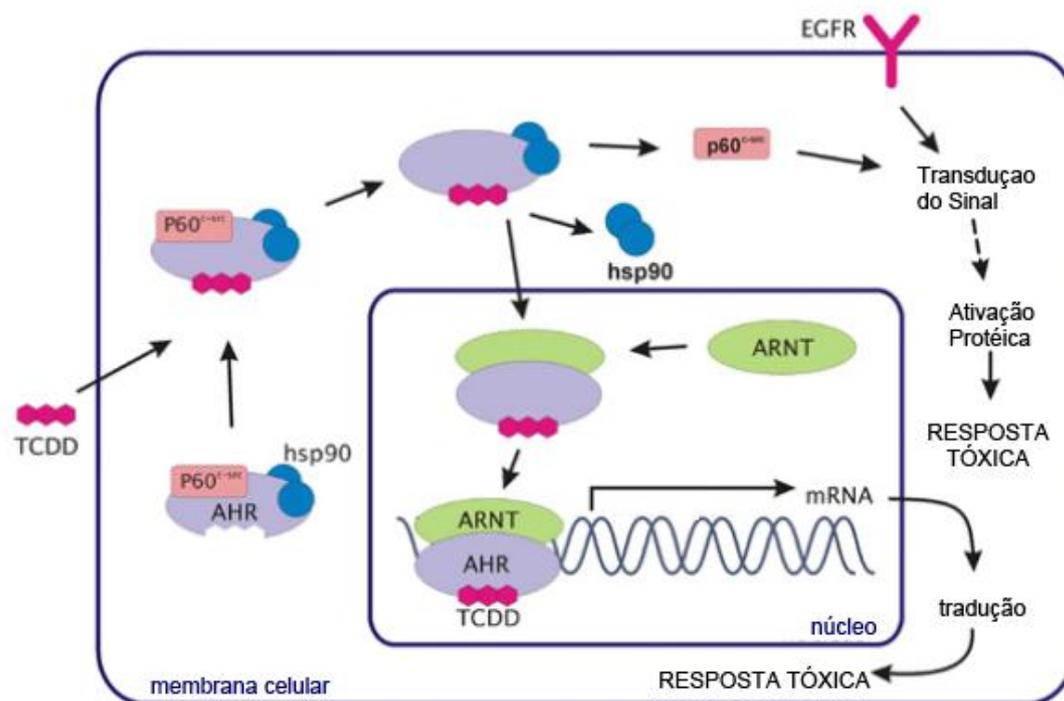


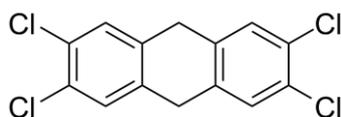
FIGURA 1.6 – Mecanismo de interação das dioxinas com o receptor AhR. Adaptado de WILLIAMS, 2011

Estudos sobre a relação estrutura-atividade demonstram que a atividade biológica prejudicial aos organismos vivos se correlaciona com congêneres que apresentem uma conformação quase planar e átomos de cloro nas posições 2,3,7,8 (POLAND e KNUTSON, 1982; SAFE, 1986). Átomos de cloro em posições *orto* (ex. posições 1, 4, 5 e 8) desfavorecem estericamente uma conformação planar, o que ameniza a sua atividade biológica, fazendo com que apenas 7 dioxinas e 10 furanos dos 210 tipos diferentes de PCDDs e PCDFs apresentem alta toxicidade, baseadas nas posições 2,3,7,8 cloradas e na conformação planar adotada (SAFE, 1986; U.S. EPA 1989). Entre as bifenilas, as que apresentam toxicidade semelhante as dioxinas e portanto enquadradas no mesmo grupo toxicológico são os PCBs que apresentam as posições *para* cloradas, além de pelo menos 2 posições *meta* e no máximo 1 cloro em *orto*, sendo este grupo de 12 moléculas conhecido como bifenilas coplanares (Co-PCBs). As moléculas do grupo das dioxinas que apresentam toxicidade humana conhecida estão listadas na TABELA 1.3.

TABELA 1.3 - Congêneres das dioxinas, furanos e bifenilas policloradas que apresentem toxicidade relacionada com o receptor AhR.

Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas	Dibenzofuranos policlorados	PCBs
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDD	3,3',4,4'-tetraCB (PCB77)
1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-PeCDD	3,4,4',5-tetraCB (PCB81)
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDD	3,3',4,4',5-pentaCB (PCB126)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDD	3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB169)
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	2,3,3',4,4'-tetraCB (PCB105)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,2,3,7,8,9-HxCDD	2,3,4,4',5-pentaCB (PCB114)
OCDD	2,3,4,6,7,8-HxCDD	2',3,4,4',5-pentaCB (PCB123)
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDD	2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB156)
	OCDD	2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB157)
		2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB167)
		2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB189)

A molécula mais tóxica deste conjunto de substâncias é a 2,3,7,8-TCDD representada na FIGURA 1.7, sendo apontada por GROSSI (1993) como a substância de baixo peso molecular mais tóxica já identificada pelo ser humano, tendo a sua toxicidade ultrapassada apenas por toxinas proteicas, como mostra a TABELA 1.4. Novos estudos como a análise metabolômica por LC-MS/MS aparecem como ferramentas promissoras para a avaliação dos circuitos metabólicos da 2,3,7,8-TCDD e sua real interação com o organismo (LIN *et al.*, 2011).



2,3,7,8-TCDD

FIGURA 1.7 – Molécula de 2,3,7,8-TCDD, a mais tóxica dos congêneres.

Inicialmente acreditava-se numa origem totalmente antropogênica das dioxinas, associando-se o aumento da sua concentração no ambiente durante o século XX com a industrialização. Todavia, GREEN *et al.* (2004) observaram que as dioxinas estão naturalmente presentes na natureza em nível de traços, em amostras de solos e tecidos desde períodos anteriores à revolução industrial. Deste modo, atribui-se também a presença de dioxinas no meio ambiente a fenômenos naturais, como erupções vulcânicas e queimadas (FEDOROV, 1993; PEREIRA, 2004). GULLETT *et al.* (2006) mostraram em estudos laboratoriais que a queima da palha da cana previamente à colheita contribui para a presença de dioxinas no ambiente, com produção de até 253ng de equivalentes tóxicos de 2,3,7,8-TCDD por quilograma de carbono queimada, corroborando com afirmação da formação de dioxinas por queima de matéria orgânica.

TABELA 1.4 - Comparação entre concentrações de dose letal para diversos compostos. Fonte – Adaptado de GROSSI, 1993

Substância	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Dose letal (µg.kg ⁻¹)
Botulinustoxina A	900.000	0,00003
Tetanustoxina	150.000	0,0001
Ricina	66.000	0,02
Crotoxina	30.000	0,2
Difteriotoxina	72.000	0,3
2,3,7,8-TCDD	320	1
Tetradoxina	319	10
Aflatoxina B1	312	10
Curare	696	500
Estricnina	334	500
Nicotina	162	1.000
Cianeto de sódio	49	10.000
Fenobarbital	232	100.000

Dentre as diversas fontes geradoras de dioxinas, podemos citar algumas de menor importância como a indústria de produção de papel, principalmente na etapa de clareamento da polpa, petroquímica, produção de herbicidas e inseticidas e diversos processos industriais que envolvam tratamentos térmicos (DAVY, 2004; PEREIRA, 2004). Porém, como descrito por KULKARNI *et al.* (2008a), as principais fontes de dioxinas geradas como subprodutos indesejáveis são os processos de combustão, em especial incineradores.

A presença de dioxinas em incineradores foi observada no fim da década de 70 (OLLIE *et al.*, 1977), e expandida para todos os processos de combustão incompletos onde possa ocorrer a presença de cloro, de fontes naturais ou industriais (BUMB *et al.*, 1980). Desde então, o mecanismo de formação como subproduto não intencional em diversos processos vem sendo minuciosamente estudado por grupos de pesquisa ao redor do mundo. (MORIMOTO e TATSUMI, 1997; WEBER e SAKURAI, 2001; XHROUET *et al.*, 2001; RYU *et al.*, 2004; ÖBERG *et al.*, 2008; NÓBREGA *et al.*, 2009).

A combustão de materiais contendo carbono e traços de cloro com a concomitante formação de PCDD/Fs pode ser explicada por dois mecanismos principais, os quais não devem ser considerados como mutuamente exclusivos. O primeiro aponta a formação por um processo homogêneo de fase gasosa de dioxinas através de rearranjos moleculares de precursores aromáticos clorados ou não, como radicais fenoxi, clorofenóis e clorobenzenos (ALTWICKER, 1996; HUNSINGER *et al.*, 1997; RYU *et al.*, 2005a). O segundo mecanismo indica a síntese *de novo* de dioxinas através de um processo heterogêneo envolvendo oxidação e cloração de átomos de carbono da matriz por catalisadores como metais de transição presentes na matriz, em especial o cobre (ADDINK e OLLIE, 1995; LI *et al.*, 2006). As teorias de formação através de precursores e *de novo* são eficientemente usadas para descrever o processo de formação como um todo, porém ainda há um debate com relação à importância de cada um dos métodos na formação dos congêneres, com trabalhos apontando resultados divergentes (HUANG e BUEKENS, 1995; STIEGLITZ *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1999; EVERAERT e BAEYENS, 2002; TUPPURAINEN *et al.*, 2003; STANMORE, 2004; RYU *et al.*, 2005b; BRIOIS, 2007; ALTARAWNEH *et al.*, 2009). Ambos os mecanismos podem ser observados na FIGURA 1.8.

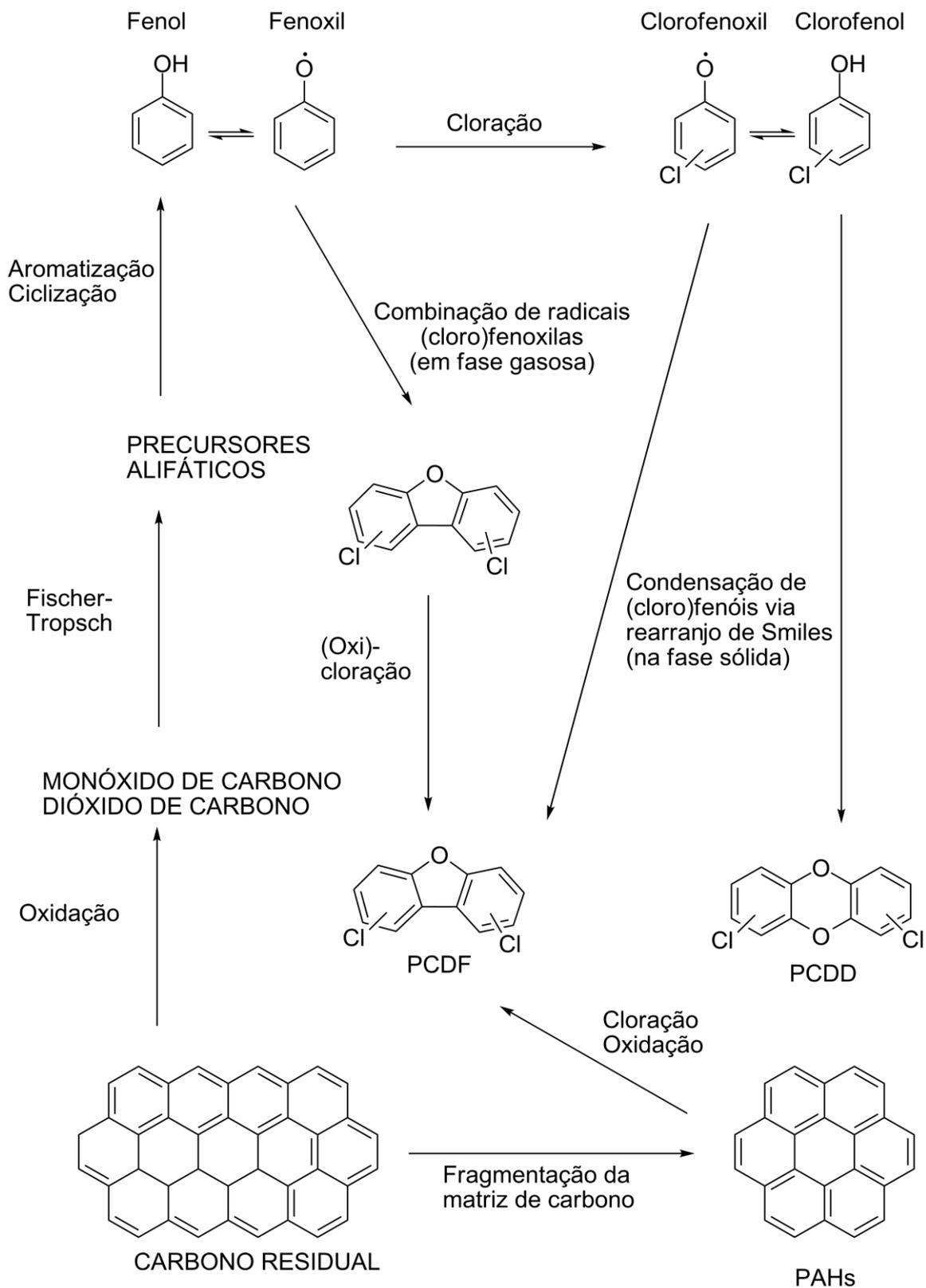


FIGURA 1.8 - Formação de dioxinas em processos de combustão. Adaptado de Tuppurainen *et al.*, 2003.

Apesar de processos industriais serem os principais responsáveis pela liberação de dioxinas no ambiente, mais de 90% da exposição de humanos a dioxinas é através da cadeia alimentar, com produtos de origem animal sendo os responsáveis pela maior parcela (LIEM *et al.*, 2000). Isto se deve principalmente devido ao efeito chamado de biomagnificação, onde ocorre o acúmulo de substâncias lipofílicas nos tecidos dos organismos ao longo da cadeia heterotrófica, causando maior acúmulo destas substâncias tóxicas aos seres vivos do topo da cadeia alimentar (KANG *et al.*, 2002). A TABELA 1.5 ilustra o consumo médio diário de dioxinas um cidadão norte-americano durante toda a vida (SCHECTER *et al.*, 2001).

TABELA 1.5 - Média norte-americana de consumo diário de dioxinas através da alimentação. Fonte: SCHECTER *et al.*, 2001.

Idade	Gênero	TEQ ^a (pg.dia ⁻¹)					TEQ Total (pg.dia ⁻¹)
		Carne	Peixe	Laticínios	Ovos	Vegetais	
0-1	Homem e Mulher			252,0			252
1-11	Homem	32,8	4,8	74,8	5,9	25,6	144
	Mulher	31,8	5,4	71,0	5,2	27,5	141
12-19	Homem	61,3	4,8	81,9	6,6	35,9	191
	Mulher	41,5	4,2	57,7	4,5	25,0	133
20-79	Homem	61,7	14,5	49,1	9,5	36,4	171
	Mulher	38,8	10,8	36,9	5,9	28,5	121
80+	Homem	38,9	3,0	38,7	8,6	36,3	126
	Mulher	25,5	11,4	43,2	4,5	26,6	111

^a Toxicidade Equivalente de 2,3,7,8-TCDD.

Por serem altamente resistentes a degradação e acumular no meio ambiente, as dioxinas, furanos e bifenilas policloradas foram enquadradas pela Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (2002), documento elaborado pelo PNUMA (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente), num grupo de 12 substâncias nomeadas como “Dúzia Suja”, que posteriormente foi ampliado para 21 classes de moléculas, conhecidas coletivamente pelo nome de Poluentes Orgânicos Persistentes ou pelo acrônimo POPs, derivado da sigla em inglês (*Persistent Organic Pollutants*). Medidas tomadas pelos países envolvidos no Tratado visam eliminar as fontes de produção destes POPs. Atualmente 170 países já aderiram ao Tratado, sendo o Brasil um dos

responsáveis regionais da América Latina para o controle dos POPs através da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), nomeada em 2008 como centro regional para a Convenção de Estocolmo sobre POPs, para os Países da América Latina e Caribe (COP3, 2007).

Como as formas de exposição geralmente apresentam uma mistura complexa de componentes, se faz necessária a quantificação da atividade biológica esperada usando uma métrica comum. Para isso foi designado o congênere mais potente 2,3,7,8-TCDD como referência, podendo ser a toxicidade de cada um dos outros componentes comparativamente avaliada. A potência da mistura de dioxinas é então expressa em Toxicidade Equivalente de 2,3,7,8-TCDD, ou TEQ (*Toxicity Equivalent*). O valor de TEQ para uma mistura é calculado pela somatória de todos os valores obtidos pela multiplicação da massa ou a concentração de cada congênere (C_i) que apresente característica tóxicas da classe de dioxinas por seu Fator de Toxicidade Equivalente (TEF, *Toxicity Equivalent Factor*), como mostra a Equação 1. Estes valores de TEF foram elaborados a partir de diversos ensaios bioquímicos e toxicológicos (LAWRENCE, 2003).

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (C_i \times TEF_i) \quad (1)$$

Desde o começo da década de 90 a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem organizado diversas reuniões como intuito de harmonizar internacionalmente os valores propostos de TEF para dioxinas, furanos e bifenilas, podendo assim disponibilizar recomendações para as autoridades reguladoras nacionais. A última atualização foi publicada em 2006 (VAN DEN BERG *et al.*, 2006), e apresentam os valores descritos na TABELA 1.6.

Diversos acidentes e incidentes são relatados na literatura, a maioria nos últimos 50 anos (SCHECTER *et al.* 2006; HITES, 2011). A principal contaminação por dioxinas é relacionada com o uso do Agente Laranja pelo exército americano na guerra do Vietnã, uma mistura dos herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) usada como desfolhante e que continha 2,3,7,8-TCDD como impureza produzida durante a síntese dos herbicidas. Estima-se entre 170-680kg de 2,3,7,8-TCDD despejadas sobre o país entre 1965 e 1970 (DWERNYCHUK *et al.*, 2002). Acidentes no Japão em 1968 (*Yusho disease*) e em Taiwan em 1979 (*Yucheng disease*) devido ao

consumo de óleo de arroz contaminado por dioxinas afetou milhares de pessoas, e seus efeitos vem sendo estudado até hoje como análise de contaminação humana a longo prazo, sendo ainda observado diversos efeitos clínicos (GUO *et al.* 1997; ONOZUKA *et al.*, 2011).

TABELA 1.6 - Valores de Fator de Toxicidade Equivalente (TEF) para cada congêneres que apresenta características de dioxinas.

Valores de TEF da OMS em 1998 e 2005		
Composto	OMS TEF 1998	OMS TEF 2005
Dibenzo-p-dioxinas policloradas		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Dibenzofuranos policlorados		
	WHO TEF 1998	WHO TEF 2005
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
PCBs não substituídos em <i>orto</i>		
	WHO TEF 1998	WHO TEF 2005
3,3',4,4'-tetraCB (PCB77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB169)	0.01	0.03
PCBs mono-<i>orto</i>-substituídos		
	WHO TEF 1998	WHO TEF 2005
2,3,3',4,4'-tetraCB (PCB105)	0.0001	0.0003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB114)	0.0005	0.0003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB118)	0.0001	0.0003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB123)	0.0001	0.0003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB156)	0.0005	0.0003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB157)	0.0005	0.0003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB167)	0.00001	0.0003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB(PCB189)	0.0001	0.0003

No Brasil, poucos trabalhos foram realizados sobre a questão da contaminação do ambiente por dioxinas, e em sua maioria realizados pela CETESB. Um dos exemplos dos estudos da companhia (CETESB, 1996 e 2002) foi comparar os valores de TEQ no ar das cidades de São Paulo, Araraquara e Cubatão. Observou-se uma pequena redução na média dos valores de TEQ encontrados em 2002 quando comparados aos valores obtidos em 1996, atribuídos a menor presença de carros sem catalisadores apropriados. Num trabalho similar, Assunção *et al.* (ASSUNÇÃO *et al.*, 2005; ASSUNÇÃO *et al.*, 2008) observaram uma redução de 34,4% nos valores de TEQ de dioxinas no ar da cidade de São Paulo, comparando dados de 2000-2001 com 2006. Uma revisão sobre POPs no Brasil feita por ALMEIDA *et al.* (2007) mostra como as dioxinas e furanos são compostos ainda pouco estudados em território nacional quando comparado aos outros componentes considerados como poluentes orgânicos persistentes. A única legislação vigente até o momento é a resolução CONAMA 313 (2002), que limita a 0,50 ng/m³ de dioxinas em efluentes gasosos, porém a sua presença em outras matrizes ainda não é regulamentada.

As agências nacionais dos países mais industrializados como EUA, Japão e membros da União Européia possuem métodos específicos para determinação de dioxinas em diversas matrizes. Nos Estados Unidos atualmente existem diversos métodos analíticos usados para determinação de dioxinas, sendo os métodos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) os mais aplicados. A EPA 8280 usa espectrometria de massas de baixa resolução com resultados em níveis de ppb a ppt, enquanto que EPA 8290 utiliza espectrometria de massas de alta resolução com resultados na faixa de ppt a ppq, sendo ambos descritos para matrizes como solo, água, tecidos, efluentes, sólidos, cinzas, entre outros (US EPA, 2008). Entre os métodos que empregam instrumentação com detector por massas, empregados não só nos EUA como por outros países como membros da União Europeia e Japão, as metodologias de extração e *clean-up* são similares, geralmente empregando pré-tratamento ácido seguido extração por Soxhlet, aliado a uma etapa de limpeza de amostra usando colunas de sílica multi camadas e/ou colunas de florisil e carbono/celite, usando como método analítico de separação e detecção cromatografia gasosa de alta resolução, usando a técnica de diluição isotópica para caracterização e quantificação no espectrômetro de massas

com impacto eletrônico no modo positivo (EN 1996a; EN 1996b; EN1996c; COMMISSION 2002a; COMMISSION 2002b; JIS, 2005; US EPA, 2008).

Apesar da existência de metodologias validadas pelas agências nacionais de vigilância de diversos países, todas as etapas apresentam diversas variações extensivamente estudadas, como o uso de técnicas de extração líquida pressurizada (PREUD'HOMME e POTIN-GAUTIER, 2003; KIGUCHI *et al.*, 2007), extração por micro-ondas (CHIU *et al.*, 1997), extração por CO₂ supercrítico (VON HOLST *et al.*, 2000), extração em fase sólida (FOCANT *et al.*, 2006), fracionamento e separação por HPLC (SIRIMANNE *et al.*, 1996; RICHTER *et al.*, 1997; MARTÍNEZ-CORED *et al.*, 1999; URANO *et al.*, 2001), ionização química à pressão atmosférica assistida por benzeno em HPLC (PERAZOLLI *et al.*, 2005) e detecção por massas de baixa resolução (LATTUADA, 2003;). Diversas revisões da literatura dedicam-se a explorar as possibilidades existentes na avaliação analítica de dioxinas (LIEM, 1999; FOCANT *et al.*, 2004; FOCANT *et al.*, 2005; OLESZEK-KUDLAK *et al.*, 2007; REINER, 2010).

Além dos métodos analíticos descritos acima, existem os métodos bioanalíticos para detecção e quantificação de dioxinas. É bem descrito na literatura que as diferentes moléculas de PCDD/Fs e PCBs apresentam respostas diferentes aos sistemas biológicos investigados, correlacionando sua concentração com a sua toxicidade ou Potência Equivalente Relativa (REP) (SANCTORUM, 2007). Os métodos biológicos apresentam boa correlação com os resultados analíticos, embora algumas vezes apresentem um resultado superestimado (FOCANT *et al.*, 2001), mostrando-se uma técnica complementar à metodologia analítica de maior rapidez e menor custo, sendo características que justificam a exploração da técnica como ferramenta de triagem de amostras (BEHNISCH *et al.*, 2001). As metodologias atualmente validadas pela EPA incluem imunoensaios utilizando anticorpos específicos para PCDD/Fs (OKUYAMA *et al.*, 2004) (US EPA 4025), bioensaios utilizando células geneticamente modificadas que contém o gene de produção de luciferase do vaga-lume (CALUX[®]) sob o controle trans-ativacional do receptor AhR (US EPA 4435) e bioensaios através de técnicas de PCR para amplificação de fragmentos de elementos de resposta de DNA à ligação de dioxinas a proteínas contendo o AhR (US EPA 4430) (US EPA, 2008). Além de protocolos norte-americanos, a comunidade europeia e o governo japonês também reconheceram os

ensaios biológicos como ferramentas na avaliação de dioxinas (MINISTRY, 2005; TAKIGAMI *et al.*, 2008).

1.3 – Biodegradação de poluentes

Diversos processos físico-químicos já foram elaborados para a descontaminação de dioxinas, como tratamentos termais (STACH *et al.*, 2000; HASHIMOTO *et al.*, 2004), fotólise (ISOSAARI *et al.*, 2005), oxidação Fenton (LEE *et al.*, 2009) e redução com catalisadores de paládio (UKISU e MIYADERA, 2004; YANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008) ou hipofosfito de sódio (WANG *et al.*, 2006). Recentemente, estratégias mais verdes como, por exemplo, o uso de líquidos iônicos como absorvente tem sido descrita por KULKARNI *et al.* (2008b). Entre as desvantagens do uso de processos físico-químicos estão o grande custo envolvido na descontaminação de grandes áreas, a complexidade tecnológica e a falta de aceitação pública no uso de aterros ou incineração de resíduos perigosos (WEBER, 2007). Neste sentido, a degradação de dioxinas usando organismos vivos, ou biorremediação, se apresenta como uma alternativa ecológica e de baixo custo para remediação de áreas contaminadas, com vantagens como a realização da descontaminação *on-site*, eliminação permanente dos resíduos, atuação durante longos períodos e maior aceitação pública e governamental. (BOOPATHY, 2000; VIDALI, 2003).

Por definição, biorremediação é o uso de organismos vivos, principalmente micro-organismos, para degradar contaminantes ambientais em moléculas menos tóxicas. Neste processo os compostos são transformados por reações enzimáticas, sendo geralmente o resultado da ação de um conjunto de diversos micro-organismos presentes no mesmo ecossistema (VIDALI, 2003). A degradação pode ocorrer pela ação do metabolismo primário, onde o micro-organismo utiliza o substrato tóxico como fonte de carbono e energia, ou usando o cometabolismo, através da indução de enzimas por outros substratos que indiretamente atuam na biotransformação dos xenobióticos. Os processos podem ocorrer de forma aeróbica, usando oxigênio como reagente como no caso das enzimas dioxigenase e monooxigenase, ou então atuando de forma anaeróbica, fazendo o uso de aceptores de elétrons, que de acordo com disponibilidade e

potencial redox podem ser nitratos, ferro, manganês, sulfato e dióxido de carbono entre outros (BOOPATHY, 2000).

Os micro-organismos mais estudados como degradadores de dioxinas são as bactérias, promovendo processos como oxidação aeróbica e descloração anaeróbica (HIRAISHI, 2003; FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008). Entretanto, a maioria dos estudos com bactérias se limitam a dioxinas com até 3 átomos de cloro (PARSONS e STORMS, 1989; SCHREINER *et al.*, 1997; FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008), onde poucos avaliaram a capacidade de degradação de congêneres com quatro ou mais átomos de cloro (HONG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2004; NAM *et al.*, 2005).

Estudos indicam que fungos degradadores de lignina, conhecidos como fungos de podridão branca (*White Rot Fungi*, WRF) são capazes de produzir as principais enzimas de interesse biotecnológico na remoção de xenobióticos pelos fungos, onde se pode destacar a classe das degradadoras de lignina conhecidas coletivamente pelo nome de ligninases, que compreendem as peroxidases como a peroxidase de lignina (LiP, EC 1.11.1.14), peroxidase de manganês (MnP, EC 1.11.1.13) que são capazes de oxidar substratos aromáticos não fenólicos em cátions acrílicos radicalares subsequentemente degradados por outros processos não enzimáticos, e as polifenol oxidases, também conhecidas como laccases (benzenodiol oxigênio oxidoreductase; EC 1.10.3.2), estas oxidantes de substratos aromáticos fenólicos (KIRK *et al.*, 1992; EVANS E HEDGER, 2001). Os WRF produzem e excretam estas enzimas extracelulares que são capazes de degradar estruturas químicas complexas através de subsequentes oxidações utilizando H₂O₂ produzido pelo próprio micro-organismo através de enzimas como a glioxal oxidase, que reduz O₂ a H₂O₂ através da oxidação do glioxal à ácido glioxílico (KIRK *et al.*, 1992; MOREIRA *et al.*, 2001). Estes sistemas de enzimas possuem sítios não específicos que permitem degradar outros compostos de estrutura complexa como corantes, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), PCBs, organoclorados e dioxinas, se mostrando ótimos candidatos à biorremediação (VALLI *et al.* 1992; CAMERON *et al.*, 2000; KUBÁTOVA *et al.*, 2001; MORI e KONDO, 2002; SUHARA *et al.*, 2003; KRISHNAN *et al.*, 2004; NAKAMIYA *et al.* 2005; LONGORIA *et al.*, 2008; KAMEI *et al.*, 2009; MORI *et al.*, 2009; TORRES-DUARTE *et al.*, 2009).

Apesar da conhecida capacidade microbiana de degradação de dioxinas, apenas recentemente, ISHII e FURUICHI (2007) desenvolveram um biorreator usando uma cepa de *Pseudallescheria boydii*, usada na descontaminação de um solo contendo dioxinas diminuindo a TEQ em até 60% após 48 horas de tratamento. NAM *et al.* (2008) desenvolveram um biorreator composto de uma co-cultura de 4 cepas de bactérias (*Sphingomonas* sp. HH69, *Sphingomonas wittichii* RW1, *Pseudomonas veroni* PH-03 e *Paenibacillus* sp. VSE5L) e 5 de fungos (*Phanerochaete chrysosporium* DSM6909, *Phanerochaete chrysosporium* DSM1556, *Irpex* sp. KW3, *Trametes* sp. CH2 e *Fusarium* sp. VSO7) degradadores de dioxinas para biorremediação de cinzas volantes de um incinerador de resíduos sólidos, obtendo uma diminuição de 68,7% da toxicidade da matriz depois de 21 dias de cultivo. Para o crescimento concomitante de todas as espécies dentro do biorreator, foram incorporadas uma suspensão de células bacterianas crescidas todas em conjunto no mesmo meio e uma mistura contendo os micélios dos fungos crescidos separadamente, em uma proporção de 1:4 (m/m).

Apesar do grande estudo com relação aos fungos de podridão branca, poucos descrevem a produção de enzimas lignolíticas úteis no processo de biorremediação por outros tipos de fungos (BETTS e DART, 1988; D'SOUZA *et al.*, 1996). Recentemente a descolorização de efluentes usando gêneros de *Fusarium* e *Aspergillus*, (PANT e ADOLEYA, 2007; GOMAA *et al.*, 2010; ERUM e AHMED, 2011; GOMAA e MONTAZ, 2011) e a capacidade de fungos saprófitos marinhos de degradar pesticidas como o diclorodifenildicloroetano (DDD) (ORTEGA *et al.*, 2011) abriram uma nova gama de opções de micro-organismos capazes de degradar xenobióticos para serem avaliados.

1.4 – Estratégias qualitativas e quantitativas para seleção de micro-organismos e determinação da eficiência de degradação

Não apenas a capacidade de degradação do micro-organismo deve ser avaliada, mas também a utilidade deste como biorremediador. Uma tarefa importante é avaliar a toxicidade dos subprodutos formados pelo metabolismo do xenobiótico a ser transformado, de forma que a composição resultante do processo de biotransformação não seja igual ou mais tóxica que o composto de partida (WEBER, 2007). De fato, a Convenção de Estocolmo sobre POPs (2001) em seu

artigo 6º, parágrafo 1, Alínea d), item ii), afirma que resíduos de POPs devem ser preferencialmente destruídos ou irreversivelmente transformados, sendo crítico que os métodos de destruição não criem subprodutos que sejam eles mesmos contaminantes. Caso não seja possível, a sua disposição deve ser feita atendendo normas regionais e globais de gerenciamento de resíduos perigosos. Assim, métodos analíticos devem expandir o seu foco não apenas para a avaliação quantitativa de degradação, mas também para a elucidação dos produtos de degradação, que além de serem avaliados quanto a sua toxicidade, podem servir de prospecção para a avaliação dos sistemas enzimáticos utilizados na biodegradação dos xenobióticos.

1.4.1 – Uso de corante como ferramenta de triagem para escolha de micro-organismos candidatos à biorremediação

A capacidade de descolorização de corantes por micro-organismos foi primeiramente avaliada com os ensaios desenvolvidos por GLEEN e GOLD em 1983. Desde então, vêm sendo amplamente estudada como método para remoção de corantes em efluentes e minimização da produção de resíduos industriais (ALI, 2010). Outro interesse neste tipo de biotransformação é a possibilidade de utilização destes métodos como ferramenta de identificação de fungos produtores de enzimas com atividade lignolítica (MOREIRA *et al.*, 2001; MANJI e ISHIHARA, 2004; PATRICK *et al.*, 2011). O corante azul brilhante de remazol R (*Remazol Brilliant Blue R*, RBBR) é um dos mais utilizados corantes antraquinônicos da indústria têxtil, e sua estrutura está representada na FIGURA 1.9. Este corante é frequentemente usado como material de partida na produção de pigmentos poliméricos (SOARES *et al.*, 2001), e pode ser usado como representante de uma classe de poluentes orgânicos tóxicos e recalcitrantes, devido a alguma similaridade estrutural com certos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como o antraceno (VYAS e MOLITORIS, 1995; MECHICHI *et al.*, 2006).

A capacidade microbiana de degradação de corantes sintéticos vem sendo usada como parâmetro essencial na seleção de possíveis candidatos para processos de biorremediação de outros xenobióticos importantes, como bisfenol A, PAHs, organoclorados, PCBs e dioxinas (CHROMA *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2002; MANJI e ISHIHARA, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2005; VITALI *et al.*, 2006; SIRIPONG *et al.*, 2009; PASSARINI *et al.*, 2011). Os sistemas enzimáticos dos micro-

organismos capazes de promoverem a degradação dos corantes também podem ser isolados e usados diretamente no processo de biodegradação, como na degradação de RBBR por bilirrubina oxidase (EC 1.3.3.5) de *Myrothecium* sp. IMER1 (LIU *et al.*, 2009) e na degradação de RBBR por laccase isolada de *Trametes pubescens* (OSMA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ-COUTO, 2011). Em uma nova e interessante abordagem, VALLE-VIGON E FUERTES (2011) imobilizaram laccase comercial em nanopartículas magnéticas, conseguindo degradar >90% do corante RBBR mesmo após sucessivos ciclos de aplicação, expandindo ainda mais a capacidade de atuação de enzimas lignolíticas de baixa especificidade de substratos.

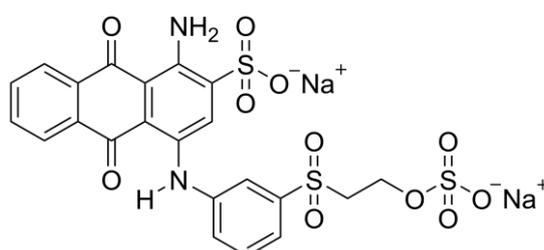


FIGURA 1.9 – Estrutura do corante Remazol Brilliant Blue R.

1.4.2 – Utilização de congêneres de menor toxicidade

Para poder realizar a análise dos produtos de degradação das dioxinas, uma quantidade relativamente alta precisa ser incorporada ao meio de cultivo, para geração de uma quantidade observável de intermediários. Devido à extrema periculosidade relacionada com a manipulação dos congêneres de maior toxicidade, e a necessidade de laboratórios dedicados com instrumentação analítica de alta tecnologia, uma estratégia prudente é a de iniciar os trabalhos com moléculas que apresentam um risco menor, como a 1,2,3,4-TCDD (FIGURA 1.10).

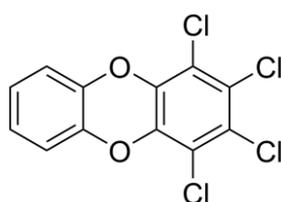


FIGURA 1.10 – Estrutura da molécula 1,2,3,4-tetracloro dibenzo-*p*-dioxina (1,2,3,4-TCDD)

BROWN *et al.* (2002) demonstraram a aplicabilidade da 1,2,3,4-TCDD como padrão de referência para avaliação da eficiência de recuperação em métodos de análise de dioxinas, independente do tipo de análise, devido à sua inatividade biológica, porém propriedade físico-química similar. Após a adição do padrão em um extrato, a concentração de 1,2,3,4-TCDD usada foi facilmente detectada por GC-ECD sem interferir na eluição e quantificação dos outros picos. Todavia, o composto não causou aumento na resposta de bioensaios, mostrando não ter atividade biológica com relação aos receptores AhR, fator responsável pela extrema toxicidade das dioxinas, o que confirmou a possibilidade de seu uso como padrão interno para análise da eficiência de um método de manipulação de dioxinas.

Alguns autores apresentam resultados sobre a degradação da 1,2,3,4-TCDD por micro-organismos. Esta molécula é usada como um dos modelos para os estudos do mecanismo de dechlorinação anaeróbica de dioxinas por bactérias em sedimentos e culturas. Um resumo dos principais resultados obtidos por diversos grupos estão no trabalho de FIELD e SIERRA-ALVAREZ (2008). Utilizando degradação aeróbica, HONG *et al.* (2002 e 2004) usaram as bactérias *Sphingomonas wittichii* RW1 e *Pseudomonas veronii* PH-03, conseguindo degradar 13,2% e 18% de 1,2,3,4-TCDD em 120 horas, observando a formação de 3,4,5,6-tetraclorocatecol e 2,3,4,5-tetracloro-6-metoxifenol como principais produtos de degradação com a cepa de *Sphingomonas*, mas apenas 3,4,5,6-tetraclorocatecol em culturas de *Pseudomonas*.

2 - Objetivos

O trabalho realizado visou abordar diversas aproximações na tentativa de criar ferramentas que possibilitem a triagem de micro-organismos candidatos à degradação de dioxinas. Entre os objetivos específicos, destacam-se:

- A avaliação qualitativa da degradação do corante RBBR por micro-organismos em placas de meio de cultura sólido;
- A influência da leira de compostagem aeróbica e de seus componentes avulsos no crescimento microbiano;
- Avaliação quantitativa da capacidade de degradação do corante RBBR em meio de cultura líquido por micro-organismos, através da otimização, validação e aplicação de um método analítico utilizando HPLC-MS/MS no modo SRM, identificação de possíveis produtos de degradação e elucidação de uma possível rota metabólica para os compostos identificados.
- Avaliação quantitativa da capacidade microbiana de remoção da 1,2,3,4-TCDD em meio de cultura líquido, avaliando técnicas de HPLC-MS/MS e GC-MS como formas de separação e caracterização, além da busca por possíveis produtos de degradação.
- Comparação entre a capacidade de remoção do corante e da dioxina, para determinar a eficiência do corante RBBR como ferramenta de triagem na seleção dos micro-organismos candidatos à biorremediação.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Soluções e Reagentes

3.1.1 - Solventes

Água deionizada ultra pura (18Ω) foi obtida através de um equipamento Milli-Q[®] da marca Millipore, utilizada para o preparo e soluções e como fase móvel para cromatografia líquida.

Água ultra pura proveniente de um sistema de filtragem e osmose reserva foi usada para o preparo dos meios de cultivo.

N,N-dimetilformamida da marca J.T.Baker foi usado para o preparo de soluções padrão de 1,2,3,4-TCDD.

Acetato de etila P.A. J.T.Baker, foi usado para extração do meio de cultura e preparo de soluções padrão diluídas de 1,2,3,4-TCDD.

Acetonitrila grau HPLC da marca J.T.Baker e Metanol grau MS da marca Tedia foram degaseificados e usados como fase móvel cromatográfica.

3.1.2 – Meios de cultivo

Meio de cultura cérebro-coração-ágar (BHA), batata-dextrose-ágar (BDA) e batata-dextrose (BD) da marca Hi-Media foram preparados de acordo com instruções do fabricante e usados para o crescimento microbiano.

Polisorbato 80 da marca Sigma foi utilizado para auxiliar na solubilização da 1,2,3,4-TCDD em meio de cultura BD e BDA aquoso.

3.1.3. - Padrões analíticos

Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) da Sigma-Aldrich foi utilizado em soluções padrões para preparo de amostras nos experimentos de degradação de corante.

1,2,3,4-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (1,2,3,4-TCDD) adquirida da empresa UnitechUSA (Medley, FL, EUA) foi utilizada como molécula padrão para estudos de degradação das dioxinas.

4,5-diclorocatecol adquirido da empresa Sigma-Aldrich foi usado como padrão interno para as análises de 1,2,3,4-TCDD.

3.2 – Micro-organismos, fungos e amostras de campo

Os fungos *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus flavus* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMI) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Estes micro-organismos foram escolhidos por apresentarem uma vasta produção de metabólitos secundários de diferentes grupos químicos, bem como a capacidade de biotransformação de substratos semelhantes as dioxinas (FUJII *et al.*, 1988; RODRIGUES, 2006).

Os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, e as bactérias *Sphingomonas capsulata* e uma cepa até o momento não identificada denominada “02-1” foram fornecidas pela empresa Krion AgroSciences, escolhidas por já serem utilizadas no processo de compostagem dos outros resíduos da indústria sucroalcooleira.

O preparo do meio de cultura foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Os meios foram preparados pela adição de uma quantidade exata de meio de cultura em pó em água destilada, todos com agitação até a completa dissolução do sólido. A água utilizada foi proveniente do sistema de filtragem e osmose reserva descrito na seção 3.1.1. Para o meio BHA, a proporção usada nos experimentos foi de 52 g.L⁻¹, para o meio BDA 39g.L⁻¹ e para o meio BD foi usada a proporção de 24g.L⁻¹.

Após a solubilização do meio em pó em água, os meios de cultura foram autoclavados sob pressão a 121°C por 20 minutos, vedados com uma rolha de algodão coberta por um chapéu de papel, sendo utilizados após o resfriamento em uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.

As bactérias em solução de células e fungos em solução de esporos foram mantidos em solução de esporos a 4°C. Quando necessário, foram inoculados e mantidos em placas de Petri contendo meio BDA ou BHA, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, sendo as placas contendo os micro-organismos repicados a cada 5 dias no caso das bactérias e quinze dias no caso de fungos para novas placas.

Amostras de bagaço prensado e triturado de cana-de-açúcar, torta do filtro rotativo do caldo da cana-de-açúcar, cinza da caldeira, solo do pátio da usina e a mistura que constitui a leira de compostagem foram obtidos na usina São José da Estiva, localizada no município de Novo Horizonte-SP. A amostra de leira de compostagem contém todos os componentes citados acima, além da incorporação de fosforita, cama de galinheiro e um conjunto de micro-organismos utilizados para aceleração do processo de compostagem aeróbica.

3.3 – Espaço físico e instrumentação

3.3.1 – Laboratório de Microbiologia

Os procedimentos experimentais que envolveram manipulação microbiológica foram realizados no Laboratório de Bioensaios, parte integrante do Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Praga (INCT-CBIP), sediado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos. O laboratório é equipado com uma autoclave vertical, fluxo laminar, agitador orbital, microscópio ótico e câmara incubadora BOD marca com controle de temperatura e fotoperíodo.

3.3.2 – Cromatógrafos

As análises instrumentais foram realizadas no Departamento de Química. Para as análises por cromatografia gasosa, foi utilizado equipamento GC-17A da Shimadzu (Shimadzu Corporation). O software utilizado para tratamento de dados foi o GCMS *Real Time Analysis*.

Para as análises cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado um conjunto de equipamentos Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), configurado com um degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto injetor G1367B, compartimento de coluna termostaticado G1316A e um detector de arranjo de diodos (DAD) G1316A. O software usado para operação do equipamento foi o Analyst 1.5.1.

3.3.3 – Espectrômetros de Massas

A saída de cromatógrafo gasoso foi acoplada a um espectrômetro de massas QP5000 Shimadzu (Shimadzu Corporation), usando uma fonte de ionização por ionização por impacto de elétrons no modo positivo (EI+), aplicando 70eV como energia de ionização.

A saída do cromatógrafo líquido estava ligada em linha com um espectrômetro de massas com analisador por triplo quadrupolo API™ 2000 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, USA). Foram utilizadas duas interfaces de ionização em pressão atmosférica (API), ionização por *electrospray* através de uma fonte TurbolonSpray® (ESI-MS) e ionização química a pressão atmosférica (APCI-MS).

3.4 – Metodologias

3.4.1 – Análise Qualitativa da degradação do corante RBBR

Para a realização do experimento, foram preparadas placas de Petri com meio de cultura sólido conforme descrito na seção 3.2, acrescida de corante na proporção de 0,05% m/v, que corresponde a concentração de 0,5g.L⁻¹, adicionado e homogeneizado ao meio após a esterilização e antes deste ser vertido em placas de Petri de 9cm de diâmetro. Aproximadamente 30mL de solução foram despejados em cada placa. Foram utilizados os meios BDA para os fungos e BHA para bactérias.

Após o resfriamento e solidificação do meio de cultura, os microorganismos foram inoculados nas placas. Para os fungos, foi usado um disco de micélio de 5mm, retirado de placas de Petri previamente incubadas contendo colônias de 5 dias. Para as bactérias, foi aplicado 10µL de uma solução aquosa de preservação diretamente no centro da placa

A avaliação foi feita diariamente, através da inspeção visual de cada placa, procurando-se por aquelas que apresentassem diminuição da coloração azulada característica do corante RBBR ou a formação de halos de descoloração nas extremidades do crescimento.

3.4.2 – Avaliação da influência de componentes da leira de compostagem no crescimento microbiano

A avaliação dos componentes da leira de compostagem no crescimento microbiano teve como objetivo determinar a capacidade microbiana de crescer e atuar como biorremediador na presença de diversos componentes sólidos constituintes da leira. Essa determinação foi importante, pois há a necessidade do micro-organismo ser capaz de crescer e biodegradar poluentes não apenas em meios de cultura laboratoriais próprios para crescimento microbiano, mas também em ambientes que simulem as leiras de compostagem aeróbica já utilizadas.

3.4.2.1 – Montagem dos experimentos

Para o experimento, foram utilizados os fungos *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Phanerochaete chrysosporium*. Na montagem dos experimentos foram selecionados 11 tratamentos através da incorporação dos componentes em quantidades específicas em meio de cultura BDA, como descrito na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Tratamentos utilizados na avaliação do crescimento microbiano para aferição da influência dos constituintes das leiras de compostagem em seu crescimento. Em negrito está destacada a sigla utilizada para identificação dos experimentos

Tratamento	Sigla	Quantidade
Meio de cultura BDA (controle)	(BDA)	-
Bagaço de cana-de-açúcar moído	(BG)	1:15 m/v
Cinza de bagaço de cana-de-açúcar	(CZ)	1:15 m/v
Torta de filtro rotativo	(TF)	1:15 m/v
Solo do pátio da usina	(TE)	1:15 m/v
Mistura da leira esterilizada	(BioE)	1:15 m/v
Mistura da leira não esterilizada	(BioN)	1:15 m/v
Corante RBRR	(RBRR)	0,05% m/v
1,2,3,4-TCDD + Polissorbato 80 + DMF	(DD)	0,026µM + 0,1%v/v + 0,33%v/v
Polissorbato80	(TW)	0,1% v/v
DMF	(DMF)	0,33%v/v

O meio de cultura foi preparado de acordo com a descrição na seção 3.2. Os tratamentos contendo componentes sólidos como bagaço, cinza, torta, solo e leira de compostagem, a incorporação dos mesmos foi realizada antes de autoclavar o meio de cultura a 121°C por 20 minutos. A adição de RBBR foi realizada utilizando o mesmo protocolo descrito na seção 3.4.1. Um tratamento contendo a leira de compostagem sem a etapa de esterilização foi preparado através da adição da mistura da leira após a esterilização, porém antes de verter a suspensão nas placas.

Devido a baixa solubilidade das dioxinas em água, uma solução estoque em DMF estéril contendo 1,2,3,4-TCDD na concentração de 2mg.mL⁻¹ foi preparada e incorporada no processo, após a esterilização do meio de cultura, com concomitante adição de polissorbato 80 para auxiliar na dispersão dos solutos. Para confirmar os resultados, foram montados experimentos de controle contendo apenas polissorbato 80 ou DMF, além de um terceiro controle contendo apenas BDA, utilizado como referência.

Cada tratamento foi realizado em triplicata, sendo avaliados os quatro fungos. Em cada placa foi inoculada no centro um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, retirado de uma placa de BDA contendo uma colônia previamente ativada por 5 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas (FIGURA 3.1). As placas inoculadas foram mantidas em incubadora sob as mesmas condições durante 15 dias. A cada 24 horas foram realizadas medidas de crescimento micelial a partir do centro da placa em duas direções perpendiculares.

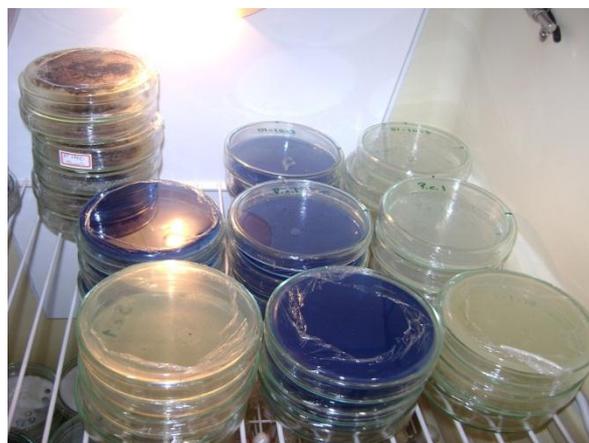


FIGURA 3.1 – Experimentos de crescimento microbiano em meio sólido. Na foto, placas de BDA contendo diversos tratamentos em estufa B.O.D.

3.4.2.2 – Tratamentos Estatísticos

Com os valores diários de crescimento, foi obtido o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) das espécies para cada tratamento através da equação 1, desenvolvida por MAGUIRE (1962) para taxa de germinação de sementes e aplicada por OLIVEIRA (1991) e NECHET (1999) para crescimento microbiano, onde D é a medida do dia, D_a é a medida do dia anterior, e N é o número de dias. Este índice é utilizado como parâmetro para a avaliação comparativa do crescimento de micro-organismos em diferentes meios de cultura (DIAS *et al.*, 2005).

$$IVCM = \frac{\sum(D-D_a)}{N} \quad (1)$$

Para a comparação dos valores de IVCM de cada tratamento, foram utilizadas duas ferramentas estatísticas. A primeira fornece uma avaliação qualitativa da semelhança entre as diferentes médias, conhecida como agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*, **UPGMA**) (SOKAL E MICHENER, 1958), comumente utilizado para avaliação de semelhança fenética de linhagens (LOZUPONE e KNIGHT, 2005). Esta técnica permite organizar os dados de acordo com a média de cada conjunto de tratamentos de uma maneira na qual os valores médios de crescimento mais próximos se agrupem primeiro através de um método de agrupamento aglomerativo ou hierárquico. Desta forma, os tratamentos ficam dispostos em um gráfico de dendograma, que permite inferir a semelhança entre os tratamentos.

A outra ferramenta utilizada para agrupamento de múltiplas médias é conhecida como teste de Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974), o qual permite utilizar as médias do índice de crescimento micelial dos tratamentos para realizar o agrupamento dos valores em diferentes grupos, sendo possível afirmar que os tratamentos são estatisticamente semelhantes aos outros tratamentos do mesmo grupo, porém estatisticamente diferentes com relação aos tratamentos dos outros grupos. Desta maneira, torna-se possível inferir quais componentes são mais semelhantes entre si, e quais apresentam inibição ou promoção de crescimento quando comparados aos controles devido ao agrupamento em conjuntos distintos. Segundo SILVA (1998) algumas vantagens deste teste com relação aos outros testes de agrupamento de múltiplas médias como teste t, Tukey, Bonferroni, Duncan

e Student-Newman-Keuls esta na ausência de ambiguidade no momento de agrupamento, não permitindo a classificação de uma mesma média em mais de um grupo como ocorre nos outros testes (BORGES E FERREIRA, 2003) e no maior controle das taxa e erro do tipo I, que ocorre quando se afirma através dos resultados obtidos que estatisticamente existe diferença entre as médias quando de fato não existe (GIRARDI *et al.*, 2009). Este tipo de teste vem sendo utilizado com sucesso em diversos trabalhos que necessitam comparar o crescimento microbiano sob influência de diversos fatores (NASSER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2011)

Para a obtenção dos agrupamentos das médias pelo teste de Scott-Knott foi utilizado o *software* SISVAR (FERREIRA, 2008), desenvolvido no departamento de Ciências Exatas da universidade Federal de Lavras disponível no site <http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>.

3.4.3 – Análise qualitativa e quantitativa da capacidade de biodegradação do corante RBBR.

Para obter uma noção mais precisa da capacidade microbiana de degradação do corante e entender as possíveis biotransformações dos substratos através da investigação dos produtos de degradação formados, foi necessário desenvolver um novo experimento em meio de cultura líquido.

3.4.3.1 – Montagem do experimento de degradação do corante em meio líquido

Para a realização deste experimento, os seguintes fungos foram selecionados: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Phanerochaete chrysosporium*. O meio de cultura BD foi preparado como descrito na seção 3.2. Adicionou-se 1,2 gramas do meio de cultura BD em pó em 50mL de água destilada em um erlenmeyer de 250mL, agitado até a completa dissolução e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após o resfriamento do meio em uma câmara de fluxo laminar estéril, 25mg de RBBR foi incorporado em cada erlenmeyer, com leve agitação até a completa dissolução do corante. Na sequencia foi adicionado um disco de micélio de 5mm de diâmetro, proveniente de uma placa de Petri com colônias de 5 dias em meio BDA foi adicionado. Para experimentos de controle, foram montados tratamentos sem inoculo, avaliando-se a degradação natural do corante em meio de cultura BD, e outro tratamento contendo micro-organismos, porém sem o uso do corante RBBR, para comparação do crescimento microbiano e

como uma amostra branco para a busca por produtos de degradação. Cada tratamento foi realizado em triplicata. A Figura 3.2 ilustra a concepção dos tratamentos utilizados neste experimento.



FIGURA 3.2 – Representação dos experimentos de cultivo de micro-organismos em meio líquido com corante RBBR. À esquerda, meio de cultura líquido BD com incorporação do corante RBBR. À direita, o meio de cultura sem aditivos.

Os experimentos foram mantidos sem agitação (estático) e a luz e temperatura ambiente (25°C) por 30 dias. A cada 5 dias após a inoculação do micro-organismo, alíquotas de 1mL eram retiradas do meio de cultura usando ponteira e pipetador esterilizados, transferidas para um tubo eppendorf de 1,5mL e centrifugadas a 14000rpm por 40 minutos, numa temperatura de 4°C. Na sequência, um volume de 400µL do sobrenadante foi separado para análise dos produtos de degradação. Uma alíquota de 10µL foi retirada e diluída para 10mL com água deionizada, preparando a amostra para análise quantitativa por HPLC-ESI-MS/MS seguindo a metodologia “diluir e injetar” (*dilute-and-shoot*, DAS) comumente usada para detecção de drogas em matriz biológica. Esta técnica consiste na diluição da matriz em solvente para que diminua as interferências como forma de pré-tratamento de amostra. Esta aproximação é válida quando a concentração do analito é alta e os componentes da matriz não co-eluem e/ou interferem na ionização da amostra (RUZO e CLASS, 2001). MCCAULEY-MYERS *et al.* (2000) comparou o método DAS com uma metodologia já validada de extração líquido-líquido em plasma canino, obtendo resultados semelhantes com relação à robustez do método, contudo a economia de tempo de pré-tratamento e análise reduziu em mais de 50 vezes. OJANPERÄ (2008) relatou uma diferença de 11% entre os métodos de

extração validados e de DAS para análise de drogas de abuso por LC-TOFMS e LC-CLND. Da mesma forma, GU *et al.* (2010) validaram um método para análise de um inibidor de γ -secretase em plasma humano, obtendo valores similares de recuperação e efeito de matriz para tratamento por DAS e SPE. FITZGERALD *et al.* (2012) também compararam resultados obtidos para drogas de abuso pelo preparo de amostra por DAS com resultados obtidos em laboratórios referenciados, obtendo 100% de concordância entre os resultados obtidos

3.4.3.2 – Otimização e validação do método analítico por HPLC-ESI-MS/MS para quantificação do corante RBBR

Os parâmetros usados para otimização do método analítico foram obtidos através da área da banda cromatográfica e da relação sinal-ruído (S/N) entre a altura do pico correspondente ao corante e a linha de base, na busca do menor valor para o limite de detecção. Para isso alguns parâmetros cromatográficos como fator de retenção e principalmente espectrométricos foram avaliados.

Para a avaliação dos parâmetros cromatográficos, foram verificadas diferentes combinações com relação à coluna, composição e vazão da fase móvel, aditivos orgânicos para a porção aquosa da fase móvel e temperatura da coluna, sendo os componentes avaliados nas condições descritas na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 - Variáveis cromatográficas exploradas para otimização da seletividade cromatográfica para o corante RBBR.

Coluna	Fase Móvel	Proporção (v/v)	Aditivo	Vazão	T (°C)
Zorbax [®]	H ₂ O:ACN	5:95	HCOOH 0,01-	0,3mL	25
SB-Phenyl ^a			0,05% (v/v)		
Eclipse [®]	H ₂ O:MeOH	30:70	CH ₃ COOH	0,7mL	30
XDB C18 ^b			0,05-0,1% (v/v)		
Prevail [®]		60:40	TEA 0,01-0,05%	1,0mL	35
C18 ^c			(v/v)		

Legenda. XDB: *Extra-Dense Bond* (capeamento duplo dos grupos silanóis); C18: Octadecilsilano; ACN: Acetonitrila; MeOH: Metanol; HCOOH: Ácido fórmico; CH₃COOH: Ácido acético; TEA: Trietilamina

^a4.6x250mm, 5 μ m , ^b4.6x150mm, 5 μ m , ^c2.1x150mm, 3 μ m.

Para prevenir a entrada de interferentes que poderiam diminuir o desempenho e até mesmo entupir a entrada das colunas, foram usadas colunas de segurança ligadas à entrada das colunas. Para as colunas contendo como fase estacionária C18, foi utilizada uma coluna de guarda Phenomenex® C18 4,6x12,5mm, 5µm, com filtro de entrada com poros de 2µm. Para a coluna Zorbax® SB-Phenyl, foi utilizada uma coluna de guarda Zorbax® SB-Phenyl 4,6x12,5mm, 5µm, com filtro de entrada com poros de 2µm.

Para otimização do espectrômetro de massas, foram avaliados parâmetros dependentes do analito para MS e MS/MS as transições de maior intensidade necessárias para a identificação por modo SRM, o potencial de desagregação (DP), potencial de focalização (FP), potencial de entrada (EP), voltagem do TurbolonSpray® (IS), energia do gás de colisão (CAD), energia de colisão (CE) e potenciais de entrada e saída da célula (CEP e CXP respectivamente). Estes parâmetros foram avaliados usando infusão direta de uma solução de RBBR 10µg.mL⁻¹ na vazão de 10µl.min⁻¹. Para os parâmetros dependentes da fonte como a altura e distância da sonda do TurbolonSpray® (Vert e Horiz, respectivamente), gás de cortina (CUR), gás nebulizador (GS1), gás de aquecimento (GS2) e temperatura da fonte (TEM) foi utilizado uma solução aquosa de 1µg.mL⁻¹ por injeção em fluxo utilizando como fase móvel H₂O:ACN (65:35) (v/v) previamente selecionada nos parâmetros cromatográficos. É importante ressaltar que para uma melhor adequação entre as vazões usadas para promover a melhor separação cromatográfica e para a inserção do analito no espectrômetro de massas, um divisor de fluxo foi adaptado na interface do cromatógrafo com o espectrômetro, direcionando apenas um terço da vazão total para a entrada da fonte de ionização.

A validação do método analítico foi realizada avaliando parâmetros cromatográficos e espectrométricos recomendados nas instruções da Resolução nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), sendo observadas as seguintes figuras de mérito:

- Estabilidade da amostra durante o tempo de preparo e análise, e por ciclos de congelamentos curtos e longos;
- Seletividade e especificidade do método com relação a interferentes da matriz;
- Recuperação da amostra em diferentes matrizes;

- Efeito da matriz na quantificação;
- Limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD);
- Linearidade;
- Precisão;
- Exatidão.

Para a avaliação da estabilidade da amostra a temperatura ambiente, foi preparada uma amostra de RBBR de concentração de 250ng.mL^{-1} pela incorporação de uma solução estoque de RBBR $1,0\text{mg.mL}^{-1}$ em meio de cultura BD, avaliada a cada duas horas durante 24 horas. O coeficiente de variação relativo foi determinado após integração da banda cromatográfica do sinal referente ao composto avaliado. Para a avaliação do ciclo de degelo, uma nova amostra de RBBR de concentração de 250ng.mL^{-1} foi preparada, e analisada após sucessivos intervalos de congelamento/descongelamento, em intervalos de 0,1, 2, 10 e 20 dias, sendo novamente avaliado o coeficiente de variação relativo dos resultados obtidos.

A avaliação da seletividade do método com relação aos interferentes da matriz foi feita através da comparação entre amostras com e sem RBBR cultivadas sobre as mesmas condições, procurando por compostos que possam ter o mesmo tempo de retenção e as mesmas transições escolhidas para o modo SRM.

Para avaliação do efeito de matriz, foram utilizadas amostras de RBBR preparadas em duas concentrações, em três diferentes matrizes (água destilada, meio de cultura BD e meio BD cultivado com *Aspergillus flavus*) através da adição de uma solução estoque de RBBR às matrizes. Após o preparo, as amostras foram submetidas aos mesmos tratamentos e analisadas por HPLC-ESI-MS/MS. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e a avaliação realizada com relação à variância entre as amostras e entre os diferentes grupos de amostras.

Os limites de quantificação e detecção foram obtidos através de diluições sucessivas de uma solução padronizada de RBBR, comparando os valores de altura do pico no cromatograma até alcançarem as relações de 10 e 3 vezes a razão sinal/ruído para o LOQ e LOD respectivamente.

A faixa dinâmica de trabalho foi avaliada através da análise de amostras de RBBR preparadas em água pela diluição de uma solução padrão de concentração 1mg.mL^{-1} , em 10 concentrações diferentes, em um intervalo entre $6,25\text{ng.mL}^{-1}$ e 500ng.mL^{-1} . A partir dos valores obtidos pela integração da área sob a

curva do pico referente ao RBBR nos cromatogramas, foi construído um gráfico de área vs concentração, obtendo-se através da aplicação de regressão linear pelo método por mínimos quadrados uma equação de regressão referente aos dados da curva de calibração. Para aferir a eficiência da regressão, foram avaliados parâmetros como o coeficiente de correlação R^2 , o desvio padrão de cada ponto utilizado para construção da reta de regressão, a exatidão e a precisão.

Para verificar a precisão do método foram avaliadas três soluções de RBBR em concentrações diferentes, sendo a primeira limitada até 120% do valor usado no primeiro ponto da curva, a segunda entre 40-60% do maior ponto da curva e a terceira entre 90-100% do maior ponto da curva. As amostras foram preparadas em quintuplicata e analisadas em um único dia para verificação da repetitividade ou precisão intra-dia, e preparadas e analisadas em três dias não consecutivos para verificação da precisão intermediária ou precisão inter-dias. A partir dos valores obtidos foi calculado o desvio padrão $s(X)$ e o coeficiente de variação $CV(\%)$ para cada concentração de acordo com as equações 2 e 3 respectivamente.

$$s(X) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2} \quad (2)$$

$$CV(\%) = \frac{s(x)}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

onde x_j são os valores de cada medida, n é o número de valores obtidos para cada concentração e \bar{x} a média obtida para cada concentração. As amostras utilizadas para estabelecer a exatidão do método foram de mesma concentração utilizadas para a medida de precisão, sendo estabelecida através da equação 4.

$$Exatidão (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{teorica}} \times 100 \quad (4)$$

3.4.3.3 – Investigação qualitativa da degradação do corante RBBR em meio de cultura BD

Além dos dados quantitativos do corante RBBR, é de extrema importância a identificação dos produtos de degradação decorrentes da metabolização do composto pelos micro-organismos, garantindo assim que não

ocorra a formação de produtos de maior periculosidade. Além disso, estes dados ajudam a elucidar as enzimas e os mecanismos envolvidos nas etapas de degradação.

Para a análise, um gradiente exploratório foi elaborado facilitando a separação dos componentes e ao mesmo tempo garantindo a eluição da maior quantidade possível de produtos de degradação de interesse. A fase móvel foi composta de água deionizada como solvente aquoso (A) e acetonitrila como solvente orgânico (B). O gradiente aplicado é descrito na TABELA 3.3. A temperatura do forno da coluna foi mantida em 30°C, com vazão de fase de 0,7mL.min⁻¹ e um volume de injeção de 20µL.

TABELA 3.3 - Gradiente exploratório usado na análise qualitativa da degradação do corante RBBR.

Tempo (min)	% A	%B
0.00	95	5
10.00	95	5
25.00	30	70
40.00	30	70
40.01	95	5
60.00	95	5

Os parâmetros espectrométricos foram mantidos os mesmos do item 3.4.3.2, porém os cromatogramas foram adquiridos no modo de aquisição *full scan*, com varredura de massas entre 90-450Da. A partir do cromatograma de íons totais (*Total Ions Chromatogram*, TIC) foram construídos cromatogramas de íons extraídos (*Extracted Ions Chromatogram*, XIC) para cada valor de massas. Desta maneira, foi realizada uma busca em cada unidade de massa por sinais que estivessem presentes nas replicatas dos experimentos que continha o corante RBBR, porém não estivessem presentes nas amostras controle para o mesmo micro-organismo.

3.4.4 – Análise qualitativa e quantitativa da degradação da 1,2,3,4-TCDD

A capacidade microbiana de degradação da 1,2,3,4-TCDD foi avaliada com o intuito de identificar possíveis interações negativas entre a presença de

compostos organoclorados e os micro-organismos, além de verificar a possibilidade da utilização destes na biorremediação de xenobióticos de alta toxicidade como as dioxinas.

3.4.4.1 – Montagem do experimento

Quatro cepas de fungos foram utilizados neste experimento: *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*.

Os micro-organismos foram cultivados em frascos individuais em meio BD, preparado na proporção descrita na seção 3.2, através da adição de 912mg do meio de cultura em pó em 38mL de água destilada num erlenmeyer de 100mL de plástico com tampa de rosca, autoclavado por 20 minutos a 121°C. Após a esterilização e resfriamento do meio de cultivo em uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada, um disco de 5mm de diâmetro de uma cultura do fungo cultivada em BDA, incubada em B.O.D. a 25°C e fotoperíodo de 12 horas por 5 dias foi retirado e adicionado ao erlenmeyer contendo o meio de cultura, que foi fechado com a tampa. Os frascos foram posicionados em posição estática, a temperatura ambiente, com iluminação proveniente de duas lâmpadas programadas com fotoperíodo de 12 horas.

Após 5 dias de crescimento, foi incorporado ao meio de cultura 40µL de polissorbato 80 (Tween 80) para auxiliar a solubilidade da dioxina, e então foi adicionado uma solução estoque de 1,2,3,4-TCDD em DMF de concentração 2mg.mL⁻¹, para obter uma concentração final de 100µg.mL⁻¹. Experimentos de controle foram elaborados com amostras contendo apenas os componentes do meio, sem a presença de micro-organismos, para avaliar a degradação de dioxinas durante o prazo do experimento, e tratamentos contendo o meio inoculado com micro-organismos com incorporação da mesma quantidade de DMF sem dioxina, para excluir a influência do solvente no crescimento microbiano.

Alíquotas de 1mL de cada amostra foram retiradas no tempo t=0 logo após a incorporação do substrato, e em seguida as tampas foram vedadas com filme plástico e os fungos mantidos nas mesmas condições de crescimento. Novas alíquotas foram retiradas em t=5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias, em bancada de fluxo laminar previamente esterilizada. Os frascos novamente foram vedados e mantidos sob as condições de crescimento.

As alíquotas de 1mL foram centrifugadas por 40 minutos, a 14000rpm e 4°C para precipitação da biomassa. Foram retiradas duas alíquotas, para experimentos distintos. Uma primeira alíquota, de 300µL, foi separada e utilizada para análise por HPLC-MS. Uma segunda alíquota de 400µL foi separada e extraída com 400µL de acetato de etila resfriado. Após a separação das fases, o acetato foi transferido para um novo recipiente, seco sob Na₂SO₄ e uma alíquota em acetato retirada para análise por GC-MS.

3.4.4.2 – Análise instrumental

As amostras foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente usando técnicas de cromatografia líquida e gasosa, ambas acopladas a espectrômetros de massa com ionização por impacto de elétrons no modo positivo.

Na cromatografia líquida, os parâmetros utilizados foram adaptações do trabalho de PERAZOLLI *et al.* (2005), usando uma coluna analítica C18 Regis 3µm, 100x2,1mm, com fase móvel isocrática 100% metanol com vazão de 0,5 mL.min⁻¹. A saída do cromatógrafo foi acoplada e um espectrômetro de massas triplo quadrupolo utilizando uma fonte de ionização química à pressão atmosférica no modo negativo, mais sensível para compostos organoclorados do que o modo positivo (CHERNETSOVA *et al.*, 2002). Os parâmetros espectrométricos avaliados para a otimização do aparelho foram o potencial de desagregação (DP), potencial de focalização (FP), potencial de entrada (EP), voltagem da descarga da agulha corona (NC), altura e distância da sonda do nebulizador (Vert1 e Horiz1 respectivamente), altura e distância da agulha corona (Vert2 e Horiz2 respectivamente), gás de cortina (CUR), gás nebulizador (GS1), gás de aquecimento (GS2) e temperatura da fonte (TEM). Após a avaliação dos parâmetros acima, foram otimizados os valores para o modo SRM, como energia do gás de colisão (CAD), energia de colisão (CE) e potenciais de entrada e saída da célula (CEP e CXP respectivamente). Como a fonte de APCI requer vazões maiores para a operação otimizada do que a fonte ESI, não foi possível utilizar o mecanismo de infusão direta através da seringa de 1mL usada nos experimentos com a fonte de ESI. Portanto, toda a otimização foi feita através de injeção em fluxo usando uma vazão de metanol de 490µL.min⁻¹ proveniente da bomba de HPLC, usando uma junção em T para inserção de uma solução de 1000µg.mL⁻¹ de 1,2,3,4-TCDD em tolueno através de uma seringa sendo empurrada por um braço pneumático a vazão de 10µL.min⁻¹, resultando na entrada na fonte

APCI de uma vazão de $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de uma solução com concentração nominal de $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 1,2,3,4-TCDD.

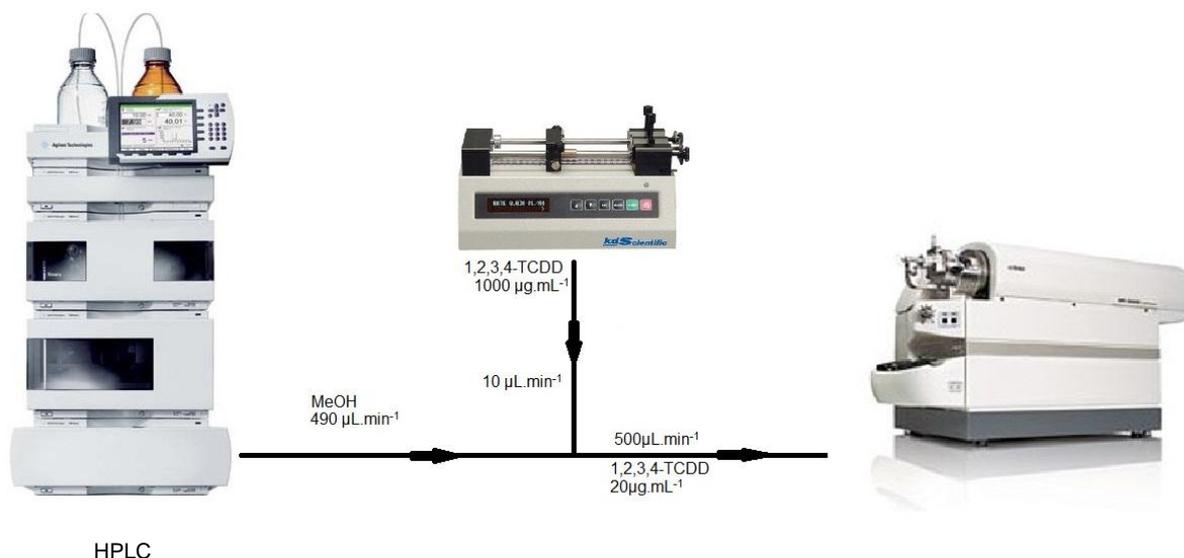


FIGURA 3.3 - Esquema ilustrativo da otimização por injeção em fluxo para a 1,2,3,4-TCDD.

Para as análises por GC-MS, foi utilizada uma coluna DB-5 com $30\text{m}\times 0,25\text{mm}$ i.d., com revestimento de $0,25\mu\text{m}$ de espessura. A temperatura do injetor e da interface foram ajustados em 280°C . A rampa de temperatura utilizada está descrita na TABELA 3.4, com duração de 13,5 minutos. A quantificação foi feita através do uso de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno como padrão interno, com o espectrômetro de massa sendo avaliado tanto no modo *full scan* como operando no modo de monitoramento de íons únicos (SIM, *Single Ion Monitoring*), que aprimora os limites de detecção através da fixação de unidades de *m/z* específicas para avaliação, sem a necessidade da varredura de íons num intervalo grande.

TABELA 3.4 - Rampa de temperatura do forno de coluna para as análises de 1,2,3,4-TCDD por GC-MS.

Taxa de aumento ($^\circ\text{C}/\text{min}$)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo de espera (min)
	70	1
25	245	0
10	290	1

Foram observadas figuras de mérito relevantes para a validação do método analítico como seletividade, linearidade, eficiência de recuperação, LOQ, LOD, precisão e exatidão, usando os mesmos parâmetros utilizados na validação anterior (ANVISA, 2003).

Além da quantificação foi realizada uma varredura por produtos de degradação da 1,2,3,4-TCDD, na expectativa de elucidar a possível rota metabólica de degradação

4 - Resultados e Discussões

O fungo *Aspergillus fumigatus* foi fornecido como amostra desconhecida pela empresa Krión AgroSciences, e sua identificação através de padrões morfológicos de crescimento e análises microscópicas foi realizada, com os resultados apresentados na FIGURA 4.1.

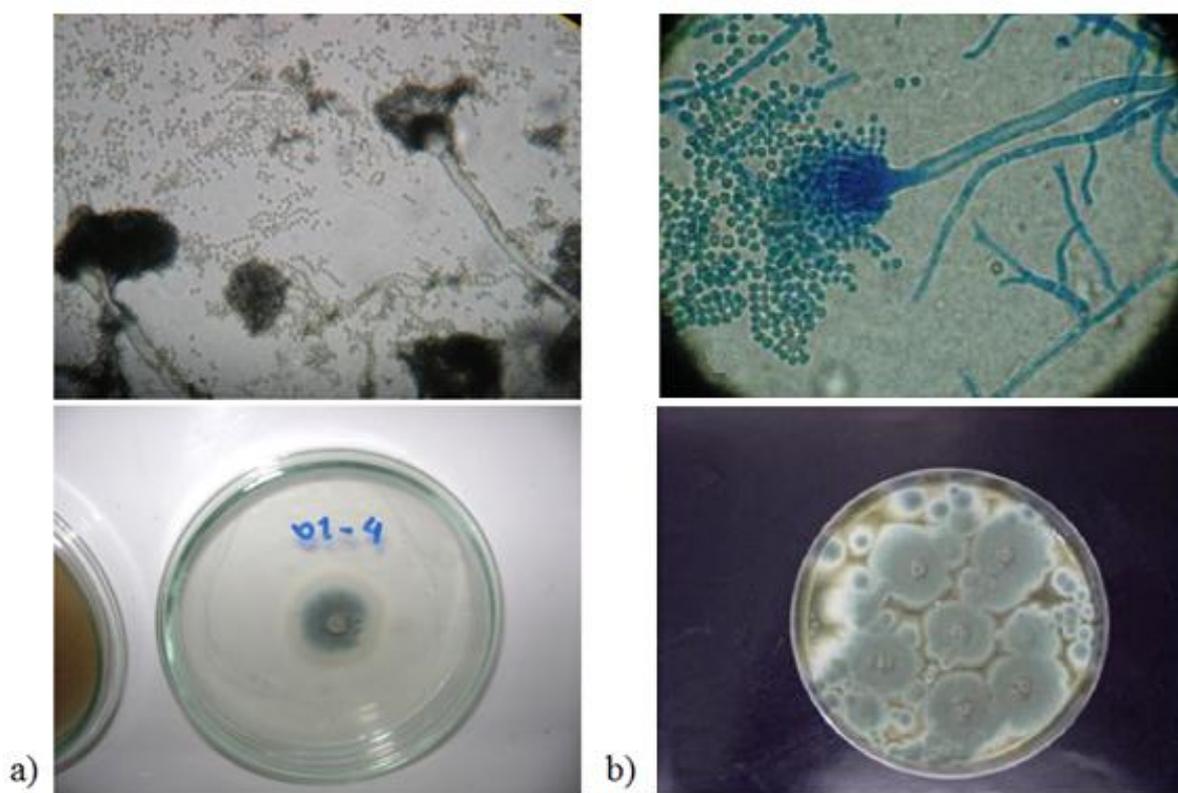


FIGURA 4.1 - Caracterização microscópica e morfológica da cepa 01-10, reconhecida como *Aspergillus fumigatus*. A) Imagens de microscópio e crescimento micelial da cepa obtidas no laboratório de microbiologia do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. B) imagens de microscópio e crescimento micelial de cepas identificadas como *Aspergillus fumigatus* evidenciando a semelhança (TURGUT et al., 2008).

A empresa Baraúna Comércio e Indústria Ltda. EPP obteve junto a diversas empresas privadas análises da cinza e da fuligem da caldeira de queima do bagaço, da torta de filtro e do composto orgânico da leira de compostagem, com os resultados dispostos no anexo I. Pode-se perceber um nível de TEQ maior nas amostras da caixa de cinzas das caldeiras, corroborando com dados da literatura

sobre a presença destes contaminantes neste tipo de matriz, sendo o valor encontrado de 38,1 ngTEQ por kg de cinza dentro da faixa observada por YIVE e TIROUMALECHETTY (2008). Pode-se perceber também a ausência de dioxinas nas amostras de torta de filtro, eliminando a possibilidade de entrada de dioxinas em quantidades significativas através do processo de beneficiamento da cana-de-açúcar, e a grande diminuição da quantidade de dioxinas nas amostras da leira de compostagem, indicando que a fonte principal de contaminação seja realmente a cinza da queima do bagaço da cana e que a diluição realizada pela proporção de cinza utilizada na mistura que vai para a compostagem já é eficiente na diminuição do nível de toxicidade equivalente do produto final, porém não o suficiente para que o produto esteja dentro dos limites máximos de contaminação se forem observados parâmetros internacionais. Desta forma, reforça-se a necessidade de métodos que venham a promover ainda mais a diminuição da toxicidade total do composto após o processo de compostagem aeróbica.

4.1 – Análise qualitativa da degradação do corante RBBR

Neste trabalho a análise qualitativa visou atribuir uma técnica simples e eficiente para a avaliação da capacidade microbiana de degradação do corante RBBR. O corante RBBR foi escolhido por ser um corante muito utilizado na indústria e possuir semelhança estrutural com metabólitos produzidos pela biotransformação de compostos tóxicos de interesse para a biorremediação como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SOARES *et al.*, 2001; MECHICHI *et al.*, 2006).

Durante o período de realização do experimento, pode-se observar comportamentos distintos dos micro-organismos com relação à capacidade de degradação do corante.

As bactérias *Sphingomonas capsulata* e a cepa 02-1 não apresentaram sinais de degradação do corante, seja por via enzimática ou por adsorção. Apesar de em apenas três dias toda a placa se encontrar colonizada pelas bactérias, tanto em placas com meio de cultivo com corante como em placas de controle sem corante, ao fim dos quinze dias de experimento as placas dopadas com RBBR apresentam a mesma coloração do início do experimento, indicando que não houve processo de biodegradação, e a coloração do biofilme bacteriano de ambos os meios com e sem corante apresentavam mesma coloração, esbranquiçado para a

cepa de *Sphingomonas capsulata* e amarelado para a cepa 02-1, confirmando a ausência de adsorção do corante. A FIGURA 4.2 mostra as placas contendo culturas das bactérias após 15 dias de crescimento.

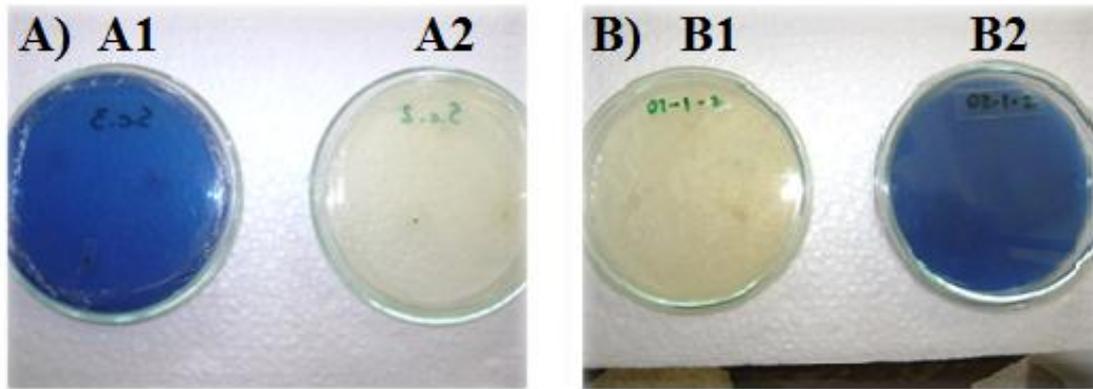


FIGURA 4.2 - Placas inoculadas com bactérias após 15 dias de crescimento. A) *Sphingomonas capsulata*, A1) com corante e A2) sem corante e B) cepa 02-1, B1) sem corante e B2) com corante.

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* também apresentou taxa de crescimento acelerada, preenchendo completamente a placa em apenas 3 dias de crescimento. Apesar deste fato, durante os 12 dias restantes de experimento pode-se perceber uma mudança na coloração do meio de cultura com relação ao controle, bem como uma mudança de coloração do micro-organismo entre os tratamentos, como mostra a FIGURA 4.3. Pode-se também notar que o meio ainda reteve uma tonalidade azulada, aparente através da coloração branca do micélio.

Avaliando o resultado do cultivo de *P. chrysosporium* observou-se que houve descoloração do corante pela ação do micro-organismo, porém não foi possível avaliar se a descoloração acentuada do corante do meio foi devido a ação de degradação enzimática ou um simples processo físico de adsorção do corante RBBR no micélio do fungo.

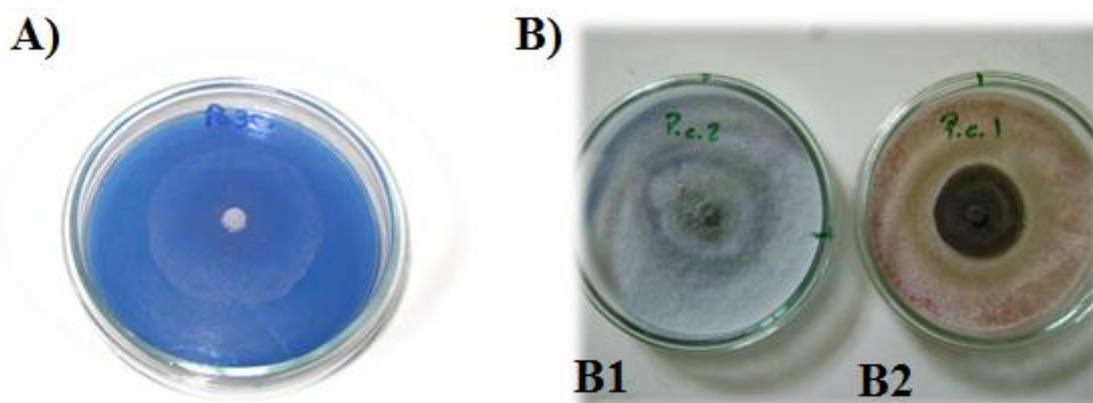


FIGURA 4.3 - A) Placa com corante RBBR inoculada com *P. chrysosporium* após 24 horas, e B) Após 15 dias, mostrando a diferença de coloração entre as culturas B1) com corante e B2) sem corante.

As cepas pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram as que apresentaram maior capacidade de descoloração do corante RBBR. O fungo *Aspergillus aculeatus* apresentou a taxa de colonização mais lenta entre os micro-organismos testados, não sendo capaz de colonizar toda a placa mesmo após o fim do experimento, ocupando 80% da área da placa em média. Após os 15 dias de experimento, observou-se adsorção de corante no micélio, acompanhado de descoloração do meio de cultura, como mostra a FIGURA 4.4.

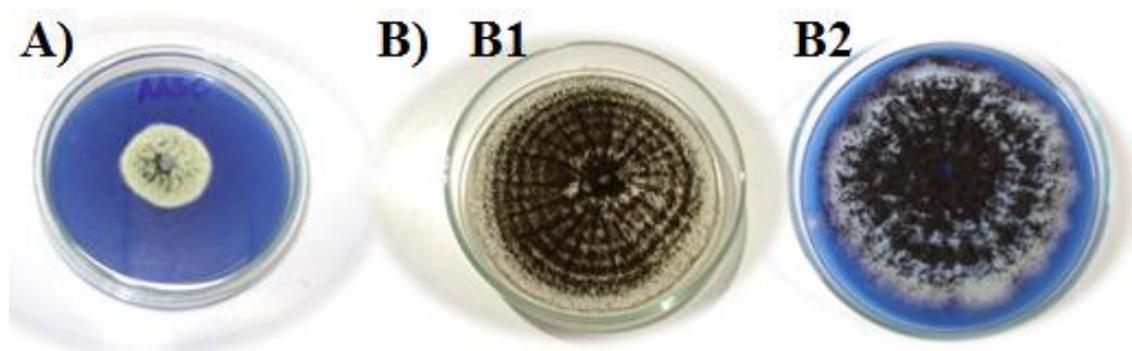


FIGURA 4.4 - Crescimento de *Aspergillus aculeatus* em meio BDA com RBBR após A) 3 dias e B) 15 dias, mostrando o micro-organismo em meio BDA B1) sem corante e B2) com corante RBBR.

O fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou acelerada produção de micélio, com alta incidência de colônias crescendo em todas as direções, mas não necessariamente seguindo o mesmo padrão circular de crescimento observado para

os outros fungos. Após os 15 dias de experimento, em média 92% das placas se encontravam preenchidas por micélio. Este micro-organismo foi capaz de promover avançada descoloração do corante, principalmente após o décimo dia. Todavia, a coloração azulada dos esporos do fungo não permitiu uma avaliação visual precisa da capacidade de adsorção do RBBR pelo micélio como mostra a FIGURA 4.5. WANG e HU (2008) observaram apenas adsorção de RBBR por *A. fumigatus* imobilizados em carboximetilcelulose, porém seus resultados foram baseados apenas na falta de novas bandas no espectro de UV-Vis.

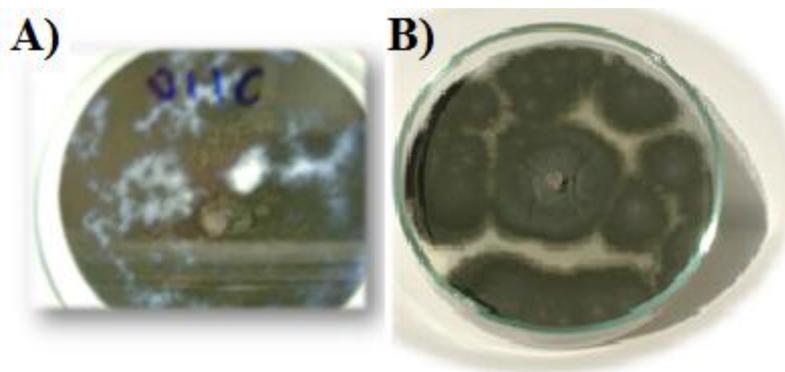


FIGURA 4.5 - Crescimento de *Aspergillus fumigatus* em meio BDA após 15 dias A) Meio com corante, e B) sem corante. Pode ser observada a ausência do corante em partes do meio de cultura com corante e dificuldades na observação da adsorção do corante pelo micélio.

A avaliação qualitativa buscando fungos capazes de degradar o corante RBBR foi finalizada analisando o fungo *Aspergillus flavus*. Este micro-organismo apresentou os melhores resultados com relação à capacidade microbiana de descoloração do RBBR e uma taxa de crescimento intermediária entre as cepas de *Aspergillus*, de 84% do total da placa após os 15 dias de cultivo. O *A. flavus* apresentou uma característica de difícil manuseio, com tendências de formação de novas colônias em todas as direções devido a alta produção de esporos por esta espécie. Como ilustrado na FIGURA 4.6, a partir de 4 dias de cultivo pode-se observar uma forte tendência de descoloração do corante RBBR, ocorrendo inclusive em regiões aonde o micélio ainda não havia se desenvolvido, devido possivelmente à ação de enzimas extracelulares. Esta mudança na coloração foi um dos motivos pelo qual o uso dos corantes foi utilizado como ferramenta para indicar a presença de enzimas lignolíticas produzidas pelos micro-organismos (MACHADO

et al., 2005). A descoloração continuou de forma constante durante todo o restante do experimento, sendo que ao final dos 15 dias de cultivo praticamente todo o corante tinha sido removido do meio de cultura. Apesar de neste caso a degradação enzimática ser claramente a maior responsável pela remoção do RBBR do meio, também pode ser observado a adsorção de uma parcela do corante no micélio do fungo.

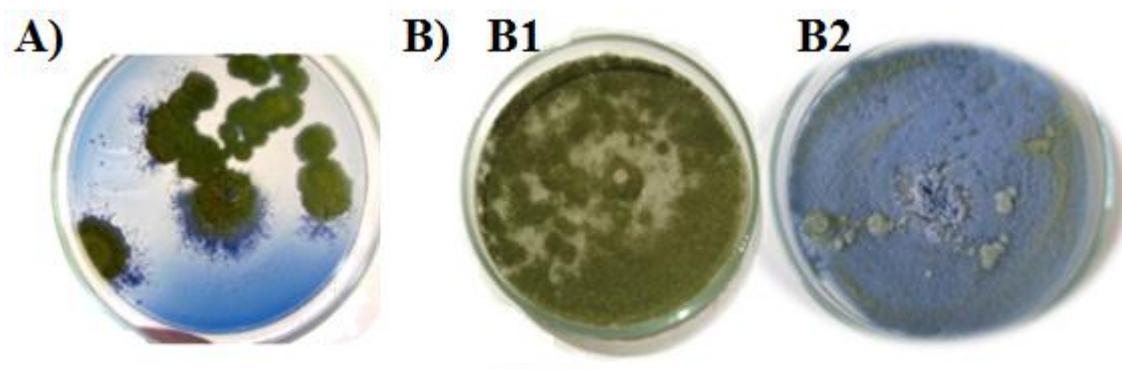


FIGURA 4.6 – Cultivo de *Aspergillus flavus* em meio BDA. A) Ilustrando a capacidade de descoloração do corante após 4 dias de crescimento. B) Após 15 dias de experimento, pode-se observar a diferença de cores entre o fungo cultivado B1) sem corante e B2) com corante.

Como resultados desta triagem preliminar neste experimento, pode-se observar diferentes comportamentos dos micro-organismos perante a capacidade de descoloração do corante RBBR em meio de cultivo sólido. As bactérias utilizadas no presente experimento não apresentaram resultados positivos quanto à descoloração do corante RBBR e, portanto, foram excluídas dos experimentos seguintes. Entre os fungos, os do gênero *Aspergillus* apresentaram os melhores resultados, especialmente a espécie *Aspergillus flavus*, para a qual foi observada a remoção do corante RBBR em quase sua totalidade após 15 dias de cultivo. Um resumo dos resultados segue na TABELA 4.1, relacionando os micro-organismos utilizados com sua capacidade de remoção do corante do meio de cultura através de processos de adsorção e descoloração.

TABELA 4.1 - Análise qualitativa de descoloração do corante RBRR por micro-organismos.

Micro-organismo	Adsorção	Descoloração	Legenda
<i>Sphingomonas capsulata</i>	-	-	- Nenhuma
02-1	-	-	Atividade
<i>Aspergillus aculeatus</i>	++	+	+ Pequena atividade
<i>Aspergillus flavus</i>	++	+++	++ Média
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	++	Atividade
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	+	+++ Alta Atividade

A observação visual da descoloração do corante RBRR em placas de meio de cultura sólido é importante devido a rapidez e simplicidade com que se pode avaliar a capacidade microbiana de degradação do corante. SATO *et al.* (2002) utilizaram a capacidade microbiana de degradação de um corante sintético para reduzir uma coleção de mais 1500 espécies de micro-organismos diferentes para apenas 11 através de métodos de triagem usando a degradação do corante RBRR como parâmetro de avaliação, obtendo entre estas espécies um fungo capaz de degradar mais de 90% de 2,7-diclorodibenzo-*p*-dioxina. VITALI *et al.* (2006) usou uma metodologia similar para selecionar dentre 55 espécies os candidatos à biodegradação de organoclorados, encontrando uma espécie de *Eupenicilium crustaceum* que foi capaz de remover até 30% dos componentes clorados.

4.2 – Avaliações da influência de componentes da leira de compostagem no crescimento microbiano

As placas contendo os tratamentos inoculados com micro-organismos foram dispostas em incubadora B.O.D. com controle de temperatura e luminosidade. A medição do crescimento micelial em duas direções perpendiculares foi realizada a cada 24 horas, durante um período de 15 dias.

Passados os 15 dias de coleta de dados, uma planilha com os valores diários de crescimento micelial foi elaborada, obtendo-se os valores de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) descritos na TABELA 4.2. Estes índices foram aplicados para a produção de duas séries de gráficos para cada fungo, o gráfico de Scott-Knott para diferenciação e agrupamento de múltiplas médias a 5% de probabilidade, e o gráfico de análise de agrupamento por UPGMA, mostrando

qualitativamente a semelhança ou diferença entre os valores através da disposição dos tratamentos em um gráfico de dendograma construído pela média de seus valores de IVCM.

TABELA 4.2 - Valores de IVCM obtidos para os fungos analisados, nos tratamentos descritos na seção 3.4.2.

Tratamentos	IVCM			
	<i>A.aculeatus</i>	<i>A.flavus</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>P.chrysosporium</i>
BDA	0,633	0,571	0,612	3,000
DMF	0,631	0,543	0,562	2,600
TW	0,673	0,535	0,527	3,000
RBBR	0,524	0,538	0,594	3,000
DD	0,627	0,577	0,576	3,000
BG	0,718	0,563	0,612	3,000
TF	0,639	0,577	0,596	3,000
TE	0,712	0,610	0,632	3,000
CZ	0,873	0,640	0,673	1,800
BioE	0,795	0,598	0,555	0,952
BioN	0,275	0,468	0,563	0,437

Legenda. BDA: Batata-Dextrose-Ágar (controle); DMF: Dimetilformamida (controle); TW: Polissorbato 80 (Controle); RBBR: corante RBBR; DD: 1,2,3,4-TCDD; BG: Bagaço de cana-de-açúcar; TF: Torta de filtro; TE: Solo do pátio da usina; CZ: Cinza de bagaço de cana-de-açúcar; BioE: Leira de compostagem esterilizada; BioN: Leira de compostagem não esterilizada.

Para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foram observadas a presença de quatro grupos (a1, a2, a3 e a4) bem definidos como mostra a FIGURA 4.7, que apresenta os agrupamentos realizados pelo teste de Scott-Knott para as médias dos valores de IVCM apresentados para cada tratamento. Os tratamentos controle (BDA, DMF e TW) se encontram agrupados em a4, assim todos os tratamentos não pertencentes a este grupo apresentaram algum tipo de inibição de crescimento em alguma proporção.

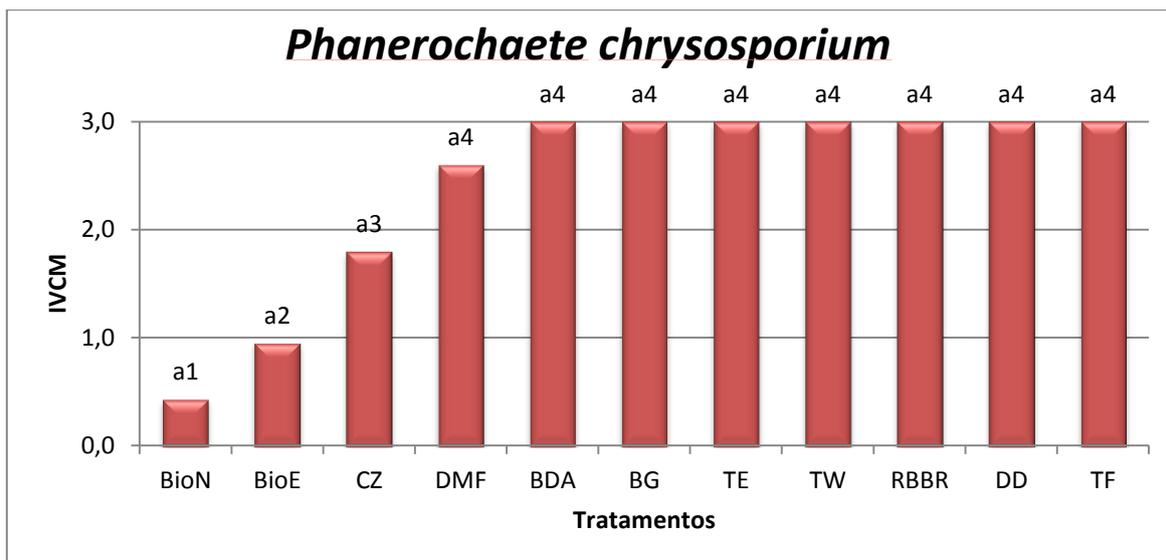


FIGURA 4.7 - Agrupamento de médias de crescimento por Scott-Knott, para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*

O primeiro grupo a1 contém apenas o tratamento contendo a leira de compostagem não esterilizada (BioN), demonstrando que o crescimento microbiano foi fortemente afetado. A influência do tratamento BioN no crescimento do *Phanerochaete chrysosporium* foi fortemente afetada pela presença de outros micro-organismos na leira não esterilizada. Todavia, percebe-se pelo tratamento contendo leira de compostagem esterilizada (BioE), agrupado em a2 e que apresentou uma inibição do crescimento do fungo em menor intensidade, que a composição físico-química da leira é um fator de extrema influência para o crescimento do fungo. O grupo a3, associado apenas ao tratamento CZ apresentou uma leve inibição de crescimento e corrobora com a proposta de que alguns componentes da leira devem causar a supressão de crescimento micelial, como no caso da própria cinza e os outros micro-organismos associados à leira não esterilizada. A série a4 representa o grupo de todos os outros oito tratamentos incluindo o controle (BDA, BG, DMF, TE, TW, RBBR, DD, TF), indicando que a presença destes componentes não afetaria o desenvolvimento micelial. Um ligeiro efeito da presença de DMF pode ser observado no crescimento, contudo a mudança não foi considerada estatisticamente significativa a 5% de probabilidade. Os outros sete tratamentos pertencentes ao grupo a4 demonstraram crescimento igual devido ao intervalo de tempo diário entre as medidas aplicado no método de avaliação.

A FIGURA 4.8 demonstra a análise de agrupamento por UPGMA. Os traços coloridos indicam a relação dos grupos obtidas através do modelo de Scott-

Knott, evidenciando a grande diferença entre os três grupos a1, a2 e a3 que sofreram inibição de crescimento, e a diferença destes para o grupo a4.

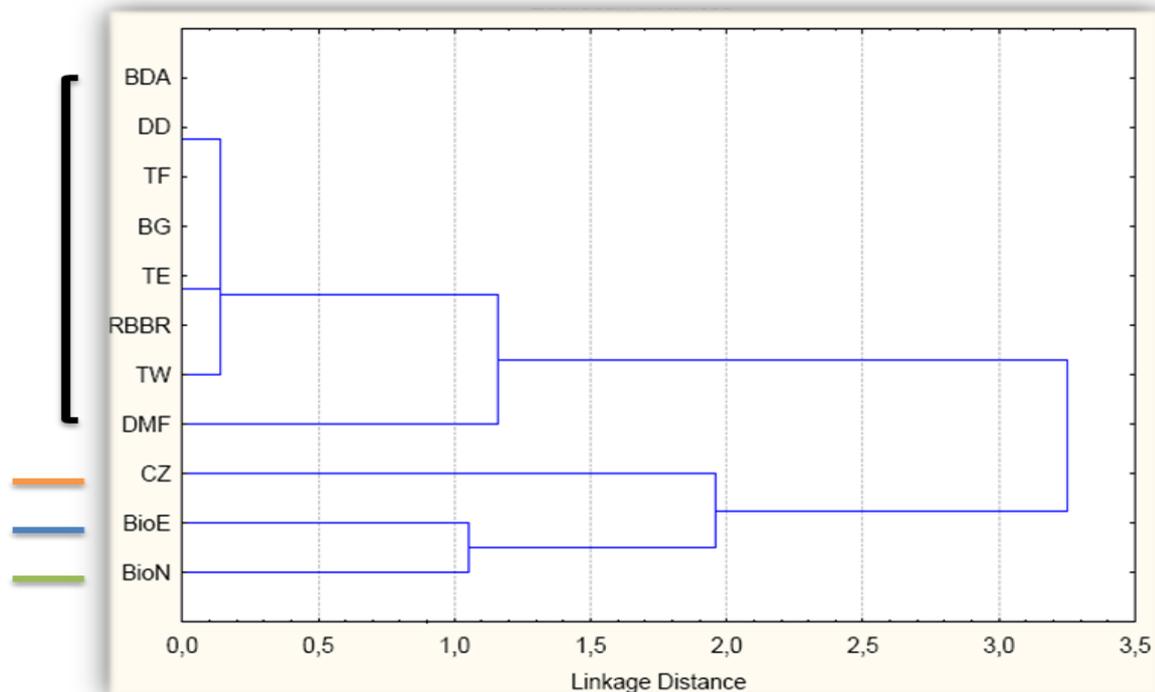


FIGURA 4.8 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Verde, a2 = Azul, a3 = Laranja, a4 = Preto

A partir das análises de agrupamento pode-se avaliar que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* não sofreu inibição de crescimento quando exposto a xenobióticos como a 1,2,3,4-TCDD ou o corante RBBR na concentração utilizada, o que o torna um potencial alvo para o estudo da capacidade de biodegradação. Naturalmente seu crescimento pode ser afetado de maneira drástica dependendo dos componentes utilizados na montagem da leira.

Para o fungo *Aspergillus aculeatus*, foram obtidas três divisões a1, a2 e a3. A FIGURA 4.9 mostra o gráfico de agrupamento de médias pelo modelo de Scott-Knott obtido para os tratamentos. A presença dos três controles (BDA, DMF e TW) no grupo a2 indica a inibição de crescimento nos tratamentos do grupo a1 (BioN), e promoção de crescimento nos tratamentos integrantes do grupo a3 (BioE e CZ).

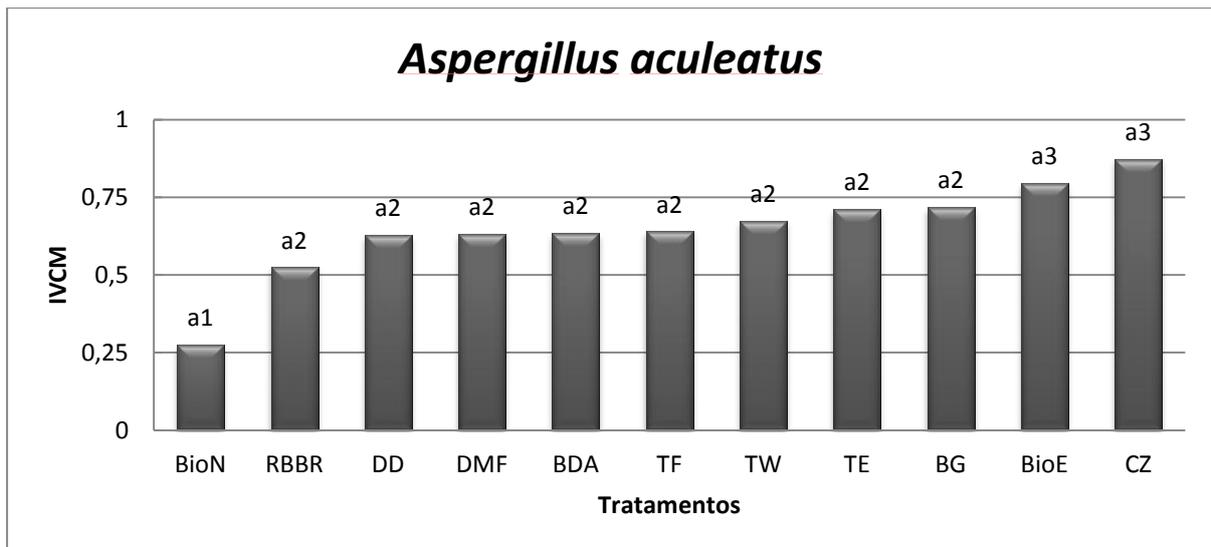


FIGURA 4.9 - Agrupamento de médias de crescimento por Scott-Knott aplicado aos tratamentos experimentais para o fungo *Aspergillus aculeatus*

Novamente uma forte inibição de crescimento micelial foi encontrada no tratamento BioN, posicionado de maneira avulsa no grupo a1. Foi constatado que a baixa velocidade de colonização do micro-organismo permitiu que outras cepas microbianas se desenvolvessem mais rapidamente, prejudicando o crescimento do fungo devido a fatores como o amensalismo. O grupo a2 contém oito tratamentos incluindo o controle (RBBR, DD, DMF, BDA, TF, TW, TE, BG), e não apresentaram variação estatística no valor de IVCM. Todavia pode-se observar uma ligeira variação do valor de IVCM do tratamento RBBR com relação aos outros tratamentos do grupo a2. O grupo a3 apresenta dois tratamentos, BioE e CZ, e indica um aumento no crescimento quando comparado com o meio de cultura BDA. O valor máximo de crescimento foi obtido com o tratamento aonde foi incorporada a cinza do bagaço de cana, mostrando que nestas condições, além de ser um substrato que não interfere no crescimento deste micro-organismo ele ainda favoreceu o crescimento, pois cinzas de material vegetal como o bagaço da cana-de-açúcar podem ser fonte de macro nutrientes como Ca, P e K e micro nutrientes como B, Cu e Zn, além de causar o aumento de pH do meio, o que pode favorecer certas espécies de fungos (AVERY *et al.*, 2008). Como os outros componentes da leira testados não diferiram estatisticamente do controle além da cinza do bagaço da cana, pode-se inferir que a causa do tratamento BioE promover o crescimento microbiano deve-se a presença de cinza entre seus constituintes. KRISHNAN *et al.* em 1954 evidenciou a promoção de crescimento de *Aspergillus niger* em meio de

cultura incorporado com cinza vegetal, quando comparado com o crescimento em meio BDA sem a adição da cinza.

Através da análise de agrupamento por UPGMA representada na FIGURA 4.10, pode-se identificar a separação feita pelo modelo de Scott-Knott, como também identificar as similaridades na velocidade de crescimento do fungo *Aspergillus aculeatus* entre tratamento do mesmo grupo.

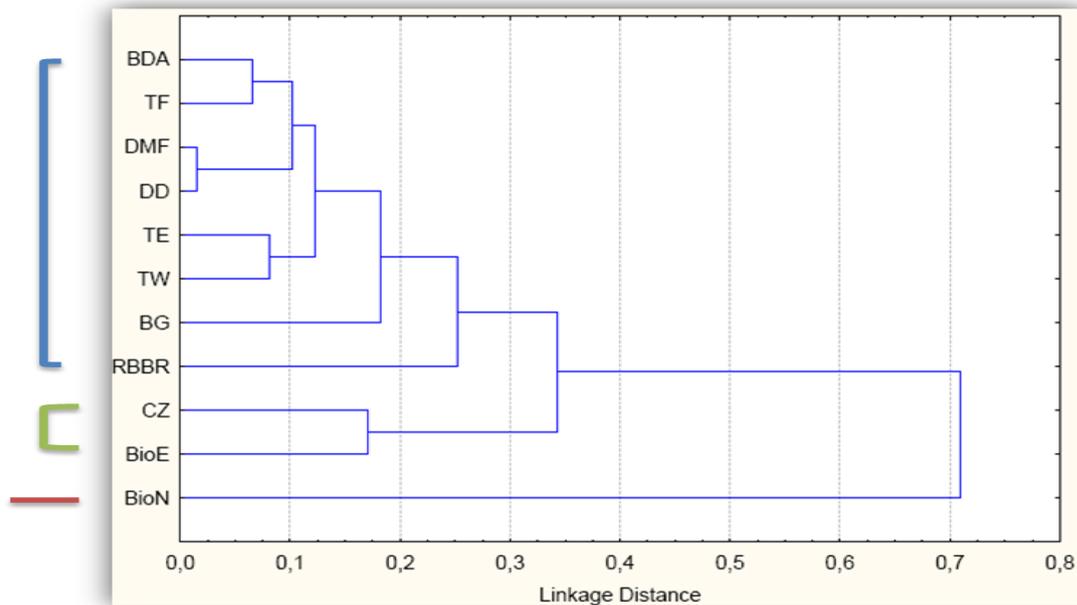


FIGURA 4.10 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo *Aspergillus aculeatus*. Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Vermelho, a2 = Azul, a3 = Verde.

Analisando a FIGURA 4.10 pode-se inferir de modo qualitativo a que a maior semelhança ocorreu entre os tratamentos DD e o controle DMF, mostrando que não houve influência do solvente DMF, nas concentrações utilizadas, no resultado de crescimento microbiano obtido para o tratamento contendo as dioxinas. Além disso, percebeu-se uma maior distância de separação entre o grupo a1 e o grupo contendo os tratamentos controle BDA, DMF e TW (a2), do que entre o grupo a2 e o grupo que apresentou sinais de promoção de crescimento (a3), mostrando que a inibição pelo grupo a1 foi mais significativa do que a promoção causada pelos tratamentos do grupo a3.

O fungo *Aspergillus fumigatus* mostrou-se mais robusto, sofrendo uma menor influência do fator composição dos meios de cultura, como mostra o

agrupamento obtido pelo modelo de Scott-Knott na FIGURA 4.11. Da mesma forma que o anterior, o modelo separou os tratamentos em três grupos, a1, a2 e a3, com a presença dos controles no grupo a2, indicando os tratamentos que causaram inibição do crescimento microbiano em a1 e os que promoveram o crescimento em a3.

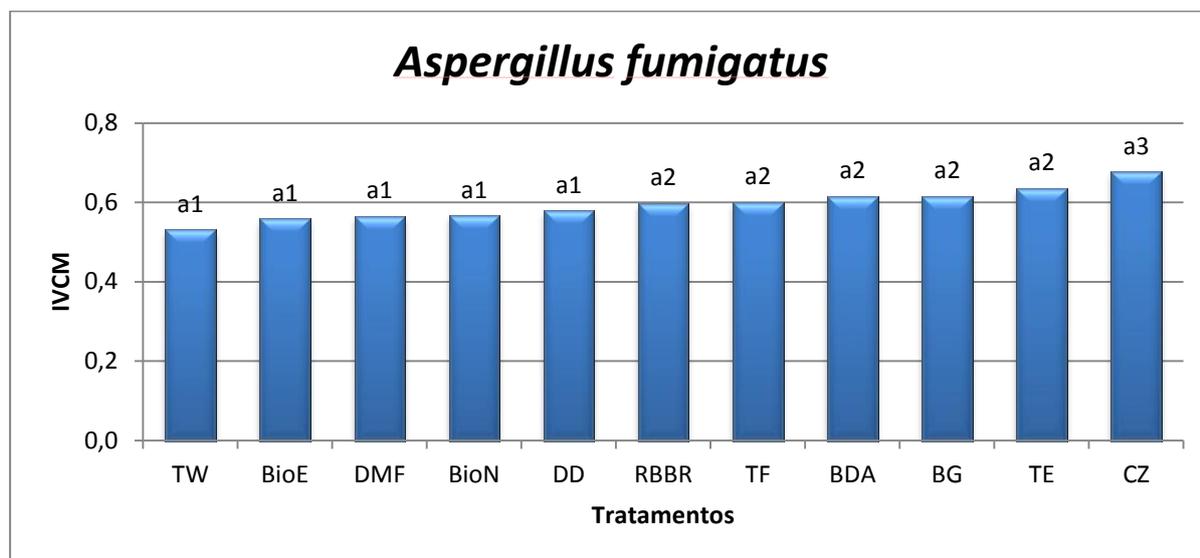


FIGURA 4.11 - Gráfico de agrupamento de médias pelo método de Scott-Knott para o fungo *Aspergillus fumigatus*.

Diferentemente das espécies *P. chrysosporium* e *A. aculeatus*, o fungo *Aspergillus fumigatus* nos exemplos avaliados apresentou o grupo a1 composto por 5 tratamentos (TW, BioE, DMF, BioN e DD) que indicam uma inibição do crescimento micelial com relação ao controle BDA. Neste grupo estão as amostras de 1,2,3,4-TCDD, bem como os dois controles relacionados a ela (TW e DMF), não sendo possível avaliar se a inibição está correlacionada ou não com a presença de dioxinas. De fato, o índice de crescimento micelial para o tratamento com dioxinas foi superior comparando-se a seus controles (6,14% maior que DMF, 9,50% maior que TW) pode ser o indício da promoção de crescimento pela presença da 1,2,3,4-TCDD, podendo neste caso o xenobiótico estar sendo utilizado pelo micro-organismo como fonte de nutriente, promovendo indiretamente a biotransformação do produto. A inibição do tratamento com dioxinas seria proveniente apenas da interação dos outros dois compostos do controle, DMF e TW. Ademais, no grupo a1 há também a presença dos tratamentos contendo como substrato as amostras de leira de compostagem esterilizada e não esterilizada. Devido a uma alta taxa de

colonização e maior robustez do fungo frente a interferentes, a presença de outros micro-organismos da leira não esterilizada não interferiu significativamente no seu crescimento micelial. Como alguns dos outros componentes da leira testados separadamente se encaixaram nos outros grupos a2 e a3, conclui-se que a inibição do crescimento do fungo *A. fumigatus* deu-se devido a presença de outros componentes da leira não avaliados neste experimento.

No grupo a2 se encontram mais cinco tratamentos (RBBR, TF, BDA, BG, TE), que não mostraram nenhuma variação estatisticamente significativa em termos de crescimento micelial. Assim, pode-se inferir que os tratamentos contendo partes separadas da leira de compostagem não influenciaram no crescimento microbiano. Para o grupo a3 foi enquadrado apenas o tratamento CZ, que favoreceu o desenvolvimento do fungo.

Para o micro-organismo *Aspergillus fumigatus* os tratamentos contendo todos os constituintes da leira de compostagem foram responsáveis por inibição de crescimento, enquanto que o tratamento com cinza promoveu o crescimento. Deste modo, pode-se inferir que algum componente da leira causa uma inibição mais acentuada do que a promoção de crescimento induzida pela presença de cinzas. Assim como os outros micro-organismos previamente avaliados, o fungo *Aspergillus fumigatus* apresenta potencial como possível biorremediador, porém as condições físico-químicas do meio de cultura devem ser minuciosamente avaliados para evitar perda de capacidade devido à inibição de crescimento causada pela presença de compostos da leira.

Uma maneira, no caso do *Aspergillus fumigatus* ou de outro que apresente comportamento similar, seria a utilização apenas da cinza em um primeiro momento, para a biodegradação dos compostos tóxicos presentes na matriz, com posterior adição do material ao compostador contendo a mistura da leira.

Na análise de agrupamento por UPGMA para o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentada na FIGURA 4.12 pode-se observar claramente a separação dos três grupos da mesma forma que obtida pelo modelo de Scott-Knott, mostrando a congruência dos resultados por diferentes métodos.

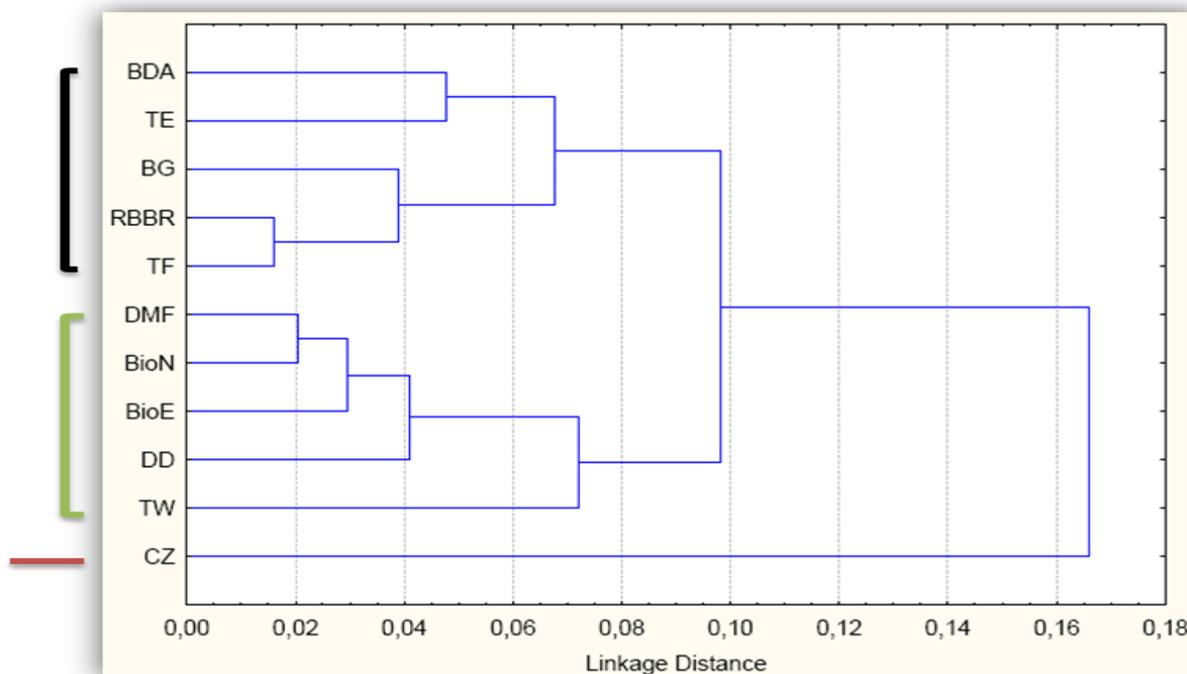


FIGURA 4.12 - Análise de agrupamento por UPGMA para o fungo *Aspergillus fumigatus*. Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Verde, a2 = Preto, a3 = Vermelho.

Pela análise da FIGURA 4.12 pode-se perceber que a influência da cinza na promoção do crescimento desta vez foi estatisticamente mais significativa do que a inibição pelos tratamentos do grupo a1, como observado pela maior distância de ligação entre os agrupamentos.

O último micro-organismo avaliado por este experimento, *Aspergillus flavus*, foi o que também apresentou maior robustez e menor variabilidade entre os valores de IVCM. Não obstante, apresentou a sua separação em três grupos quando aplicado o modelo de Scott-Knott como mostra a FIGURA 4.13.

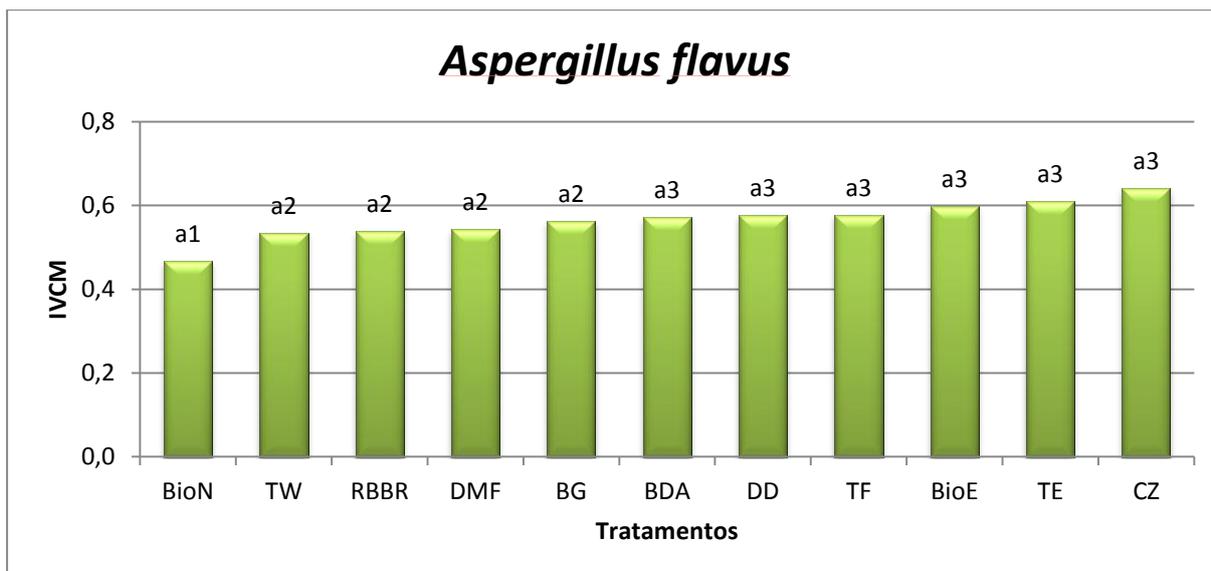


FIGURA 4.13 - Modelo de agrupamento de média usando o método de Scott-Knott para avaliação da influência dos tratamentos no crescimento do fungo *Aspergillus flavus*.

No grupo a1 foi alocado apenas o tratamento BioN, evidenciando a dificuldade de crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* em placas contendo leira de compostagem não esterilizada, novamente evidenciando a dificuldade de crescimento, onde uma das hipóteses pode ser associada à presença de micro-organismos que interferem no crescimento de fungos do gênero *Aspergillus*. Para o grupo a2, que consistiu nos tratamentos TW, RBBR, DMF e BG, pode ser atribuído uma inibição no crescimento com relação ao controle BDA. No grupo a3 foram alocados os outros seis tratamentos incluindo o controle BDA (BDA, DD, TF, BioE, TE, CZ), mostrando que para estes cultivos o crescimento não foi estatisticamente influenciado.

Algumas avaliações podem ser deduzidas dos comportamentos observados nos experimentos realizados. A presença dos tratamentos TW e DMF no grupo a2 mostrou que estes compostos são responsáveis por um ligeiro retardo no crescimento microbiano. A presença do tratamento com 1,2,3,4-TCDD no grupo a3 é um indício que a presença de dioxina no meio de cultivo supriu as deficiências causadas pela presença dos outros compostos incorporados na amostra DD, o que sugere que sua presença pode promover o crescimento do fungo, provavelmente devido à seu uso como fonte de nutriente, e portanto o *Aspergillus flavus* pode ser usado na biotransformação de xenobiótico. A grande separação entre os

tratamentos BioN e BioE (27,74%) mostrou uma acentuada inibição de crescimento para o tratamento contendo a leira de compostagem não esterilizada, enquanto que o uso da leira esterilizada não mostra nenhuma diferença com relação ao controle BDA, o que demonstra que os componentes físico-químicos presentes na mistura não são responsáveis pela inibição do crescimento, sendo este atribuído a competição microbiana presente na amostra não esterilizada. Ademais, o tratamento com cinza do bagaço de cana mostrou-se favorável ao crescimento. A presença do tratamento BioE no grupo 3, com valor de IVCM ligeiramente menor do que o tratamento com apenas CZ pode ser parcialmente interpretado pela presença de um dos componentes da leira, o tratamento BG, no grupo a2, que inibe ligeiramente o crescimento micelial.

Devido às médias do IVCM serem muito próximas entre si para o fungo *A. flavus*, a sequência de formação dos grupos observada pela análise de agrupamento sofre uma pequena mudança com relação aos grupos, como se observa na FIGURA 4.14.

O tratamento CZ, que pelo modelo de Scott-Knott foi alocado no grupo a3. Pela análise de agrupamento do IVCM demonstrou uma menor correlação com o seu grupo do que as amostras do grupo a2. Este fator pode ser interpretado como uma maior discrepância entre os valores de IVCM obtidos para CZ com relação ao grupo a3, do que as médias dos tratamentos a2 com relação ao grupo a3. Da mesma forma, o tratamento BG, pertencente ao grupo a2 pelo modelo de Scott-Knott, mostrou uma menor correlação com seu grupo do que as amostras do grupo a3, sendo inserido ao agrupamento apenas após a união dos grupos a2 e a3 entre si. Assim, apenas com o auxílio do modelo de Scott-Knott pode-se inferir estatisticamente que o tratamento CZ pode ser comparado aos demais tratamentos do grupo a3, e que o tratamento BG pertence ao grupo a2, não sendo classificados como novos grupos.

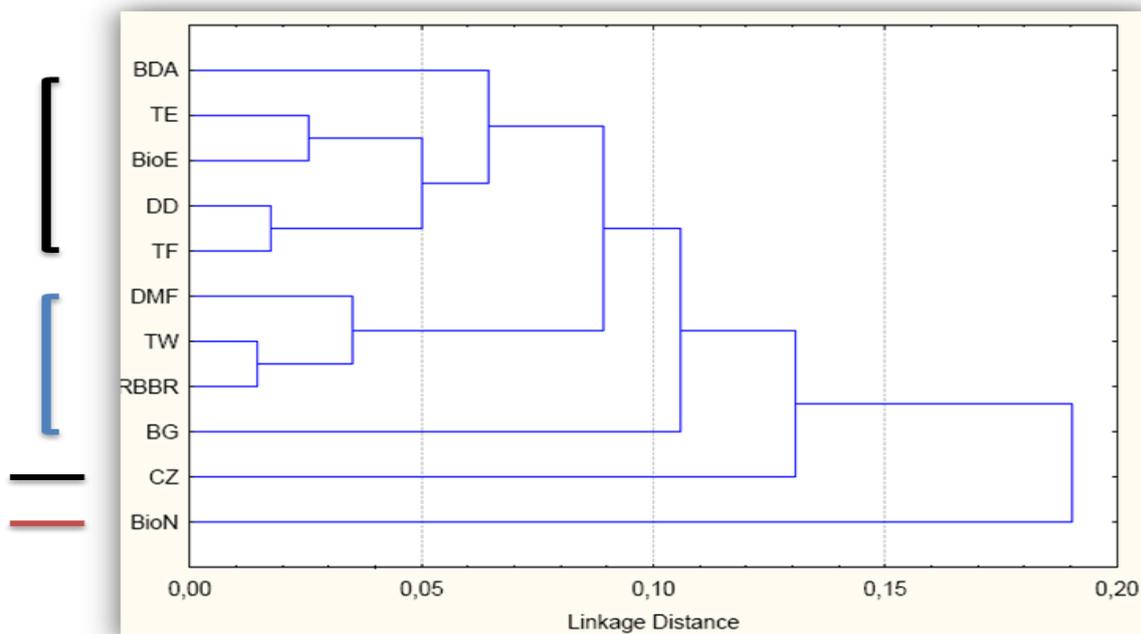


FIGURA 4.14 - Análise de agrupamento para o fungo *Aspergillus flavus*. Os traços correspondem aos tratamentos avaliados pelo modelo de Scott-Knott. a1 = Vermelho, a2 = Azul, a3 = Preto.

Esta variação observada entre os modelos para esta espécie deve-se principalmente a alta proximidade dos valores de IVCM entre os tratamentos, o que torna o experimento qualitativo não tão eficiente, já que ele define apenas a semelhança entre os valores de crescimento entre os tratamentos, não apontando se a variação é decorrente de um crescimento maior ou menor, e não demonstrando a partir de que intervalo é possível identificar a separação dos tratamentos em grupos estatisticamente distintos. Desta forma, a análise de agrupamento pode descrever incorretamente a correlação entre os grupos, como observado na FIGURA 4.14. Se apenas a análise de agrupamento fosse realizada, conclusões errôneas poderiam ser atribuídas os tratamentos CZ e BG.

A FIGURA 4.15 compila todos os resultados obtidos dos onze tratamentos realizados para os quatro fungos.

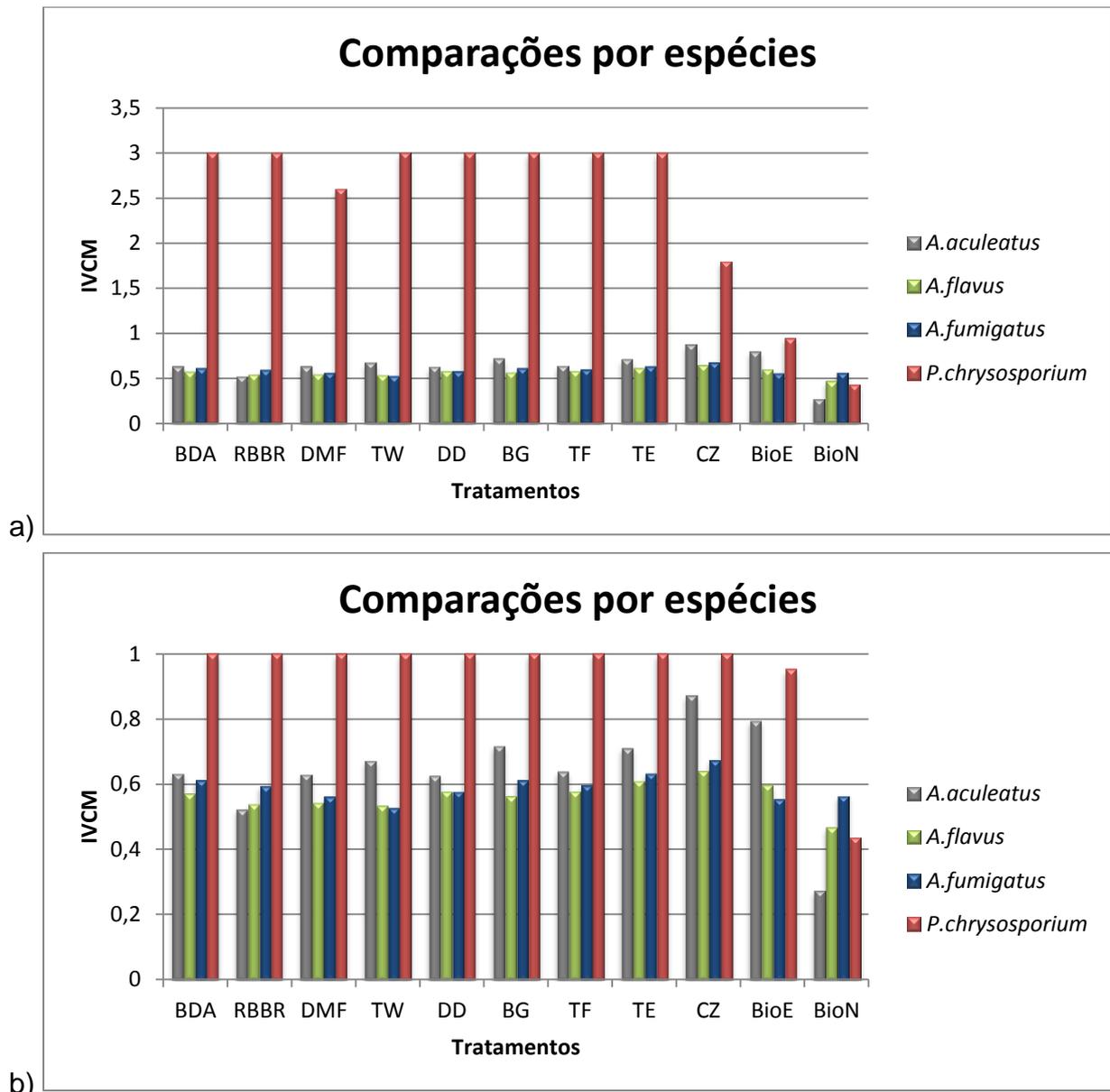


FIGURA 4.15 - a) Comparações dos valores de IVCM obtidos para as quatro espécies de fungos avaliados. b) Imagem ampliada do IVCM com intervalo até 1,0, mostrando com mais detalhes a variação entre as espécies do gênero *Aspergillus*.

Avaliando o conjunto de dados obtidos para o crescimento das 4 espécies de fungos, observou-se que independente do substrato utilizado, o crescimento do fungo *Phanerochaete chryso sporium* ocorreu de uma maneira muito mais acelerada quando comparado com o crescimento dos fungos do gênero *Aspergillus*.

De um modo geral, nas condições que o experimento foi conduzido observou-se que:

- O crescimento de todos os micro-organismos foi afetado negativamente em diferentes intensidades quando cultivado na presença da leira não esterilizada incorporado ao meio de cultivo.
- Apenas a espécie *Aspergillus fumigatus* entre os fungos investigados apresentou crescimento similar em ambos os tratamentos contendo a leira esterilizada e não esterilizada, o que indica um efeito de algum outro componente da matriz no crescimento micelial, sem influência significativa do crescimento concomitante de outros micro-organismos. Nas demais espécies, o efeito de inibição no crescimento observado nos tratamentos não esterilizados indica que possivelmente a competição microbiana ou a falta de nutrientes foram fatores dominantes na inibição do crescimento. De fato, para *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus flavus* o tratamento BioE foi favorável ao crescimento, indicando que não há interações prejudiciais entre os componentes da leira e o fungo.
- Nos tratamentos realizados adicionando-se a cinza no substrato observou-se que as espécies do gênero *Aspergillus* apresentaram uma melhora em seu crescimento com relação ao crescimento no controle BDA, apresentando aumentos no IVCm de 10,06% para *Aspergillus fumigatus*, 12,08% para *Aspergillus flavus* e 37,84% para *Aspergillus aculeatus* quando comparados os tratamentos CZ e BDA. De fato, para as três espécies de *Aspergillus* testadas, os maiores índices de crescimento ocorreram nestes tratamentos.

4.3 – Análise qualitativa e quantitativa da capacidade de biodegradação do corante RBBR.

4.3.1 - Otimização e validação de método para análise do corante RBBR por HPLC-ESI-MS/MS.

Os parâmetros cromatográficos a serem otimizados foram avaliados utilizando uma solução estoque de RBBR com concentração $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparada em água ultra pura em meio de cultura BDA preparado como descrito na seção 3.2. Foi utilizado um detector UV-Vis no comprimento de onda de 228nm para monitorar o pico do corante RBBR. O comprimento de onda foi escolhido após inspeção das

absorções do corante RBBR em um espectrofotômetro de UV-Vis, por representar a transição de maior intensidade (FIGURA 4.16).

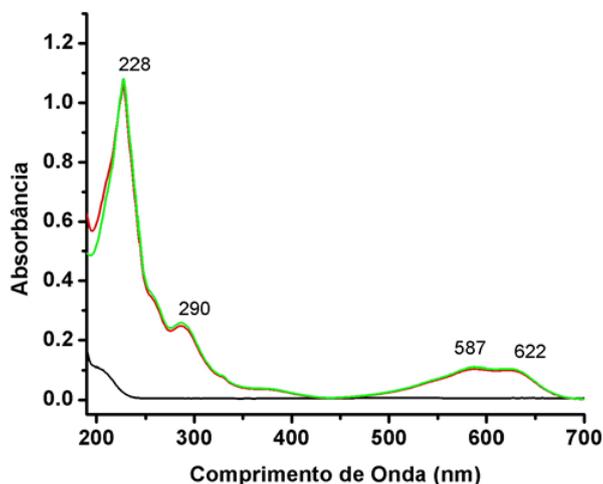
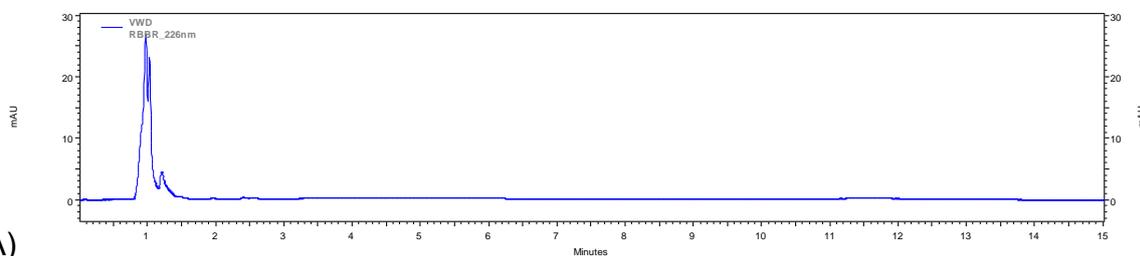


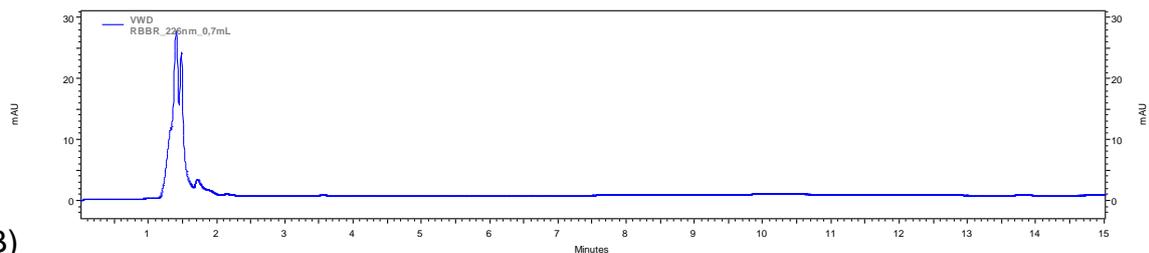
FIGURA 4.16 - Espectro de absorção no UV-Vis de uma solução de RBBR 10^{-4} M em ACN:H₂O (35:65 v/v). O traço colorido representa a amostra de RBBR; o traço preto indica o controle obtido pela análise da mistura da fase móvel sem adição de corante.

Foram avaliadas diversas combinações de colunas cromatográficas, além da composição, vazão e aditivos da fase móvel e a temperatura do forno da coluna. Algumas representações dos cromatogramas obtidos estão dispostas na FIGURA 4.17. A menos que indicado de outra forma, as soluções contendo aditivos sempre foram preparadas pela adição dos componentes em água ultra pura em concentrações específicas.



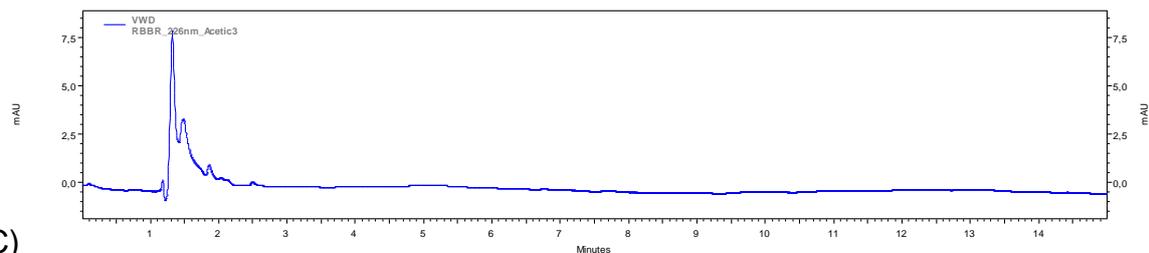
A)

Coluna Eclipse® XDB C18^b, MeOH/H₂O 60:40 (%v/v), 1,0mL.min⁻¹



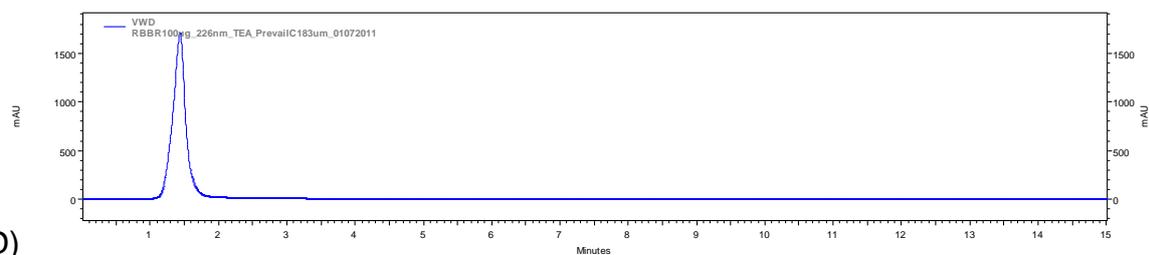
B)

Coluna Eclipse® XDB C18^b, MeOH/H₂O 35:65 (%v/v), 1,0mL.min



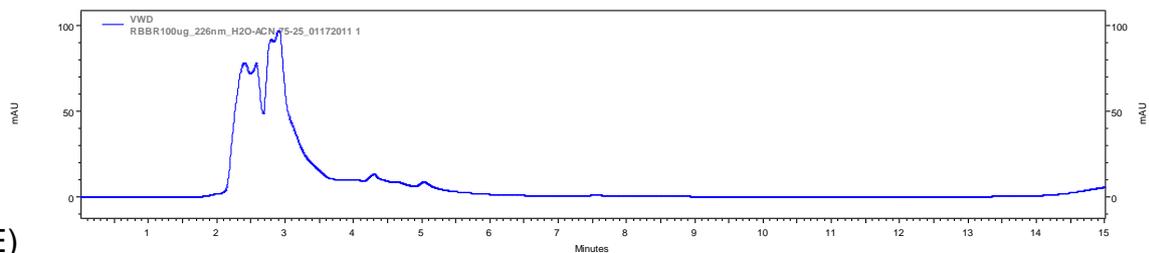
C)

Coluna Eclipse® XDB C18^b, ACN/HCOOH 0,05% 60:40 (%v/v), 1,0mL.min⁻¹



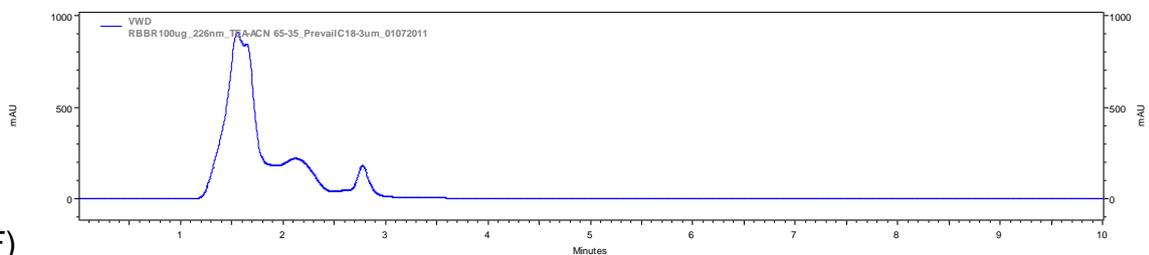
D)

Coluna Prevail® C18^c, ACN/TEA 0,05%/ 60:40 (%v/v), 0,2 mL.min⁻¹



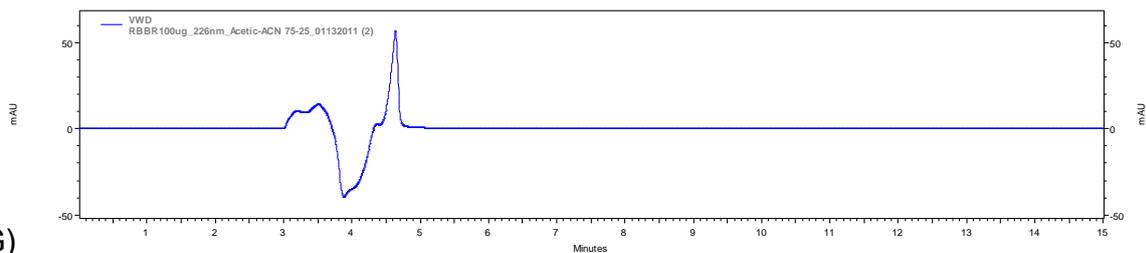
E)

Coluna Eclipse® XDB C18^b, ACN/TEA 0,05% 40:60 (%v/v), 0,7mL.min⁻¹



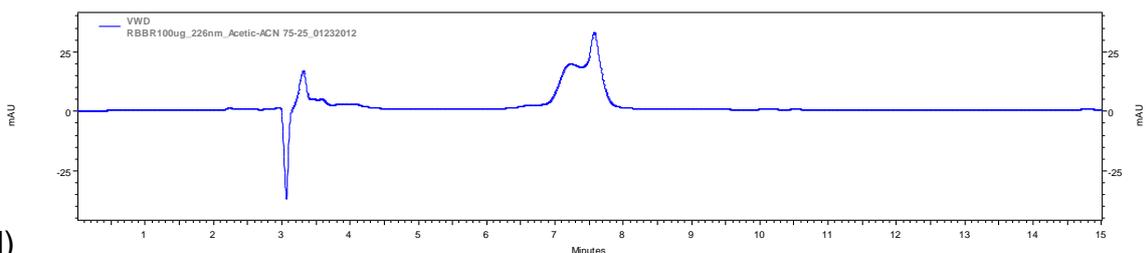
F)

Coluna Prevail® C18 – ACN/TEA 0,05% 35:65 (%v/v), 0,18 mL.min⁻¹



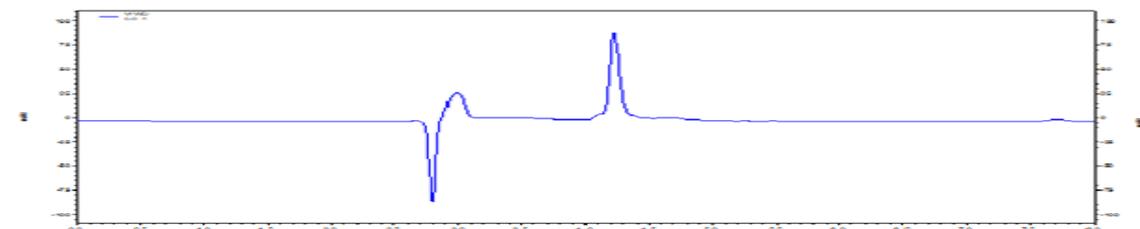
G)

Coluna Zorbax[®] SB Phenyl^a, ACN/H₂O 65:35 (%v/v), 0,7 mL.min⁻¹



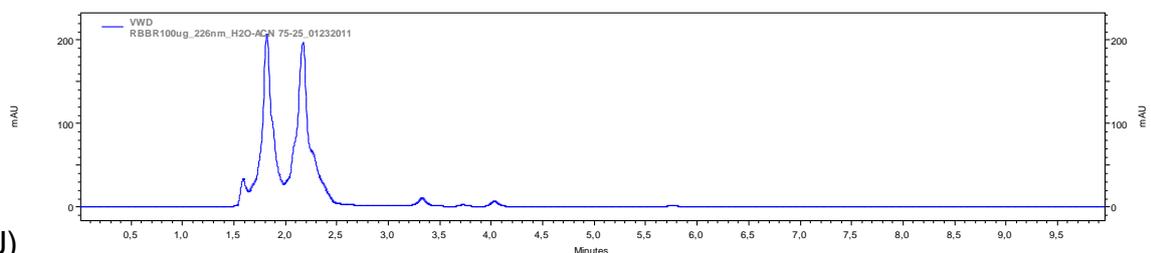
H)

Coluna Zorbax[®] SB Phenyl^a, ACN/CH₃COOH 0,05% 25:75 (%v/v), 0,7 mL.min⁻¹



I)

Coluna Zorbax[®] SB Phenyl^a, ACN/HCOOH 0,05% 25:75 (%v/v), 0,7 mL.min⁻¹



J)

Coluna Zorbax[®] SB Phenyl^a, ACN/H₂O 25:75 (%v/v), 1,0 mL.min⁻¹

FIGURA 4.17 - A-J) Cromatogramas obtidos na fase de desenvolvimento cromatográfico do método de análise do corante RBBR.

^a4.6x250mm, 5 μ m , ^b4.6x150mm, 5 μ m , ^c2.1x150mm, 3 μ m.

Fases móveis binárias preparadas pela mistura de H₂O:MeOH nas proporções testadas foram descartadas por não promoverem uma retenção suficiente do corante nas colunas avaliadas mesmo na presença de aditivos como ácido fórmico, ácido acético e trietilamina, tendo o corante RBBR co-eluído com outros compostos na frente da solvente (*solvent front*), com tempo de retenção muito

curto em todos os tipos de coluna testados (FIGURA 4.17, A-B). A frente do solvente é a linha frontal que indica a eluição da banda cromatográfica referente à inserção da fase móvel na coluna. De fato, é o tempo que um composto fica na coluna quando não há nenhuma retenção. Igualmente, misturas ACN:H₂O com predomínio de acetonitrila na composição da mistura não foram capazes de promoverem retenção em nenhuma das colunas C18 testadas, novamente devido à baixa retenção do corante, consequência de poucas interações entre a fase estacionária alquílica apolar, interagindo principalmente por forças de dispersão de London, uma das forças conhecidas de Van der Waals causada pela interação entre dois dipolos instantaneamente induzidos (IUPAC, 1997), e o corante RBBR, molécula aromática e muito polar, e portanto com muito mais afinidade à fase móvel aquosa, resultando na eluição do analito logo após o volume morto. (FIGURA 4.17, C-D). Fases móveis preparadas pela mistura binária ACN:H₂O com maior proporção de água e trietilamina como aditivo começaram a apresentar a retenção da banda referente ao corante RBBR com relação à banda do front do solvente, porém com baixa resolução (FIGURA 4.17, E-F). Estes métodos foram descartados, pois as micropartículas de sílica não apresentam alta estabilidade frente ao pH da solução de trietilamina utilizada (pH ≈ 11,5), podendo diminuir a vida útil da coluna.

Assim, novos ensaios foram realizados com uma coluna de fase reversa Zorbax[®] SB-Phenyl contendo como fase estacionária micropartículas de sílica revestidas com feniletil-diisopropil silano, [Si(C₃H₇)₂(CH₂)₂(C₆H₅)]. A seletividade única oferecida pelas fases estacionárias fenil fornecem características alternativas de retenção, resultando em separações distintas das obtidas por colunas com fases alquílicas, devido em parte às interações dos elétrons π do anel aromático do grupo fenila da fase estacionária com os elétrons π e pares de elétrons não ligantes presentes no analito, tipicamente pela presença de grupos aromáticos ou ligações insaturadas. A interação π-π é um tipo de interação entre doador-aceptor de elétrons mais forte do que simples interações de London, e tão importante quanto interações não covalentes como ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, levando a um aumento na retenção de compostos polares aromáticos quando comparado a retenções obtidas em colunas com fases estacionárias alquílicas (WAITE *et al.*, 2006).

As fases móveis testadas na coluna Zorbax[®] SB-Phenyl compostas de misturas ACN:H₂O com maior proporção de fase orgânica não foram eficientes em

promover a separação do corante da linha de frente do solvente com este tipo coluna (FIGURA 4.17, G). Uma possibilidade seria a competição entre as interações π promovidas pela porção fenil da fase estacionária entre o analito e a ligação tripla presente na estrutura da acetonitrila (YANG *et al.*, 2005). Fases constituídas com adição de ácido acético na fase aquosa aumentaram drasticamente o tempo de retenção do analito, porém diminuindo a resolução de seu pico, devido ao equilíbrio existente pela protonação dos grupos sulfônicos presentes no analito, sendo esta fase também descartada (FIGURA 4.17, H). A adição de ácido fórmico apresentou uma melhora na seletividade e simetria do pico, sendo uma das fases selecionadas para a posterior otimização (FIGURA 4.17, I), assim como a separação promovida pela fase móvel constituída por H₂O/ACN (FIGURA 4.17, J). A coluna Zorbax® SB-Phenyl apresentou um padrão de separação distinto com relação às colunas com fase C18, sendo escolhida para os próximos testes.

Na avaliação dos últimos parâmetros, a vazão de 0,3mL não foi compatível com o tamanho da coluna Zorbax® SB-Phenyl, apresentando um tempo de corrida muito longo e alargamento dos sinais, portanto o uso desta vazão também foi descartada, assim como foi descartada a vazão de 1,0mL.min⁻¹ pois sua alta velocidade promoveu a percolação do analito pela corrida em um tempo muito curto, diminuindo o tempo de interação entre analito e fase estacionária. Assim, a vazão de 0,7mL.min⁻¹ foi escolhida. A variação de temperatura apenas modificou o tempo de retenção do analito, sem alterar efetivamente a forma da banda cromatográfica ou a seletividade do método, e como a utilização da temperatura do forno da coluna em 30°C mostrou-se eficiente para uma separação rápida, porém efetiva, foi escolhida em detrimento dos métodos com temperatura de 25° e 35°C.

Assim todos os parâmetros foram definidos, sendo os parâmetros descritos na TABELA 4.3 para novas investigações e ajuste fino de separação.

TABELA 4.3 - Condições cromatográficas após otimização do método para RBBR.

Coluna	Fase Móvel	Proporção	Aditivo	Vazão	T (°C)
Zorbax® SB-Phenyl 4.6x250mm, 5µm	H ₂ O:ACN	65:35	Sem ácido	0,7mL	30
Zorbax® SB-Phenyl 4.6x250mm, 5µm	H ₂ O:ACN	65:35	HCOOH 0,05% v/v	0,7mL	30

Com as condições de separação cromatográfica definidas, num segundo momento passou-se a avaliar os parâmetros do espectrômetro de massas. A otimização dos parâmetros espectrométricos de análise tem como objetivo melhorar a seletividade do método com relação à separação cromatográfica e a sensibilidade do método com relação à detecção do corante, buscando a melhor relação sinal-ruído. Devido à sua estrutura dissulfonada e extremamente hidrofílica, a molécula de RBBR não é adequada para ser ionizada por fontes de impacto eletrônico, fato este ocasionado pelo excesso de sinais e incapacidade de volatilização (HOLČAPEK *et al.*, 1999). Os grupos sulfônicos são de caráter ácido, o que torna a formação dos íons $[R(SO_3)_n]^{n-}$ em solução aquosa muito fácil, sendo este um indício de que a ionização no modo negativo seja mais adequada. Ademais, dentre as técnicas de ionização brandas testadas por RÀFOLS e BARCELÓ (1997), a técnica de ionização por *electrospray* (ESI) no modo negativo apresentou melhor desempenho do que fontes de ionização por APCI e TSI (*Thermospray Ionization*) com relação à sensibilidade e reprodutibilidade. Desta maneira, a fonte e o modo de ionização selecionados para o experimento foram a fonte de *electrospray* (ESI) com modo de ionização negativo (ESI⁻). Devido ao efeito de supressão de sinal causado pela presença de ácido fórmico na fase móvel em ionização negativa por *electrospray* de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular (WU *et al.*, 2004), o método com o uso de ácido fórmico na porção aquosa da fase móvel foi descartado, e o método isento de ácido fórmico foi definido como método padrão para a sequencia das análises.

Os parâmetros espectrométricos avaliados no experimento, e o local onde atuam dentro do instrumento API 2000™ estão indicados na FIGURA 4.18.

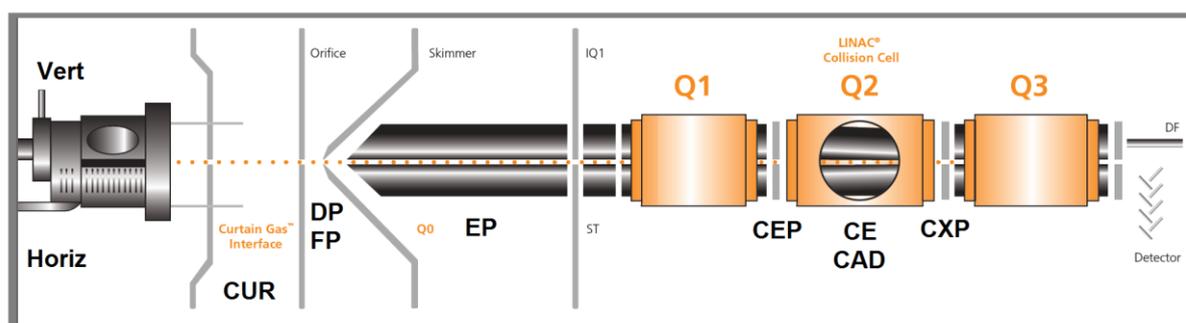


FIGURA 4.18 - Desenho representativo do instrumento API 2000™, com uma fonte *TurbolonSpray*®, e um arranjo de triplo quadrupolo, indicando o local de atuação das variáveis passíveis de otimização. Adaptado de AB/Sciex, 2010.

Para iniciar a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, foram avaliados os parâmetros dependentes do analito para o primeiro quadrupolo (Q1) DP, FP e EP, como descrito na seção 3.4.3.2. A otimização consistiu na varredura em intervalos fixos de cada parâmetro individualmente, entre os valores mínimo e máximo da faixa de trabalho de cada variável instrumental descrita, utilizando os valores de intensidade de sinal produzido pela ionização do corante RBBR como ferramenta de avaliação, sendo definido como ótimo o valor no qual a intensidade do sinal referente à ionização do analito fosse máxima. O *software* foi programado para uma avaliação automática das energias dos parâmetros DP, FP e EP, reavaliando cada parâmetro após mudança no valor das energias. As faixas de energia trabalhadas e as amplitudes de variação para cada parâmetro e os valores ótimos encontrados estão descritas na TABELA 4.4. Além da avaliação das energias que promoveram sinais de maior intensidade, foram observados os padrões de fragmentação diferentes formados com combinações variadas de potenciais aplicados.

Operando no modo negativo de ionização, o íon m/z 290 se mostrou como o pico base na maior parte das varreduras. A partir dos valores otimizados de energias dependentes do analito para fragmentação no primeiro quadrupolo foi realizado um experimento no modo *full scan* (FIGURA 4.19), para a escolha de um íon específico a ser usado na seleção do íon precursor para a quantificação através do experimento de SRM. O pico base, como mostra a FIGURA 4.19, apresenta relação m/z 290. Após cuidadosa avaliação, este íon foi identificado como um íon molecular de dupla carga, com massa real 580 e carga -2. Esta identificação foi possível devido ao padrão isotópico apresentado pelo pico. Este padrão isotópico é observado devido aos isótopos diferentes de cada átomo em proporções conhecidas, fazendo que existam moléculas do analito com massas próximas, com diferenças nos seus valores em uma razão conhecida, de acordo com a distribuição estatística da quantidade de cada isótopo na natureza. Como o equipamento caracteriza os íons através da relação entre sua massa (m) e sua carga formal (z), íons que apresentem mais de uma carga terão seu padrão isotópico distribuído em intervalos menores, de acordo com a quantidade de carga apresentada, observando-se sempre a relação m/z . Na molécula de RBBR, há um padrão isotópico em incrementos de m/z de 0,5 unidades, característico de moléculas duplamente carregadas. Desta maneira, pode-se concluir que este incremento em

meia unidade de massa se deve à presença de duas cargas na molécula como mostra a FIGURA 4.19.

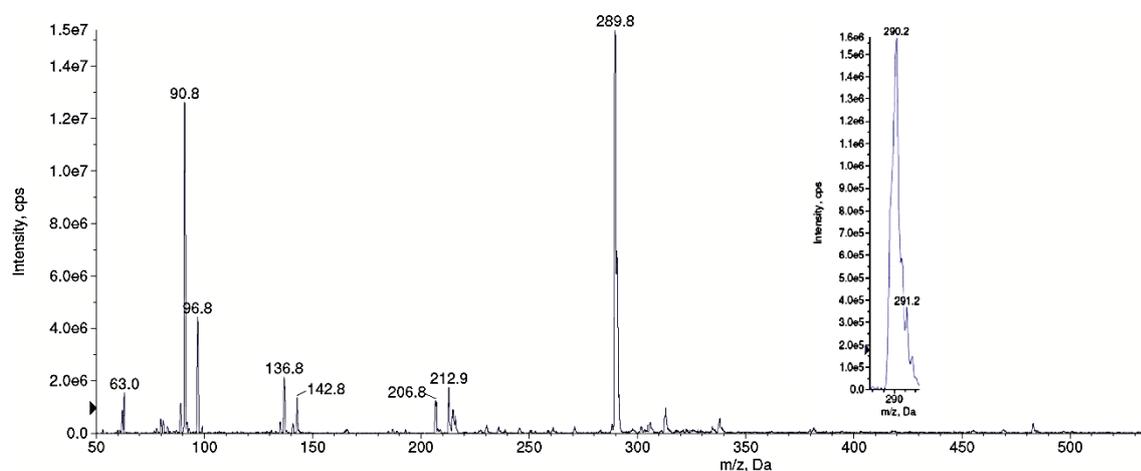


FIGURA 4.19 - Fragmentação do corante RBBR sob condições otimizadas. Em detalhe, o padrão isotópico do pico m/z 290, indicando incrementos de 0,5 unidades de massa.

Após a escolha do melhor fragmento para atuar como íon precursor para o primeiro quadrupolo, de m/z 290, o equipamento foi configurado para o modo de “íons produto (MS^2)” para avaliação dos parâmetros de dissociação induzida por colisão (CID, *Collision-Induced Dissociation*, também conhecida pelo acrônimo CAD, *Collisionally Induced Dissociation*) (VESSECCHI *et al.*, 2011) no segundo quadrupolo (Q2), sendo eles CE, CEP e CXP. A faixa de trabalho, a amplitude de variação e os valores otimizados de energias dependentes do analito para o Q2 estão descritos na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 - Parâmetros dependentes do analito para formação de fragmentos do íon precursor para o RBBR.

Parâmetro	Faixa de trabalho	Amplitude	Valor Ótimo
DP (V)	-1/-200	2	-16
FP (V)	-1/-400	5	-270
EP (V)	-1/-12	0,5	-3,5
CEP (V)	-1/-20	1	-16
CE (V)	-5/-100	1	-20
CXP (V)	-1/-15	1	-4

As principais variações na varredura foram relacionadas com a intensidade na qual os fragmentos eram formados. Na maioria dos experimentos de otimização desta etapa, o íon m/z 97 apresentou-se como mais intenso, com a existência de um íon produto de baixa intensidade em m/z 483. A formação dos dois íons é derivada da perda de um grupo sulfato m/z 91 ($-\text{OSO}_3\text{H}$)⁻ pelo íon precursor duplamente carregado m/z 290. A perda de sulfato em experimentos de MS/MS é muito comum em moléculas sulfatadas (JEWETT *et al.*, 1999; HOLČAPEK *et al.*, 2007). Em todas as condições testadas, não foi observado em nenhum momento sinais de mesma intensidade para os fragmentos em m/z 97 e m/z 483, sendo o primeiro sempre observado em maior proporção. Não foi observado a perda de sulfonato ($-\text{SO}_3$)⁻ de m/z 80, indicando pouca ou nenhuma fragmentação no grupo sulfonato ligado ao anel. Da mesma forma, a ausência do sinal em m/z 80 indica a ausência de fragmentação do grupo sulfona ($\text{R}_1\text{R}_2\text{SO}_2$) (ZAIA, 2004). O mecanismo de fragmentação proposto para a formação dos íons produtos está na FIGURA 4.20.

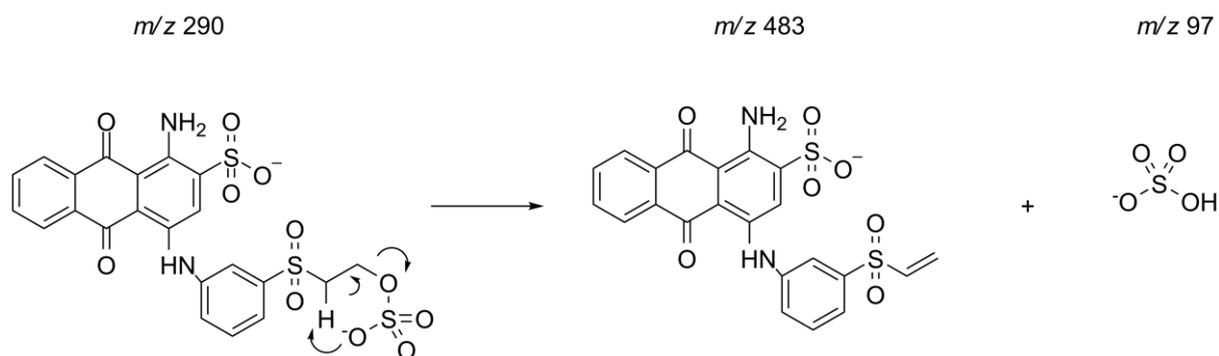


FIGURA 4.20 - Proposta de formação dos fragmentos no experimento de íons produto (MS^2) para o íon precursor m/z 290.

Para confirmar a estrutura do íon de m/z 483, foi feita um experimento de íons produto para este íon, que também pode ser observado no experimento de *full scan*, em pequenas quantidades. (FIGURA 4.21).

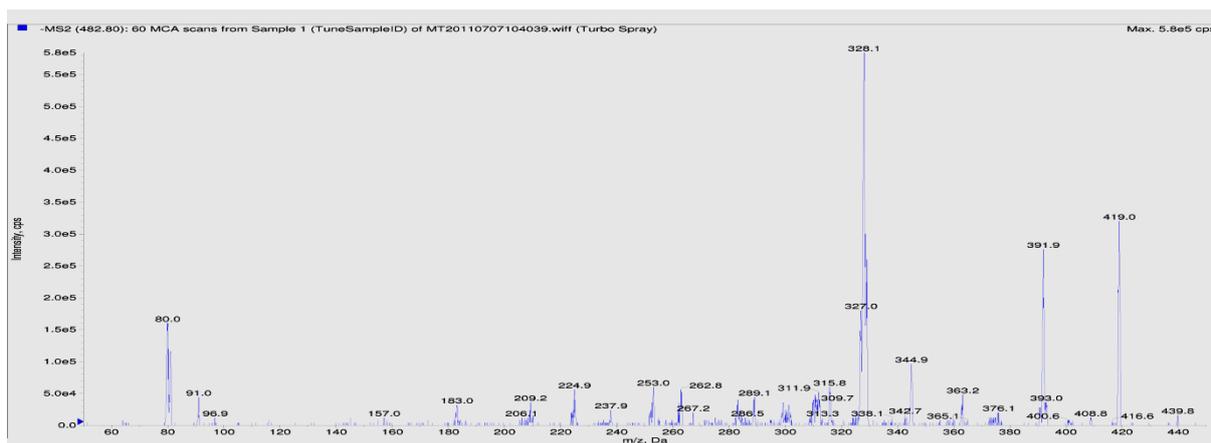


FIGURA 4.21 - Espectro de íons produto para o íon m/z 483.

Como se pode observar, o fragmento em m/z 80 referente a perda de SO_3 aparece muito mais intenso, sendo o fragmento em m/z 97 referente a perda de HSO_4^- não distinguível do ruído da linha de base, indício de que a porção contendo o fragmento sulfato já havia sido retirada quando o íon m/z 483 foi fragmentado.

Utilizando as condições otimizadas para o máximo de formação do fragmento m/z 97 a partir do íon precursor m/z 290, obteve-se o espectro de íons produto como mostra a FIGURA 4.22. Pode-se observar a formação do íon m/z 97 como o íon de maior intensidade, portanto este foi escolhido como o íon produto a ser utilizado para a transição de quantificação (m/z 290 \rightarrow m/z 97) para o método quantitativo por SRM.

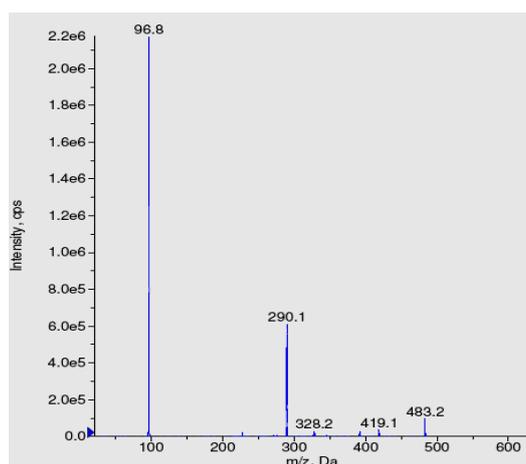


FIGURA 4.22 - Fragmentação do íon m/z 290 do corante RBBR no Q2.

Após a otimização dos parâmetros dependentes do analito, uma nova amostra de RBBR de concentração $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi analisada por injeção em fluxo (FIA), sendo avaliada a capacidade de formação e identificação dos fragmentos

selecionados para o modo SRM em uma amostra injetada através da interface de um equipamento de HPLC e eluída com a fase móvel descrita na Tabela 4.3. Desta maneira, pode-se avaliar a capacidade do método na formação dos fragmentos de interesse, desta vez simulando as mesmas condições de vazão e composição da fase móvel previamente estabelecida para a separação cromatográfica do analito de interesse. Os parâmetros avaliados, bem como a faixa de trabalho, a amplitude de variação e os resultados estão dispostos na TABELA 4.5.

Inicialmente, foi avaliada qual a melhor posição do capilar do *spray* da fonte ESI, através de inspeção manual das posições de cada manivela (Horiz e Vert), com incrementos de 0,5mm por amostra. Foram testadas diferentes combinações, avaliando-se a intensidade do sinal de SRM obtido para a transição escolhida. Foi escolhida a combinação que apresentou o sinal mais intenso, com a posição horizontal em 3mm e a posição vertical em 4mm.

TABELA 4.5 - Parâmetros dependente da fonte ESI- avaliados para a análise do corante RBBR.

Parâmetro	Faixa de trabalho	Amplitude	Valor Ótimo
Horiz (mm)	2,5-5,0	0,5	3,0
Vert (mm)	2,5-4,5	0,5	4,0
CAD (psi)	4/8	1	4
CUR (psi)	25/35	5	25
GS1 (psi)	40/50	5	40
GS2 (psi)	40/50	5	50
IS (V)	-4500/-3500	500	-4500
TEM (°C)	300-400	50	350

Para a avaliação dos outros parâmetros dependentes da fonte descritos na TABELA 4.5, foi utilizada uma ferramenta do *software* que promove a otimização automática dos parâmetros um a um, avaliando-os por toda a faixa de trabalho. Cada parâmetro é avaliado em triplicata, sendo media a intensidade do sinal obtido e comparando o valor das médias de cada nível para a escolha do resultado ótimo. Em sequência, foram avaliados CUR, IS, GS1, GS2 e CAD. O parâmetro TEM foi avaliado manualmente, obtendo-se uma temperatura que garante a completa vaporização da fase móvel na entrada do espectrômetro de massas, que

evita comprometer o desempenho do método pela formação de agregados de moléculas de solvente grandes demais, que não seriam transferidos para o Q0.

Os melhores resultados obtidos com a otimização instrumental e definidos como método para análise das amostras de micro-organismos estão representados na

TABELA 4.6. Com esta configuração, obteve-se o cromatograma como mostra a FIGURA 4.23.

TABELA 4.6 - Condições experimentais para o método de quantificação de RBBR.

DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)	IS (V)
-16	-270	-3,5	-16	-20	-4	-4500
Horiz	Vert	CUR (psi)	CAD (psi)	GS1 (psi)	GS2 (psi)	TEM (°C)
3,0	4,0	25	4	40	50	350

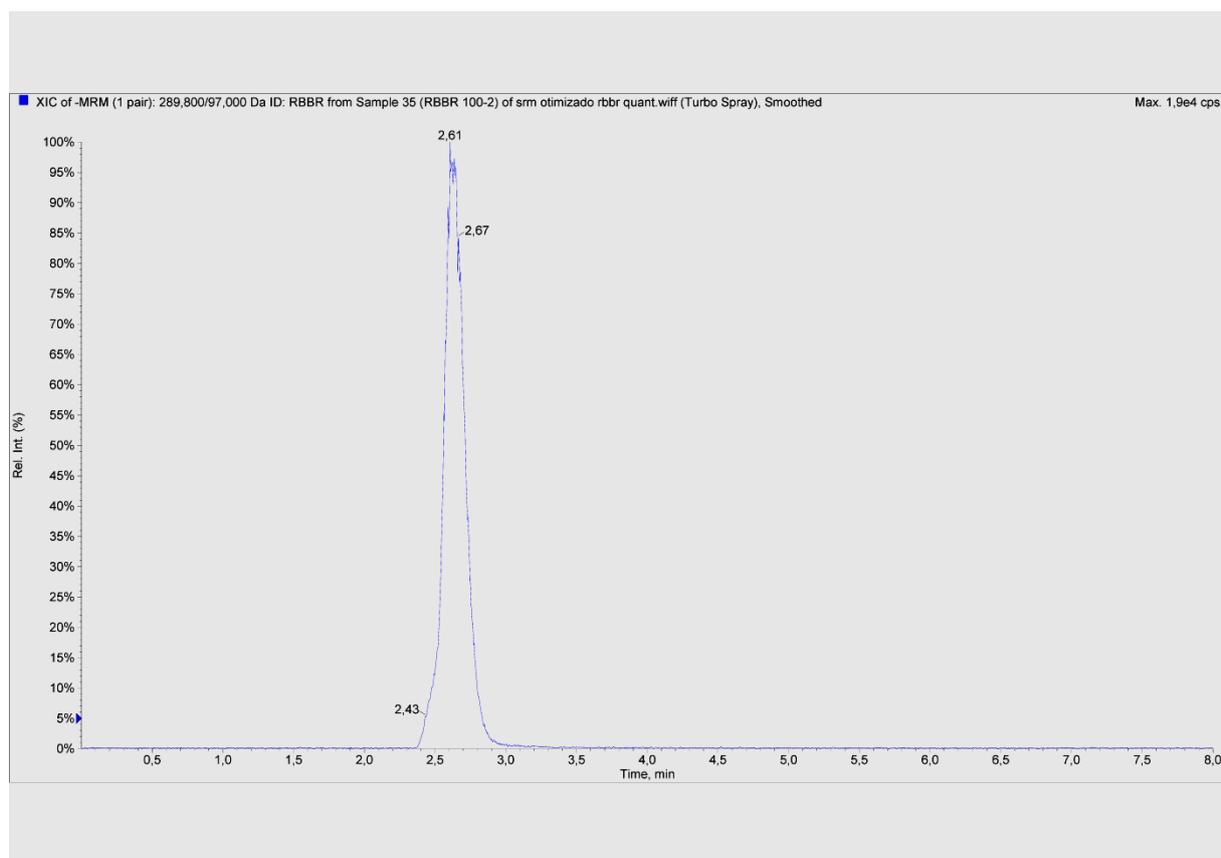


FIGURA 4.23 - Cromatograma no modo SRM obtido utilizando as condições otimizada para uma amostra padrão de corante RBBR a 100ng.mL^{-1} .

4.3.2 – Validação do método quantitativo para análise do corante RBBR por HPLC-(ESI)-MS/MS.

Com os resultados satisfatórios obtidos com o desenvolvimento do método de análise quantitativa do corante por HPLC-(ESI)-MS/MS, prosseguiu-se com a avaliação da rigidez e confiabilidade do método, através da verificação das figuras de mérito descritas na seção 3.4.3.2.

Os resultados obtidos com relação à estabilidade do analito perante ao tempo de repouso no auto injetor a ciclos de degelo estão dispostos na TABELA 4.7.

TABELA 4.7 - Estabilidade da amostra de RBBR com relação ao tempo de repouso no auto injetor e com ciclos de degelo.

Solução padrão (ng.mL ⁻¹)	Repetições	Recuperação (%)	CV (%)
Estabilidade da amostra			
250	12	100,71	1,16
Estabilidade de congelamento			
250	5	100,43	1,67

Como observado pelo coeficiente de variação das amostras, a concentração do analito não sofreu modificações significativas nos testes, tanto no auto injetor do HPLC por 24 horas a temperatura ambiente quanto durante os ciclos de congelamento/descongelamento. As amostras foram preparadas e analisadas após carregá-las no auto injetor ou armazenadas para posterior análise.

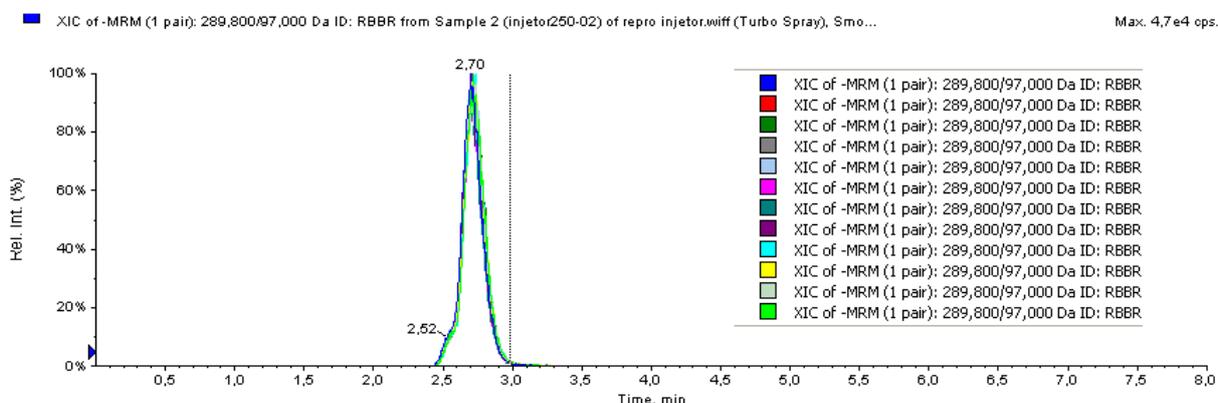


FIGURA 4.24 - Cromatogramas usados na avaliação da estabilidade da amostra do corante RBBR sobrepostos. Cada amostra representa um intervalo de 2 horas.

A próxima avaliação foi feita observando-se a seletividade da transição escolhida para a quantificação do corante. A FIGURA 4.25 apresenta uma comparação entre amostras de *Aspergillus flavus* cultivados na presença e ausência do corante RBBR, obtidas após 25 dias de crescimento. Esta amostra foi escolhida para ilustrar a seletividade, pois a amostra com corante apresenta concentrações próximas ao limite de detecção do método. O traço vermelho corresponde ao sinal obtido na amostra com corante, e o traço azul corresponde ao método SRM aplicado à amostra controle sem corante.

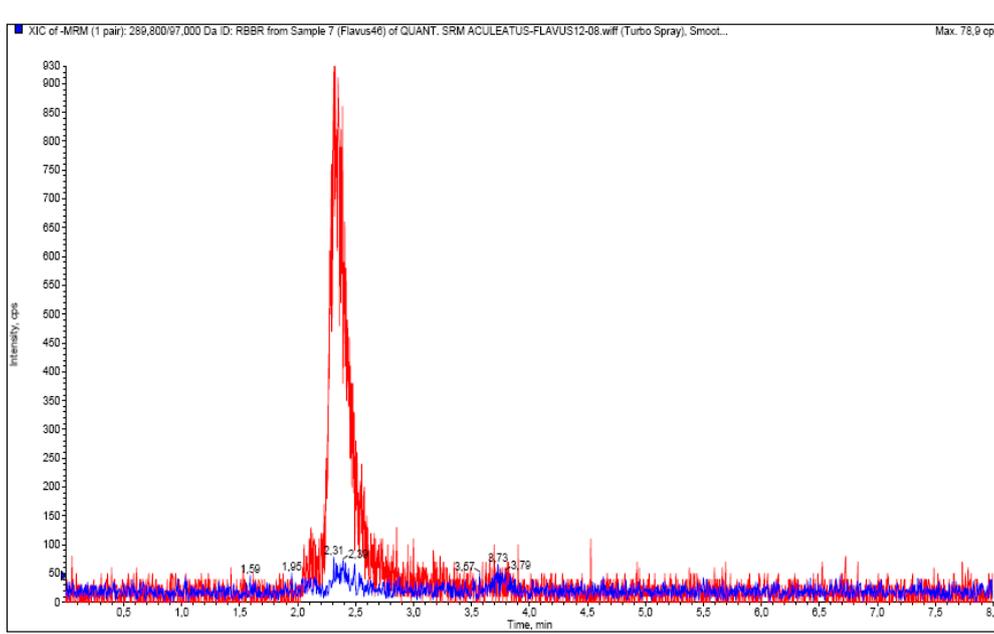


FIGURA 4.25 - Cromatograma comparando amostras com e sem corante, demonstrando a seletividade do método proposto. Legenda: Vermelho – Amostra de RBBR em meio com *Aspergillus flavus* com 25 dias de cultivo. Azul – Controle de crescimento de *Aspergillus flavus* com 25 dias de cultivo, sem adição do corante.

Todas as amostras analisadas quantitativamente foram comparadas a amostras de controle de maneira similar (n=84), não sendo observada nenhuma interferência no sinal do analito. Assim o método mostrou-se seletivo sendo observado um único pico cromatográfico em 2,4 minutos.

Pode-se observar nitidamente que não existe interferência de sinais decorrentes da matriz com tempo de retenção e com transições similares à selecionada para o método que possam interferir significativamente na quantificação do analito de interesse, mesmo nas menores concentrações utilizadas no

experimento. Sendo assim, o método proposto apresenta alta seletividade para o corante RBBR, sendo possível a distinção do sinal promovido pelo corante de eventuais sinais decorrentes de outros compostos presentes na matriz.

Para investigar o efeito de matriz sobre os dados quantitativos e da eficiência do processo após o tratamento aplicado às amostras. A TABELA 4.8 demonstra a proximidade dos valores observados para as três matrizes diferentes, em duas diferentes concentrações testadas.

TABELA 4.8 - Valores de recuperação do analito e efeito de matriz.

Tratamento (No de repetições)	Recuperação (%)*	CV (%)
Avaliação do efeito de matriz 30ng.mL⁻¹		
H ₂ O (n=3)	99,53	1,54
Meio BD (n=3)	99,67	0,68
Meio cultivado (n=3)	98,67	1,44
TOTAL (n=9)	99,29	1,20
Avaliação do efeito de matriz 300ng.mL⁻¹		
H ₂ O (n=3)	99,58	0,65
Meio BD (n=3)	100,30	2,42
Meio cultivado (n=3)	101,23	1,14
TOTAL (n=9)	100,37	1,55

* Valores médios.

Os valores de coeficiente de variação das amostras provenientes de diferentes matrizes apresentam pouca variação entre eles. Com este experimento ficou evidente que as matrizes não apresentam interferência no sinal do analito, podendo ser o efeito de matriz considerado negligenciável para o método. Da mesma forma, o alto valor de recuperação nas diferentes matrizes permite afirmar que o tratamento e a análise da amostra nas diferentes matrizes procedem de maneira similar, não influenciando no resultado da quantificação. Também é possível inferir com relação ao uso da técnica de *dilute-and-shoot* como etapa de preparo e limpeza de amostra que apesar de certa perda com relação ao LOD, análises exatas, precisas e sem efeitos de matriz consideráveis são obtidas muito rapidamente.

A FIGURA 4.26 mostra os cromatogramas usados para avaliação do LOQ e LOD. Usando a relação sinal-ruído como parâmetro foram encontrados os valores de $6,0\text{ng.mL}^{-1}$ e $3,0\text{ng.mL}^{-1}$ respectivamente. O Limite de Detecção corresponde à 50% do valor do Limite de Quantificação, de acordo com os valores exigidos pela Resolução 899/03 da ANVISA (2003).

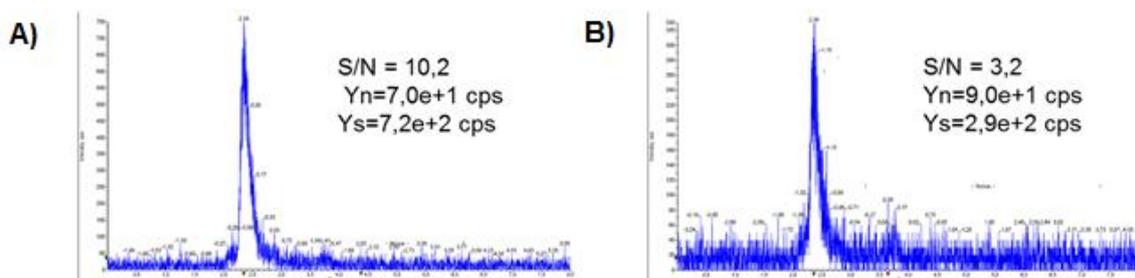
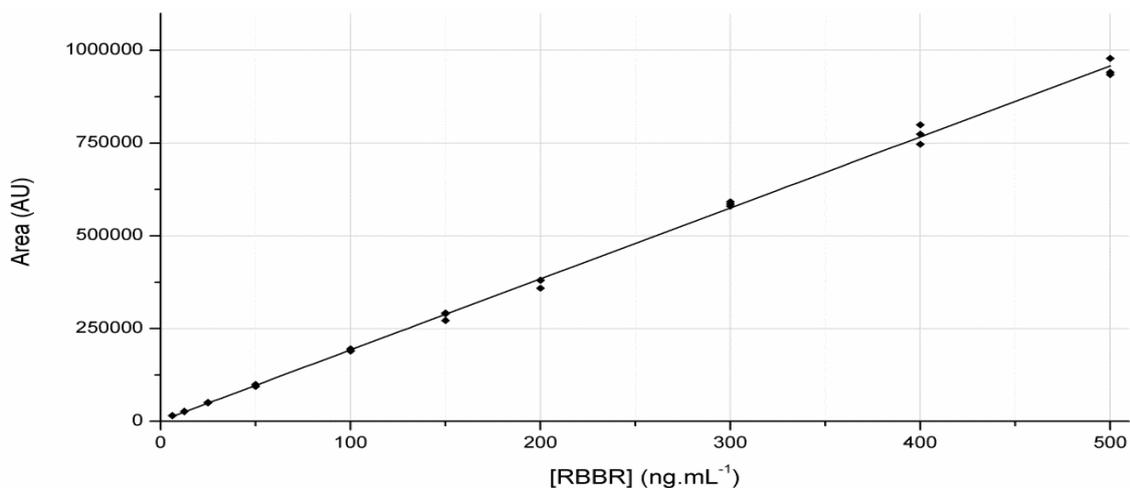


FIGURA 4.26 - Cromatogramas utilizados na determinação do A) LOQ e B) LOD. Na legenda, o valor de Y_n representa a altura máxima alcançada pelo ruído, e Y_s a altura correspondente ao sinal do analito na concentração analisada.

Com os valores mínimos de quantificação e detecção estipulados, a curva de calibração foi elaborada usando-se os valores de áreas obtidos para as dez concentrações representadas na FIGURA 4.27, através da construção de uma reta de regressão linear ajustada pelo método dos mínimos quadrados, produzida pelo *software* de tratamentos de dados.

O coeficiente de correlação R^2 com valor de 0,9995 indica uma ótima correlação entre os valores de áreas obtidos pela integração do pico do analito e as concentrações nominais. Com esta curva define-se a linearidade do método e, portanto a faixa linear de trabalho. Para as análises de precisão e exatidão do método, foram preparadas soluções de controle de baixa, média e alta concentração (CQB, CQM e CQA respectivamente). As concentrações preparadas para as três soluções foram de 7,35, 245 e 490 ng.mL^{-1} , que cobrem toda a faixa linear de trabalho como descrito na seção 3.4.3.2, com a função de avaliar possíveis desvios específicos no ângulo de inclinação da reta. Os valores obtidos estão dispostos na TABELA 4.9.



RBBR (ng.mL ⁻¹)	Rep1	Rep2	Rep3	Média	CV (%)
6,25	11013,9	12306,9	11653,5	11658,1	5,5%
12,5	22755,3	23500,7	22876,1	23044,0	1,7%
25	43122,8	49888,5	47947,0	46986,1	7,4%
50	99930,2	94256,7	94783,7	96323,5	3,3%
100	184687,1	189199,7	191267,9	188384,9	1,8%
150	261970,7	299074,5	293202,2	284749,1	7,0%
200	383051,0	379916,5	352633,5	371867,0	4,5%
300	588074,5	605573,6	613028,4	602225,5	2,1%
400	747152,5	816454,5	802994,8	788867,3	4,7%
500	988933,7	935096,1	941300,6	955110,1	3,1%

$$y = 1,90.10^3x + 3,09.10^3, R^2 = 0,9995$$

FIGURA 4.27 - Curva de calibração usada para quantificação do corante RBBR.

TABELA 4.9 - Precisão e exatidão para do método validado.

[RBBR] ng.mL ⁻¹	Dia	Repetições	Exatidão (%)	Precisão (%)
Variação Intra dias				
7.35	1	5	103,0	3,0
245	1	5	100,2	1,6
490	1	5	99,7	1,4
7.35	2	5	101,3	2,2
245	2	5	99,4	1,4
490	2	5	99,0	1,3
7.35	3	5	93,5	1,6
245	3	5	93,0	1,2
490	3	5	94,4	1,1
Precisão Inter dias				
7.35	-	15	99,3	4,9
245	-	15	97,5	3,6
490	-	15	97,7	2,7

A precisão indica o grau de dispersão dos resultados obtidos através da análise de amostras semelhantes. Os valores de precisão intra e inter dias obtidos se mostraram dentro dos padrões de aceitação para validação analítica em todas as concentrações avaliadas, que é de 15% para as concentrações maiores e de 20% para concentrações próximas ao LOQ. Os valores de exatidão se mostraram extremamente positivos devido a baixa concentração das amostras utilizadas, caracterizando uma boa robustez do método em toda a faixa de trabalho.

Com os dados mostrados nesta seção, é possível afirmar que foi elaborado, validado e aplicado um método para quantificação do corante RBBR, método este que se mostrou estável, seletivo, sensível, exato e preciso, permitindo a detecção de até 4,8 pM de corante. Com esta metodologia é possível quantificar a capacidade de remoção do corante por micro-organismos em meio de cultura líquido.

4.3.3 – Avaliação da capacidade de degradação do corante RBBR por micro-organismos

A metodologia desenvolvida e validada foi usada para a quantificação do corante RBBR nas alíquotas retiradas dos experimentos de degradação do corante usando os fungos em meio líquido.

Para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* uma degradação com taxa constante foi observada, onde uma maior variação entre as replicatas dentre todas as cepas testadas foi detectada. O fungo degradou em média 43% do corante no período de 30 dias como pode ser observado na FIGURA 4.28. Este valor se aproxima do valor encontrado por VAITHIYANATHAN *et al.* (2005), onde foi observada uma degradação de 50% de RBBR após 20 dias, mas usando condições diferentes de cultivo e uma menor concentração de RBBR.

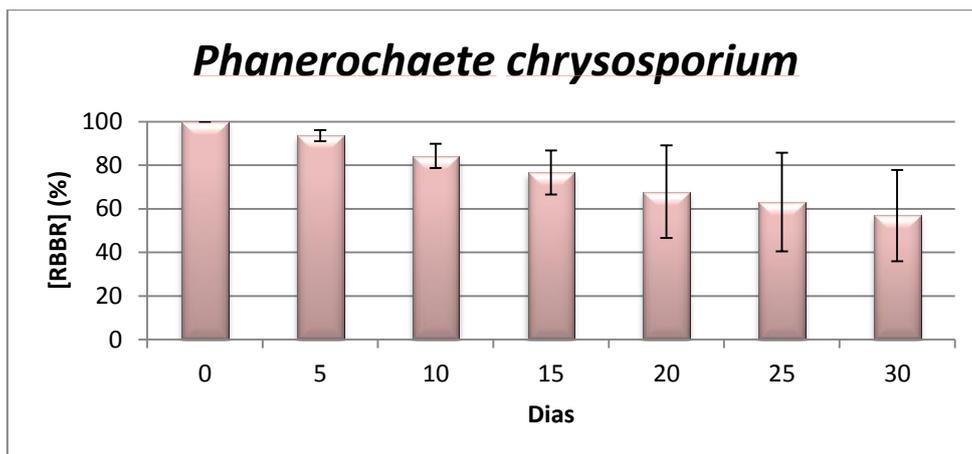


FIGURA 4.28 - Degradação de RBBR por *Phanerochaete chrysosporium* durante 30 dias.

O fungo *Aspergillus fumigatus* degradou em média 58% do corante durante os 30 dias de experimento (FIGURA 4.29). Esta espécie de fungo de podridão marrom apresentou uma taxa de degradação acelerada nos primeiros quinze dias de experimento com relação aos últimos quinze dias.

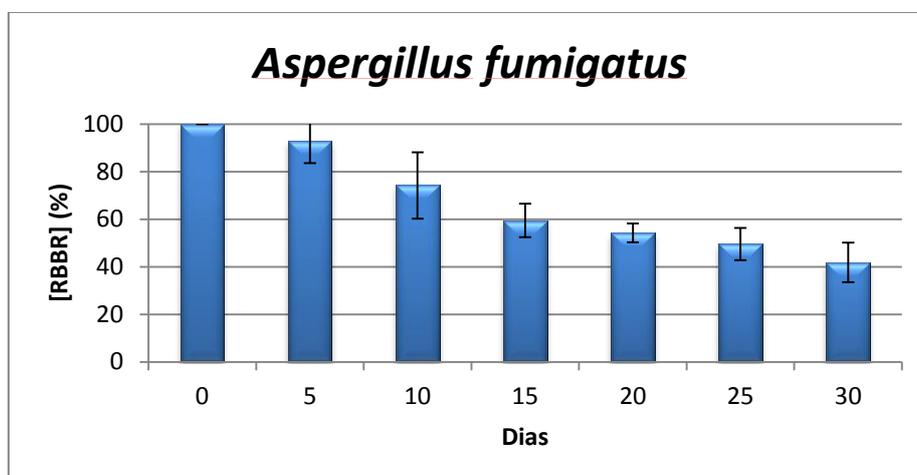


FIGURA 4.29 - Degradação de RBBR por *Aspergillus fumigatus* durante 30 dias.

Para o fungo *Aspergillus aculeatus*, pode-se observar uma degradação de, em média, 82% do corante após trinta dias de cultivo (FIGURA 4.30). Esta espécie apresentou uma taxa de degradação similar nas amostras de cinco e dez dias, sendo observada uma significativa diminuição da concentração de corante no meio de cultura após quinze dias. Este efeito pode ser decorrente do fato de enzimas com capacidade lignolítica, indicadas como sendo as ferramentas utilizadas pelos micro-organismos para a degradação dos xenobióticos serem produzidas em

maior quantidade pelo metabolismo secundário dos fungos em certas situações de restrições de nutrientes (RAO *et al.*, 2005).

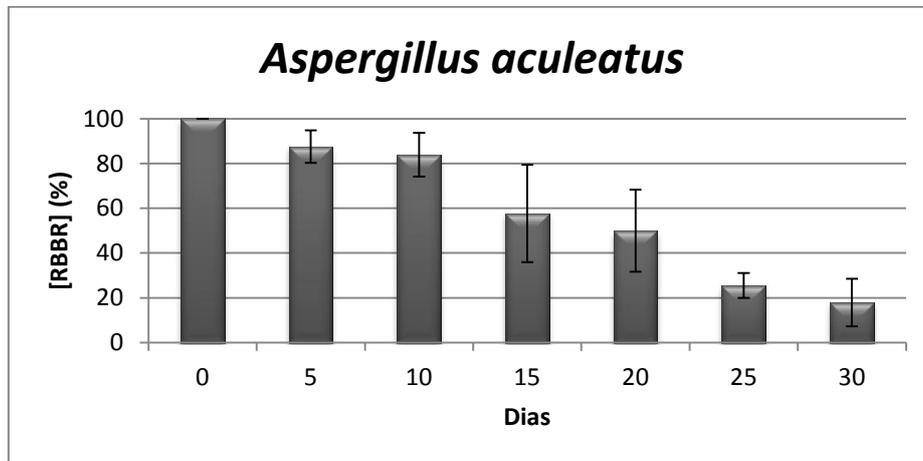


FIGURA 4.30 - Degradação de RBBR por *Aspergillus aculeatus* durante 30 dias.

O fungo *Aspergillus flavus* foi o que apresentou a maior taxa de degradação entre os micro-organismos testados neste experimento, com uma degradação superior a 99% após trinta dias de cultivo (FIGURA 4.31). Nos dez primeiros dias as amostras apresentaram uma taxa de degradação constante, porém pode-se observar uma grande diminuição na concentração de corante nas amostras com quinze dias, o que suporta ainda mais a ideia de que as enzimas que são atuantes na degradação deste tipo de xenobiótico são enzimas que obedecem a condições de metabolismo secundário extremamente definidas. Seguindo um alto padrão de degradação, algumas amostras retiradas com vinte dias de cultivo apresentavam concentrações de RBBR abaixo do LOQ, sendo definidas apenas qualitativamente. Para as amostras de vinte e cinco dias de cultivo, apenas uma pode ser situada entre o LOQ e LOD, e nas últimas amostras da série todas as replicatas apresentam concentrações de RBBR abaixo do LOD, de $3,0\text{ng.mL}^{-1}$.

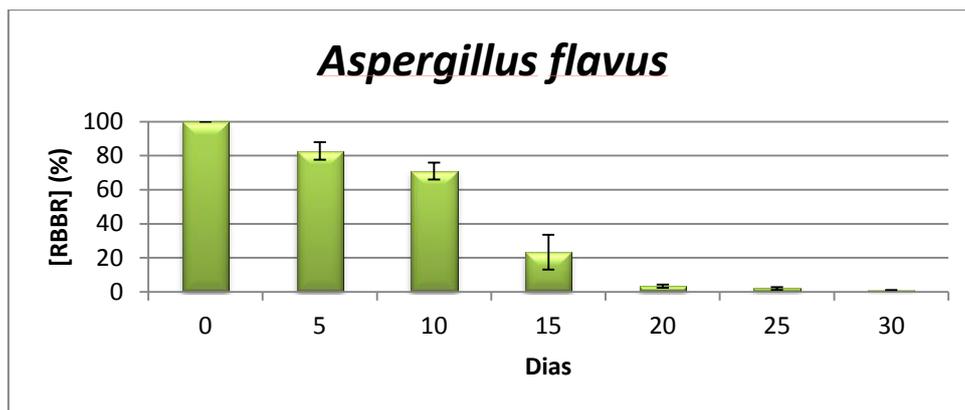


FIGURA 4.31 - Degradação de RBBR por *Aspergillus flavus* durante 30 dias.

Desta maneira, pode-se observar uma capacidade de degradação diferente para cada micro-organismo testados, o que nos leva a suportar a ideia de que a degradação do corante pelos micro-organismos se deve a existência de enzimas de baixa especificidade capazes de produzirem reações bioquímicas em moléculas exógenas à seu metabolismo. A FIGURA 4.32 apresenta um resumo dos resultados de degradação do corante pelas espécies, mostrando como ocorreu a variação da concentração média do corante em meio de cultura, após intervalos de cinco dias.

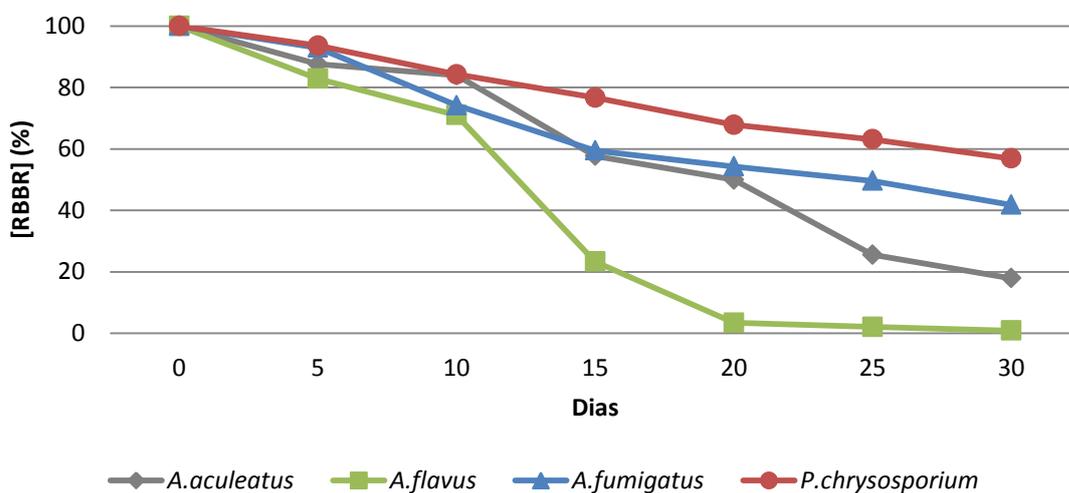


FIGURA 4.32 – Eficiência de degradação dos fungos durante 30 dias.

4.3.4 – Identificação de possíveis produtos de degradação e proposta de mecanismo de degradação

Com a avaliação quantitativa da capacidade microbiana de degradação feita, as amostras do fungo *Aspergillus flavus* foram selecionadas para a inspeção minuciosa a procura de produtos de degradação do corante, na tentativa de identificar a rota metabólica realizada pelo fungo, bem como associar possíveis enzimas associadas ao processo.

Utilizando a metodologia descrita foi possível identificar sinais em unidades de massas específicas que apresentaram proporções comparativamente diferentes entre as amostras e o controle. Também foi observada uma variação temporal destes sinais nas amostras analisadas, como mostra a FIGURA 4.33.

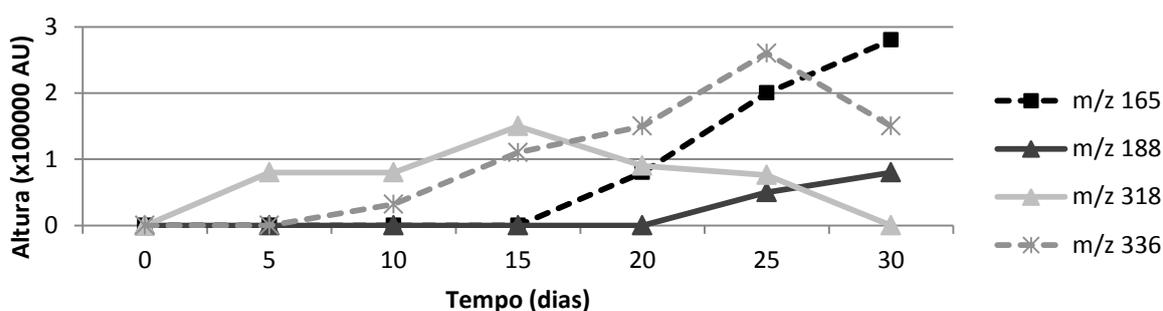


FIGURA 4.33 – Comportamento dos íons monitorados nas amostras de *Aspergillus flavus* durante os 30 dias de experimento.

A formação do íon m/z 318 pode ser observada a partir da segunda amostra, com tempo de retenção no cromatograma de 13 minutos. Este íon também foi identificado nas amostras posteriores, com exceção da última amostra com trinta dias de cultivo. Os XICs referentes ao íon selecionado evidenciando a presença do composto e mostrando a diferença entre a amostra e o controle estão dispostos na FIGURA 4.34. OSMA *et al.* (2010) e HADIBARATA *et al.* (2012), trabalhando com biodegradação de RBBR, identificaram um subproduto por ESI-MS no modo positivo com m/z 342, caracterizando como a molécula 1-amino-9,10-dioxo-9,10-diidroantraceno-2-sulfonato de sódio, derivado da oxidação da cadeia lateral do RBBR, na forma $(M+Na+H)^+$. Para a ionização no modo negativo, pode-se esperar a presença desta molécula na forma $(M)^-$, com m/z 318. Desta forma, confirmou-se a existência do mesmo produto de degradação observado pelos autores.

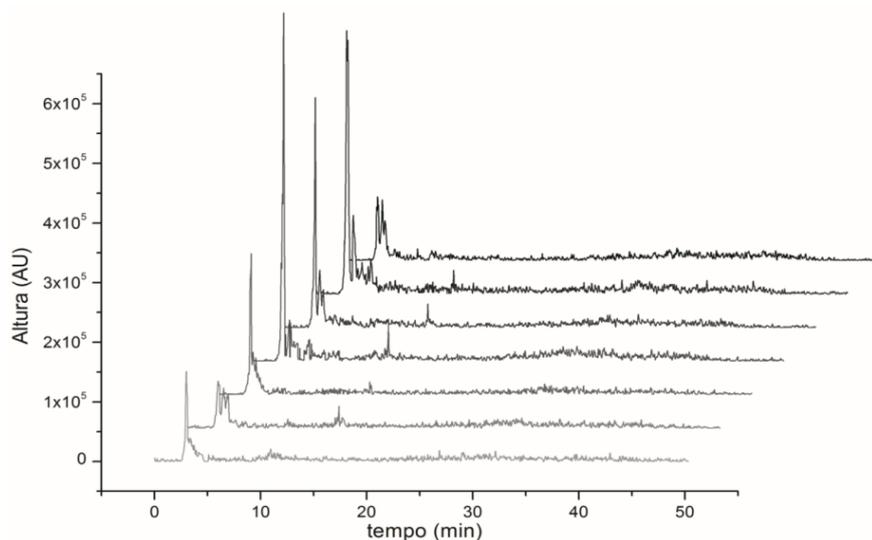


FIGURA 4.34 - XIC (m/z 318) das amostras de RBBR degradadas por *Aspergillus flavus*, durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.

Pode ser observada a existência do íon m/z 336 a partir da terceira amostra, com dez dias de cultivo e tempo de retenção em torno de 8,5 minutos. Este íon apresenta um padrão crescente durante o decorrer das amostras, com um declínio na última amostra (FIGURA 4.35). FUJII *et al.* (1988) descreveram a oxidação de anéis antraquinônicos como a questina, molécula presente no metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, através de uma enzima conhecida como questina monooxigenase (COUCH e GAUCHER, 2004). Também é conhecida a existência de outros tipos de monooxigenases atuantes na biossíntese de aflatoxinas (Yabe *et al.*, 1991; YU *et al.*, 2002), conjunto de micotoxinas extremamente tóxicos produzidos por espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. OSMA *et al.* (2010) identificaram um subproduto da degradação de RBBR por laccase de m/z 343 por ESI-MS modo positivo, caracterizando este produto como a porção antraquinônica do corante com uma das carbonilas oxidada a carboxila, com abertura do anel tricíclico. Logo uma possível explicação para este íon pode ser decorrente da oxidação do anel antraquinônico por enzimas oxidantes formando o ácido 2-(2-amino-3-sulfonil-5-hidroxibenzoil) benzóico.

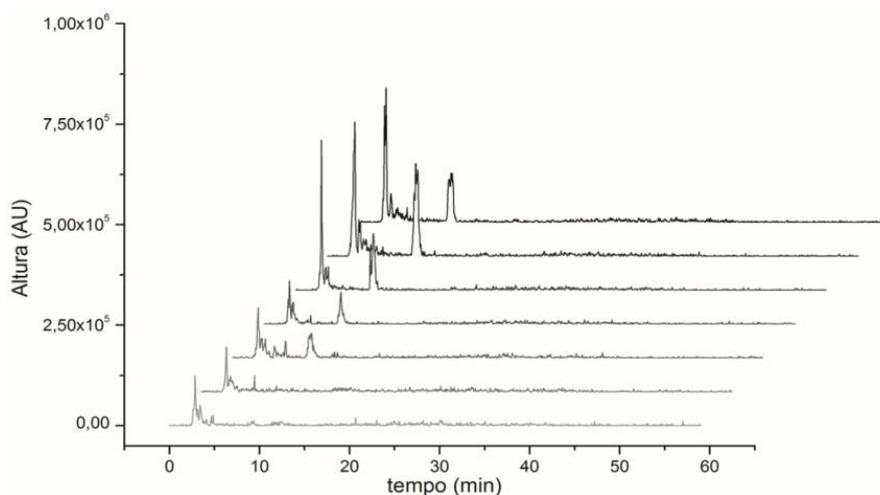


FIGURA 4.35 - XIC (m/z 336) das amostras de RBBR degradadas por *Aspergillus flavus*, durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.

A formação de um íon de m/z 165 é facilmente observada a partir de 20 dias em torno de 29,5 minutos de retenção, e apresenta um aumento na intensidade do sinal com o passar do tempo (FIGURA 4.36). SUGANO *et al.* (2009) observou a formação de ácido *o*-ftálico em solução contendo um corante antraquinônico usando uma peroxidase isolada do basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris*. ANDLEEB *et al.* (2011a, 2011b) observou a formação de ácido *o*-ftálico na degradação de um corante antraquinônico em cultura de *Aspergillus flavus* em concentrações elevadas, indicando a fragmentação dos intermediários formados. Ademais, o aumento de intensidade do sinal se correlaciona com a diminuição dos produtos acima. Desta maneira, definimos o sinal observado como a molécula de ácido *o*-ftálico. KRISHNAN *et al.* (2004) observou o acúmulo de ácido *o*-ftálico em culturas de *Pseudomonas* sp. após incorporação de fenantreno, indicando o mesmo como um produto de “beco-sem-saída”, devido a incapacidade do micro-organismo de posterior degradação. A presença do mesmo produto de degradação tanto para RBBR quanto para o fenantreno é mais um indício de que o corante pode ser utilizado como um indicador para seleção de micro-organismos capazes de promover a degradação de compostos de maior importância ecotoxicológica. Outra observação de ácido *o*-ftálico em degradação de RBBR foi feita por FANCHIANG e TSENG (2009), através de reações de ozonação.

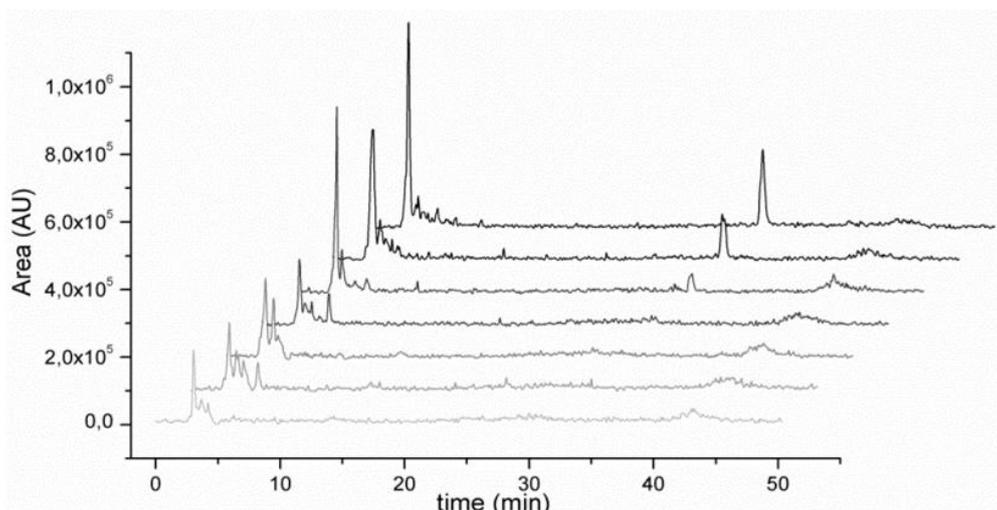


FIGURA 4.36 - XIC (m/z 165) das amostras de RBBR degradadas por *Aspergillus flavus*, durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.

Um sinal de m/z 188 foi observado em pequenas concentrações, obedecendo a mesma variação do produto identificado como ácido o-ftálico (FIGURA 4.37). Seguindo a rota metabólica proposta até então, a separação dos dois anéis benzênicos do intermediário de m/z 336 forneceria como produtos o ácido o-ftálico, e o ácido 2-amino-5-hidroxibenzenosulfônico, de m/z 188.

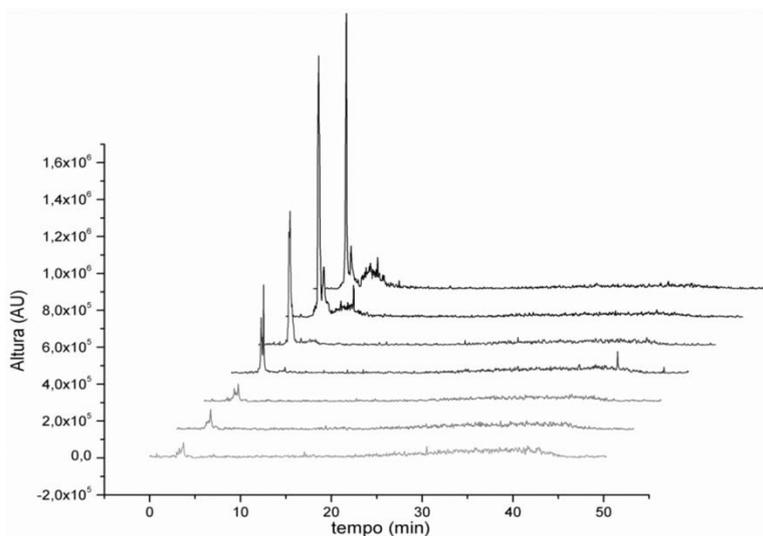


FIGURA 4.37 – XIC (m/z 188) das amostras de RBBR degradadas por *Aspergillus flavus*, durante 30 dias de experimento. Cada cromatograma representa uma amostra, coletadas em intervalos de 5 dias.

Sendo assim, a partir das massas obtidas, os relatos da literatura sobre transformações similares e a variação temporal das amostras observadas, foi proposto o mecanismo da degradação do corante RBBR pelo fungo *Aspergillus flavus*, como mostra a FIGURA 4.38

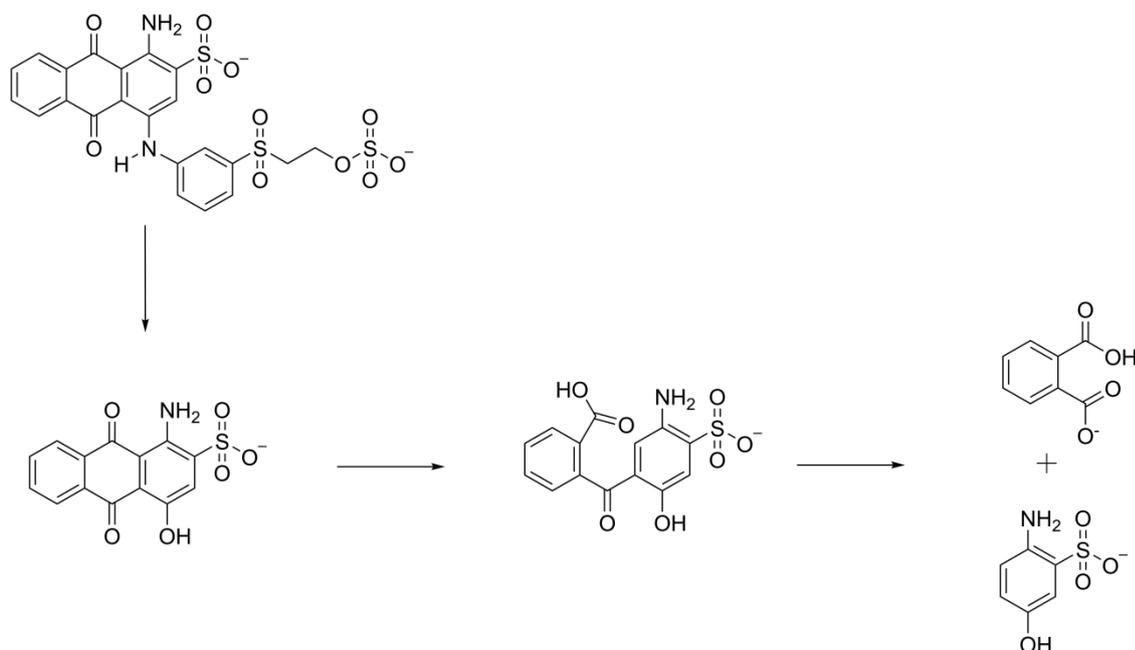


FIGURA 4.38 – Proposta do mecanismo de degradação do corante RBBR pelo fungo *Aspergillus flavus*.

4.4 – Análise Quantitativa da degradação de 1,2,3,4-TCDD

A 1,2,3,4-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (1,2,3,4-TCDD) foi escolhida dentre os congêneres de dioxinas disponíveis como molécula modelo para estudos com dioxinas por alguns motivos, como por exemplo já haverem alguns relatos de sua biodegradação por micro-organismos como bactérias (FIELD E SIERRA-ALVAREZ, 2008) e apresentar características físico-químicas semelhantes a seus congêneres de maior toxicidade como a 2,3,7,8-TCDD, sem apresentar tamanha periculosidade. Entretanto, até o presente momento não foi encontrado dados de literatura que mostrem a degradação de 1,2,3,4-TCDD por fungos, o que a torna um candidato ideal para os testes preliminares da capacidade microbiana de degradação de dioxinas.

De fato, esta semelhança estrutural já é aproveitada em outros métodos analíticos, como no uso da 1,2,3,4-TCDD como marcador para avaliação

de eficiência do método ou até mesmo como padrão interno para quantificação de outras dioxinas sendo métodos já bem estabelecidos por agências internacionais (BROWN, 2002; EPA, 2008).

4.4.1- Otimização instrumental e avaliação da capacidade microbiana de degradação da 1,2,3,4-TCDD

Devido ao alto custo geralmente envolvido com as análises de dioxinas pelos métodos convencionais, é desejada uma ferramenta de triagem que forneça um método seletivo/específico, simples, de baixo custo operacional, reprodutível, com baixos limites de detecção e quantificação, preciso e exato. Na busca de um método que atenda estas propriedades para a avaliação da capacidade microbiana de degradação da 1,2,3,4-TCDD, iniciou-se o desenvolvimento do método pelo equipamento de HPLC-APCI-MS.

A primeira escolha foi com relação ao modo de ionização da fonte de APCI. A ionização no modo negativo permite atingir limites de detecção de até três ordens de magnitude menor do que o modo positivo em compostos com grande afinidade eletrônica e/ou sítios de captura de elétrons termais, caso de moléculas aromáticas polialogenadas como as dioxinas (LARAMEÉ *et al.*, 1986). A primeira avaliação foi com relação à capacidade de detecção da dioxina usando o LC-MS, com uma fonte de ionização por APCI. Os parâmetros espectrométricos foram testados através da varredura entre os intervalos de mínimo e máximo estabelecidos sendo primeiramente avaliados os parâmetros dependentes do analito. O resultado ótimo foi definido como aquele que apresentasse a maior intensidade de sinal referente à ionização da 1,2,3,4-TCDD. As faixas de trabalho bem como os valores escolhidos estão descritos na TABELA 4.10.

TABELA 4.10 - Otimização dos parâmetros dependentes do analito 1,2,3,4-TCDD e da fonte de ionização por APCI

Parâmetro	Faixa de trabalho	Amplitude	Valor Ótimo
DP (V)	-1/-200	5	-5
FP (V)	-1/-400	10	-350
EP (V)	-1/-12	1	-8
Horiz ₁ (mm)	0,0	5,0	3,0
Vert ₁ (mm)	0,0	4,0	0,0
Horiz ₂ (mm)	3,5/7,0	0,5	5,5
Vert ₂ (mm)	3,5/7,0	0,5	6,0
CUR (psi)	25/55	10	48
GS1 (psi)	50/70	5	65
GS2 (psi)	15/35	5	15
NC (V)	-3/-8	1	-5
TEM (°C)	300-400	50	350

Com os primeiros parâmetros otimizados, foi realizado um novo experimento de *full scan* do padrão analítico de 1,2,3,4-TCDD, obtendo-se o espectro mostrado na FIGURA 4.39.

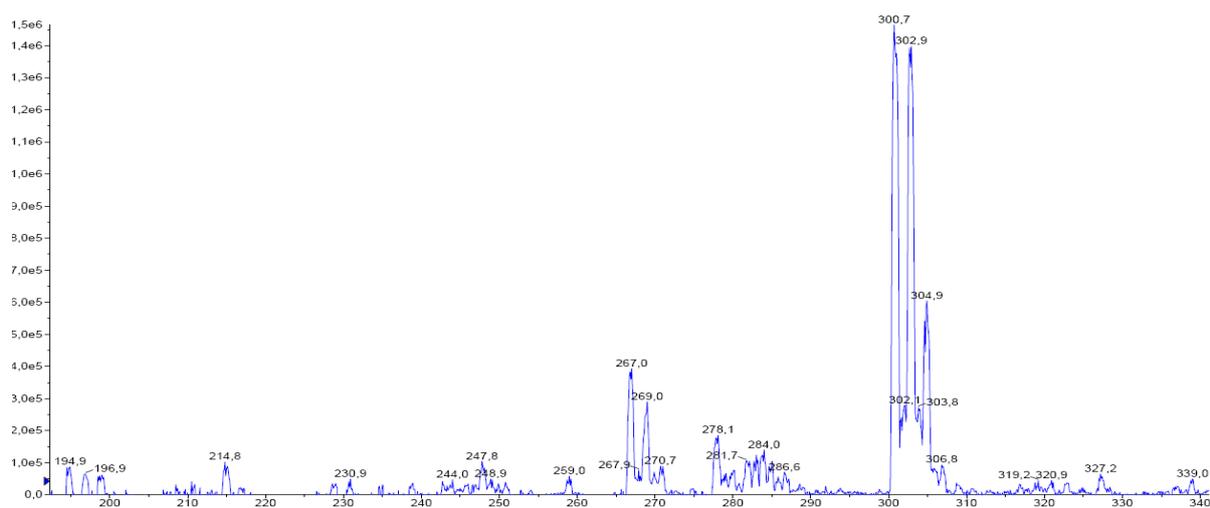


FIGURA 4.39 - *Full scan* da molécula 1,2,3,4-TCDD no modo negativo, usando APCI como fonte de ionização.

Pode se observar os agregados de íons formados pela contribuição isotópica dos átomos de cloro, que conferem a diversos tipos de moléculas cloradas padrões de fragmentações específicos, como disposto na FIGURA 4.40.

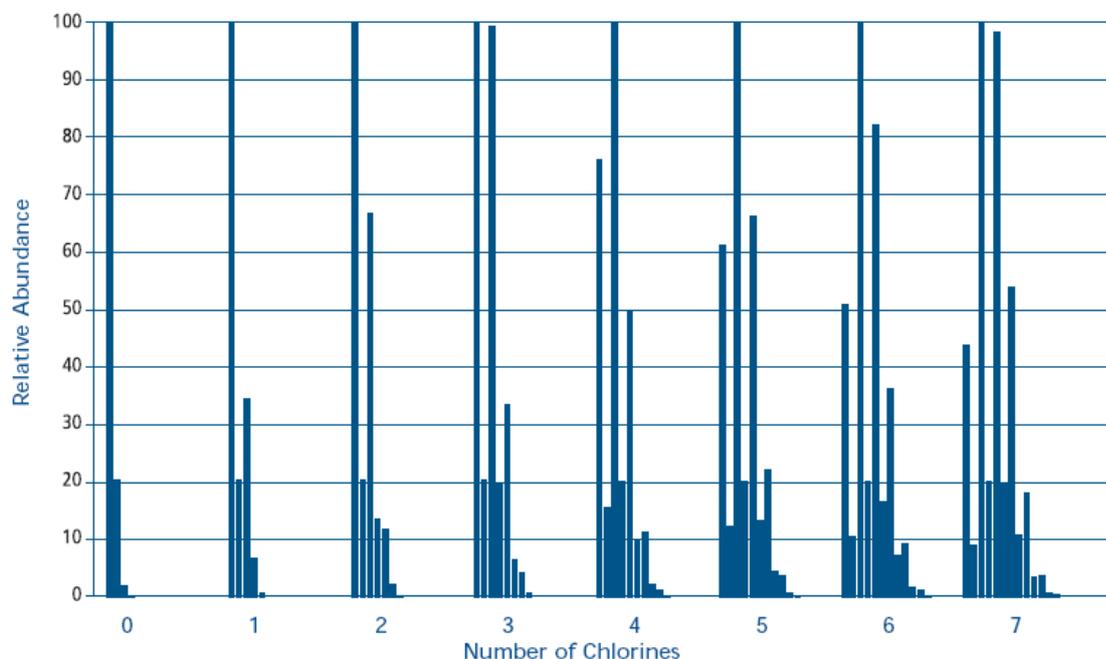


FIGURA 4.40 - Padrão isotópico observado para fragmentos contendo de 0 à 7 átomos de cloro. Fonte Wellington Labs, 2009.

O fragmento mais proeminente observado para a 1,2,3,4-TCDD usando ionização química a pressão atmosférica no modo negativo quando há a existência de traços de oxigênio no sistema é referente à formação do íon $[M-Cl+O]^-$, de m/z 301 (CHERNETSOVA *et al.*, 2002). O padrão de fragmentos, de acordo com a FIGURA 4.40 indica uma molécula com três átomos de cloro em sua estrutura, corroborando com o íon base proposto. Outro agregado evidente apresenta íons de m/z 267 e 269 como os mais proeminentes, com padrão de fragmentação para dois átomos de cloro na estrutura, sendo indicativo da perda de dois átomos de cloro, formando o íon $[M-2Cl+O]^-$ (m/z 267) e seus isótopos.

Após a análise do experimento de *full scan*, um experimento de íons produto (MS^2) para o íon m/z 301 foi realizado, para definir as transições a serem usadas no modo SRM. O modo SRM foi selecionado para ser utilizado nos experimentos de quantificação visto que sua utilização permite o alcance de limites de detecção muito menores quando comparado ao experimento de varredura. Para

tanto, os parâmetros responsáveis pela fragmentação do íon escolhido proveniente do Q1 foram avaliados e otimizados, de acordo com os resultados da TABELA 4.11.

TABELA 4.11 - Parâmetros utilizados na otimização da fragmentação do íon m/z 301 no experimento de íons produto (MS^2).

Parâmetro	Faixa de trabalho	Amplitude	Valor Ótimo
CAD	4/8	1	7
CE	-1/-20	1	-50
CEP	-5/-100	1	-20
CXP	-1/-15	1	-8

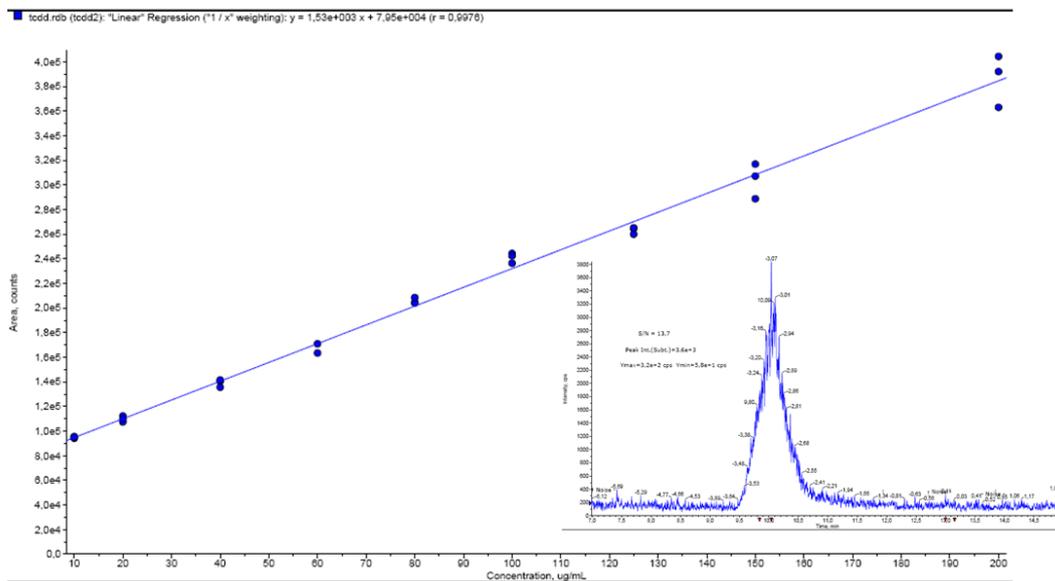
Durante todo o experimento de otimização, a fragmentação da molécula 1,2,3,4-TCDD apresentou apenas o sinal relativo à perda de cloro, logo foi escolhida a transição m/z 301 para m/z 35 como quantificação, e a transição correspondente aos isótopos m/z 303 para m/z 37 como confirmação. Os valores otimizados para o método proposto estão compilados na TABELA 4.12.

TABELA 4.12 - Condições experimentais otimizadas para a análise da 1,2,3,4-TCDD por LC-MS/MS

DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)	NC (V)	TEM (°C)
-16	-270	-3,5	-16	-20	-4	-5	400
Horiz1	Vert1	Horiz2	Vert2	CUR (psi)	CAD (psi)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
3,0	4,0	0	3,0	25	4	40	50

Após a escolha das transições para o modo SRM e a otimização instrumental, uma curva de calibração foi construída, para avaliação de linearidade e limites de quantificação e detecção. Foi observada uma boa linearidade para o analito na faixa de trabalho escolhida, entre 10 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, apesar das características favoráveis ao uso do APCI como fonte de ionização, o método proposto apresentou um sinal com baixa resolução e com sinais de alargamento da banda cromatográfica, que diminui sua altura e acarreta em elevados valores de LOQ e LOD, devido à baixa relação entre a altura do sinal e do ruído (FIGURA 4.41). O sinal correspondente à concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou uma relação S/N

de 13,7, bem próximo ao valor de LOQ usado como parâmetro na determinação do limite (10 vezes a relação entre a altura do sinal analítico e do ruído).



$$y = 1530x + 79500, R^2 = 0,998$$

FIGURA 4.41 - Curva de calibração construída para a 1,2,3,4-TCDD, com a equação de regressão linear e seu coeficiente de correlação.

Na busca de um método de maior sensibilidade de calibração e um menor LOD, foram realizados experimentos por GC-MS para avaliar se seria possível obter uma resposta analítica mais eficiente. O primeiro experimento consistiu na avaliação da fragmentação da molécula, observada através de um experimento de *full scan*. A FIGURA 4.42 apresenta o espectro obtido.

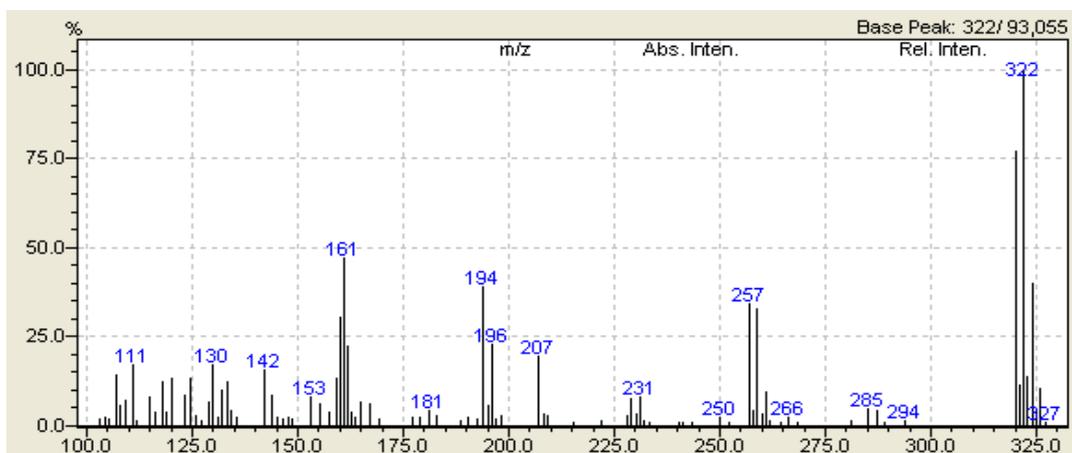


FIGURA 4.42 - Fragmentação para a molécula 1,2,3,4-TCDD por GC-MS usando uma fonte de EI+.

Dentre os sinais observados, os que apresentam agrupamentos em m/z 161, 194 e 257 são sinais característicos descritos para o reconhecimento de moléculas da classe das PCDDs (POHLAND E YANG, 1972; BUSER, 1977). O conjunto de sinais mais intenso corresponde ao agrupamento contendo o íon molecular $[M]^+$, de m/z 320, além de m/z 322 $[M+2]^+$, m/z 324 $[M+4]^+$ e m/z 326 $[M+6]^+$, porém como pode ser observado na FIGURA 4.40 para agrupamentos de sinais de moléculas contendo 4 átomos de cloro, o sinal mais intenso é referente ao isótopo $[M+2]^+$, de m/z 322, devido à distribuição isotópica dos átomos de cloro presentes na estrutura. O agrupamento de fragmentos $[M-63]^+$ com sinais em m/z 257, 259 e 261 correspondem a perda de uma porção $COCl$ pelo agregado de íons de m/z 320-326, podendo ser a perda de $[M-COCl^{35}]^+$ ou $[M-COCl^{37}]^+$. Outro agrupamento de fragmentos $[M-126]^+$ em m/z 194 e 196 corresponde a perda de 2 unidades $COCl$ pelos íons m/z 320-326, sendo este tipo de fragmentação exclusivo de PCDDs e PCDFs (REINER *et al.*, 2006). Pode ser observado nos agrupamentos m/z 257-261, e m/z 194 e 196 a distribuição isotópica para 3 e 2 átomos de cloro respectivamente, corroborando com as estruturas propostas. Outro agrupamento de fragmentos característicos de TCDDs são os que se encontram entre m/z 160 e 162, tendo em m/z 161 o sinal de maior intensidade. Este agrupamento apresenta um padrão de contribuição isotópica similar ao descrito para 4 átomos de cloro porém com incrementos unitários de massa ao invés de incrementos a cada 2 unidades de m/z . Este agrupamento representa a dupla ionização $[M]^{2+}$ da molécula de 1,2,3,4-TCDD, o que explica a mesmo padrão de intensidade porém com incrementos com metade da massa observada.

O limite de quantificação observado para este tipo de análise foi similar ao observado para a análise por HPLC-MS/MS no modo SRM. Uma nova série de injeções de diluições sucessivas de uma amostra padrão de 1,2,3,4-TCDD foi realizada, desta vez para estimar o limite de operação do aparelho no modo SIM, através do monitoramento do íon de m/z 322.00, observado como o mais intenso na fragmentação da molécula no experimento de *full scan*. A análise por GC-MS no modo SIM se mostrou muito mais sensível, apresentando sinais mais simétricos, e um limite de detecção extremamente inferior, cerca de três ordens de magnitude (FIGURA 4.43).

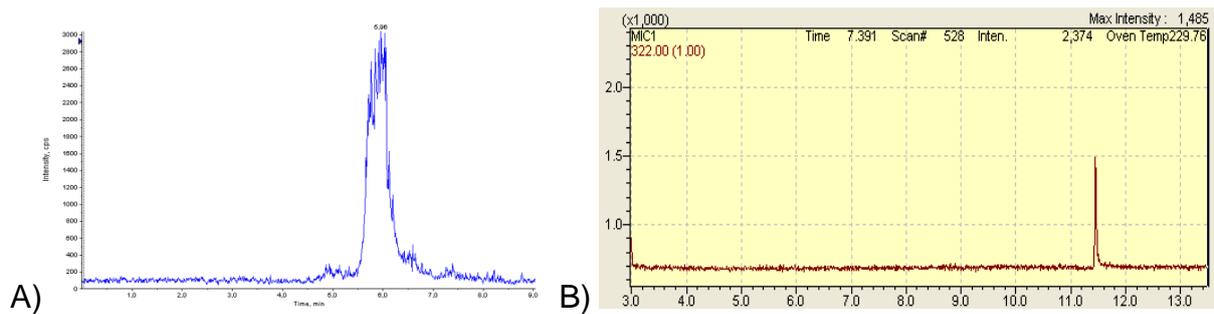


FIGURA 4.43 - Comparação entre cromatogramas de 1,2,3,4-TCDD obtidos por: A) LC-MS/MS ($20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e B) GC/MS ($20\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Geralmente a calibração por padrão externo em GC-MS se torna imprecisa, devido ao erro associado ao diminuto volume de análise e injeção, a curva de calibração foi construída utilizando-se 1,2,4,5-tetraclorobenzeno como padrão de referência interno, sempre na concentração de $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O uso do padrão interno serve para corrigir eventuais erros de injeção de amostra, pois a quantificação é feita através da razão entre a área do analito e do padrão interno.

Foi feito um experimento de *full scan* usando uma solução padrão para avaliar a fragmentação da molécula, a fim de escolher o íon do 1,2,4,5-tetraclorobenzeno de maior intensidade para ser utilizado no modo SIM, sendo escolhido o íon de m/z 216.00 de acordo com a FIGURA 4.44 A). Podemos observar o padrão de fragmentação da molécula de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno com um agrupamento em $[M-35]^+$ referente à perda de um átomo de cloro. A FIGURA 4.44 B) apresenta um exemplo de um cromatograma obtido no modo SIM contendo o analito e o padrão interno.

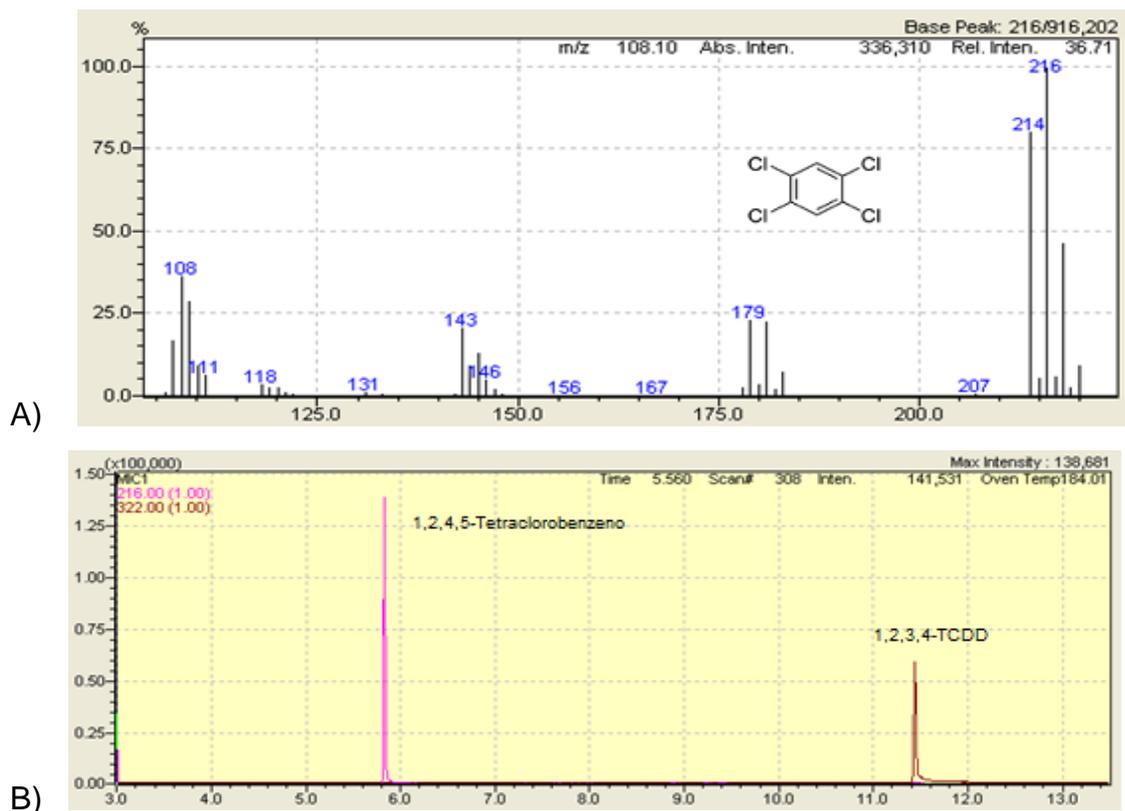
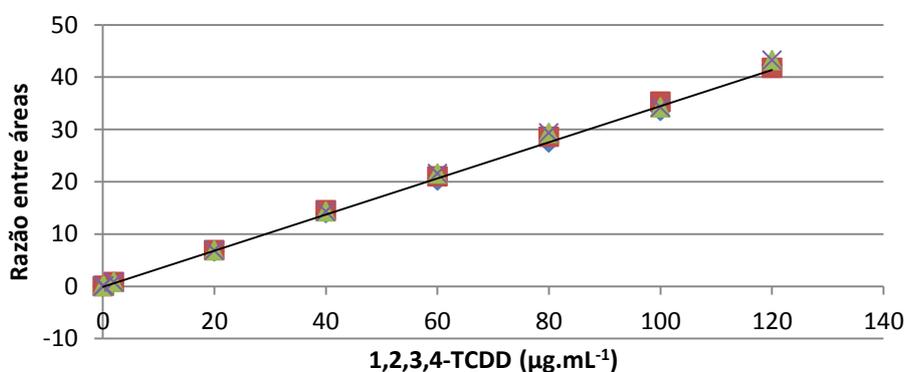


FIGURA 4.44 - A) Fragmentação obtida para a molécula 1,2,4,5-tetraclorobenzeno. B) Cromatograma de GC-MS no modo SIM obtido após a injeção de uma solução padrão de 1,2,3,4-TCDD em concentração de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dopada com 1,2,4,5-tetraclorobenzeno na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A curva de calibração mostrou linearidade o por toda a faixa de concentração testada, de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada ponto da curva foi avaliado em triplicata, obtendo-se a curva como mostra a FIGURA 4.45.



$$y = 0,35065x + 0,00368, R^2 = 0,9995$$

FIGURA 4.45 - Curva de calibração para a 1,2,3,4-TCDD por GC-MS, com 1,2,4,5-tetraclorobenzeno como padrão interno.

Para a validação do método analítico, foram analisadas as figuras de mérito como seletividade, eficiência do processo, recuperação, LOQ, LOD, precisão e exatidão (ANVISA, 2003). A seletividade do método foi avaliada a partir da comparação das amostras do branco, obtidas pelo cultivo dos micro-organismos sob as mesmas condições de cultura do experimento, porém com a incorporação de uma alíquota de DMF no lugar da solução de 1,2,3,4-TCDD. Não foi observado nenhum sinal interferente no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse. A FIGURA 4.46 apresenta um exemplo de cromatograma de uma amostra extraída de uma cultura de *Aspergillus flavus* inoculada com 1,2,3,4-TCDD com 30 dias de incubação e seu branco, representando a seletividade observada para todas as amostras analisadas.

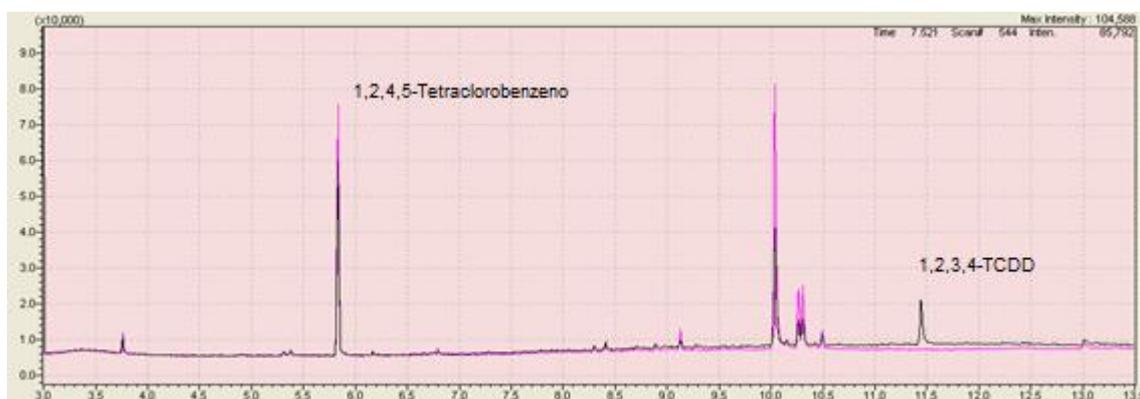


FIGURA 4.46 - Representação da seletividade de método proposto, em uma amostra extraída de meio de cultura de *Aspergillus flavus* incubados durante 30 dias com 1,2,3,4-TCDD. A linha em preto representa a amostra contendo 1,2,3,4-TCDD, e a linha rosa o controle com o fungo porém ausente de dioxina.

Para a avaliação da eficiência do processo, foram analisadas amostras de 1,2,3,4-TCDD em concentrações de 1 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em triplicatas que foram fortificadas e extraídas conforme o processo de extração descrito. As concentrações das amostras extraídas foram comparadas com os sinais produzidos por amostras preparadas por diluição de uma solução padrão de 1,2,3,4-TCDD em água. A FIGURA 4.47 apresenta a sobreposição de amostras obtidas em ambos os tratamentos.

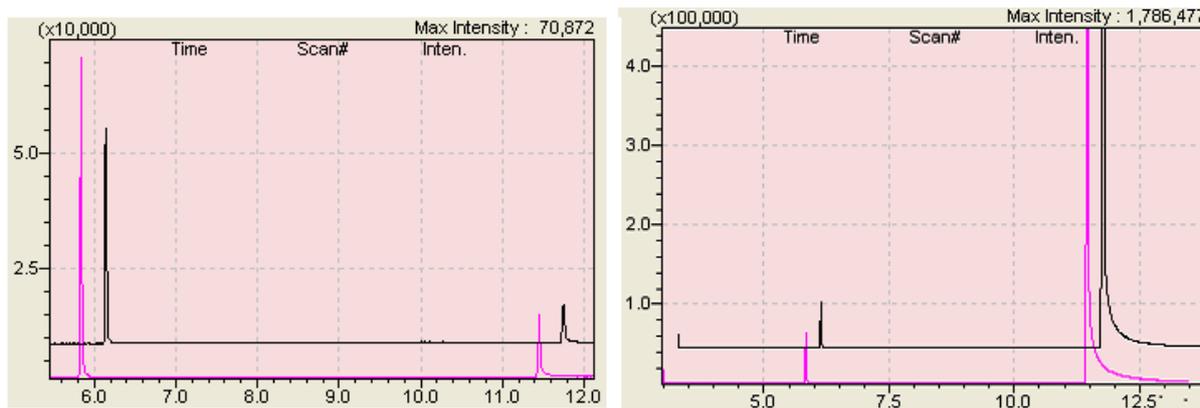


FIGURA 4.47 - Cromatograma de amostras de 1,2,3,4-TCDD de mesma concentração preparadas em meio de cultura BD (rosa) e água (preto) e extraídas com acetato de etila. A) $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ B) $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O traço preto foi deslocada em 0,5 minutos para melhor observação dos picos.

Foi avaliada a variação das amostras utilizadas, bem como a eficiência do processo, calculada através da razão entre os valores de concentração obtidos com as amostras de padrões e os valores obtidos para as amostras extraídas (TRUFELLI *et al.*, 2011). Os valores estão na TABELA 4.13.

TABELA 4.13 - Valores de eficiência do processo de extração obtidos para o experimento*.

Tratamento (Nº de repetições)	Recuperação (%)	RSD (%)
$1 \mu\text{g.mL}^{-1}$		
Amostra Fortificada (3)	99,17	1,47
Solução Padrão (3)	100,48	0,99
Eficiência do Processo	98,69	
$100 \mu\text{g.mL}^{-1}$		
Amostra Fortificada (3)	99,65	0,46
Solução Padrão (3)	100,23	0,51
Eficiência do Processo	99,41	

*Os valores correspondem a média de triplicatas.

O LOQ e LOD foram obtidos através de diluições sucessivas de soluções padrão de 1,2,3,4-TCDD até alcançar as razões de 10 e 3 vezes entre o

sinal do analito e o ruído instrumental, como mostra a FIGURA 4.48. Os valores alcançados foram de 10ng.mL^{-1} 2ng.mL^{-1} para LOQ e LOD respectivamente.

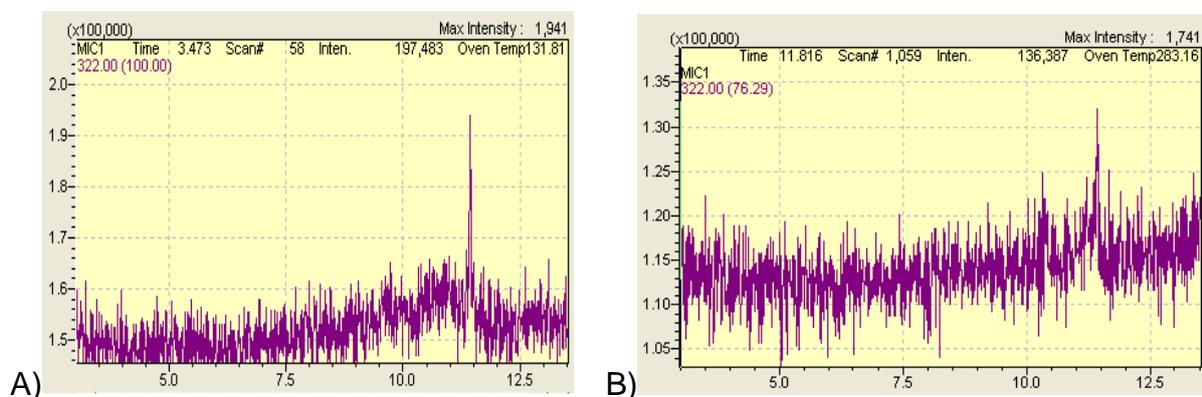


FIGURA 4.48 - Amostras de 10ng.mL^{-1} ($S/N = 9,9$) representando o LOQ (esquerda) e 2ng.mL^{-1} ($S/N = 4,1$) representando o LOD (direita) obtidos para a molécula 1,2,3,4-TCDD por GC-MS no modo SIM (m/z 322.00).

A precisão e a exatidão do método foram avaliados através de soluções de controle de baixa, média e alta concentração (CQB, CQM e CQA respectivamente), com concentrações de 0,025, 50 e 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores obtidos estão dispostos na TABELA 4.14.

TABELA 4.14 - Valores de precisão e exatidão para o método de análise da 1,2,3,4-TCDD avaliado.

1,2,3,4-TCDD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Dia	Repetições	Exatidão (%)	Precisão (%)
Variação Intra dias				
0,025	1	5	97,4	2,94
50	1	5	98,5	2,72
110	1	5	101,3	2,21
0,025	2	5	97,1	5,93
50	2	5	98,0	3,10
110	2	5	100,2	1,45
0,025	3	5	95,7	4,87
50	3	5	97,8	2,74
110	3	5	99,5	1,35
Variação Inter dias				
0,025	-	15	96,73	4,73
50	-	15	98,10	2,70
110	-	15	100,33	1,90

Com a construção da curva e a validação do método proposto, partiu-se para a avaliação da capacidade de degradação das dioxinas pelos microorganismos. Antes de cada análise foi adicionado uma solução de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno de concentração $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ em acetato de etila nas amostras extraídas, para se obter a mesma concentração ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) adicionada nas amostras padrões de 1,2,3,4-TCDD usadas para o preparo da curva de calibração por padrão interno.

As amostras provenientes da extração do meio de cultura apresentaram concentrações menores do que esperado (TABELA 4.15), mesmo tendo o método de extração sido considerado eficiente. Ademais, a variação temporal das amostras não seguiu padrões lineares, sendo observadas em amostras intermediárias recuperações superiores às encontradas para as amostras iniciais, o que indica uma variação na concentração de dioxinas no meio devido a outros processos além da possível biodegradação.

TABELA 4.15 Concentrações extraídas das alíquotas retiradas durante o experimento de degradação da 1,2,3,4-TCDD.

t (dias)	[1,2,3,4-TCDD] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Controle
	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>P. chrysosporium</i>	
0	1,39	2,29	0,90	0,93	0,84
5	0,17	2,12	0,58	0,23	0,75
10	0,02	2,22	0,39	0,50	1,08
15	0,02	1,09	0,22	1,04	1,43
20	0,01	1,33	0,42	0,96	1,39
25	ND	1,16	0,18	0,30	1,40
30	ND	0,89	0,10	0,13	0,63

ND: Não detectado (Abaixo do LOD).

Na FIGURA 4.49 foi avaliada a variação relativa das concentrações de 1,2,3,4-TCDD obtidas nas amostras extraídas do meio de cultura. Alguns pontos podem ser destacados desta avaliação. O primeiro é a menor concentração observada nos pontos obtidos com as amostras retiradas com 30 dias de cultivo, o que aponta uma menor disponibilidade da 1,2,3,4-TCDD no meio de cultura ao final do experimento, indicando a capacidade de remoção deste xenobiótico pelos microorganismos. Entretanto, como também houve uma diminuição da disponibilidade de dioxinas nas amostras do controle, mesmo que em menor proporção, outros

processos podem concomitantemente estar contribuindo para esta redução, como a perda de dioxina por volatilização. É descrito que dioxinas apresentam baixa volatilidade em meio aquoso devido à sua baixa pressão de vapor ($2,75 \cdot 10^{-4}$ Pa), sendo um processo relativamente lento e controlado pela resistência do ar, porém suficiente para ser quantificado (SHIU *et al.*, 1988). Devido a sua maior difusividade em ar do que em água, a presença de dioxinas em grandes quantidades em ambientes aquosos pode favorecer o seu processo de volatilização. PODOLL *et al.* (1986) usaram os valores de difusividade para calcularem o tempo de meia-vida para a 2,3,7,8-TCDD em lagos, observando uma duração de 32 dias para perda de metade da concentração inicial da dioxina por processos naturais, tempo este similar à duração do experimento de degradação realizado. ISENSEE E JONES (1971) observaram uma perda de 2% de 2,3,7,8-TCDD por volatilização em uma solução aquosa aplicada a uma superfície de vidro, mantida em uma estufa por 48 horas a temperatura ambiente.

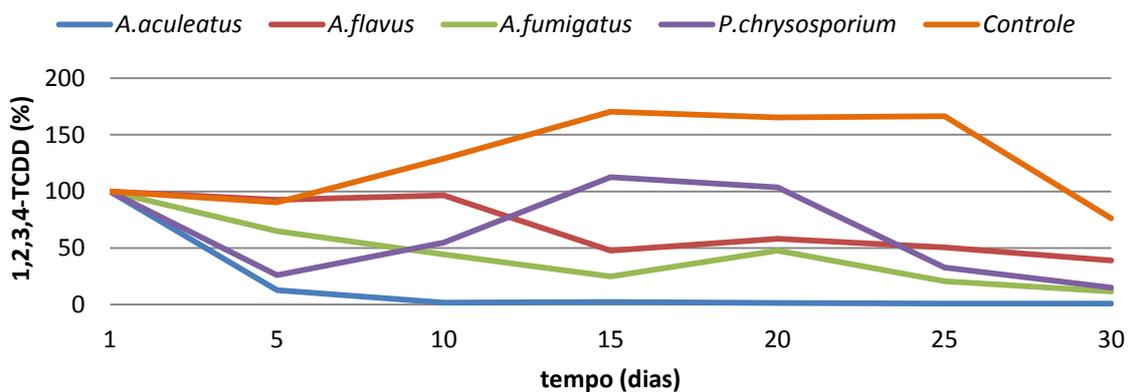


FIGURA 4.49- Variação relativa da quantidade de 1,2,3,4-TCDD em meio de cultura BD inoculado com os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* durante um período de 30 dias.

Outra possibilidade de perda de dioxinas é a fotodegradação. HOSOYA *et al.* (1995) demonstraram a completa degradação em produtos hidrofílicos da 1,2,3,4-TCDD imobilizada em um suporte sólido por luz solar em apenas 6 dias, citando a aceleração do processo em solventes com maior concentração aquosa decorrente da presença de doadores de hidrogênio como a água.

Outro ponto a se destacar é a maior concentração de dioxinas no meio de cultura do experimento de controle, realizado sem a presença de micro-

organismos, quando comparado aos experimentos contendo os fungos durante todo o curso do experimento, indicando que algum processo relacionado com a presença do micro-organismo afeta a distribuição da 1,2,3,4-TCDD no meio de cultura, diminuindo a concentração presente. Além da possível biotransformação do substrato, esta observação pode ser decorrente da adsorção de uma quantidade de dioxina pela massa microbiana, o que não é surpreendente visto que dioxinas são descritas como bioacumuladoras em tecidos vivos, e micélios de fungos filamentosos como os abordados neste trabalho. Em geral, estes micro-organismos apresentam componentes lipídicos como gorduras, ácidos graxos, fosfolipídios, esteróis e alguns outros compostos solúveis em solventes orgânicos (MADAN e THIND, 1998) que poderiam criar uma maior afinidade com as dioxinas do que o meio aquoso devido a baixa solubilidade de dioxinas em água e seu alto coeficiente de partição entre uma fase orgânica e uma fase aquosa (para 1,2,3,4-TCDD: $C_s = 0,63\mu\text{g.L}^{-1}$, $\text{Log } K_{ow} = 6,60$ (SHIU *et al.*, 1988)), diminuindo assim a disponibilidade do xenobiótico nas alíquotas retiradas. ISENSEE e JONES (1975) demonstraram que existe uma alta correlação entre a disponibilidade de TCDD em um ambiente aquoso e a concentração encontrada nos organismos vivos, com uma concentração de 10^3 à 10^4 maior nos organismos vivos do que na água, sugerindo a bioacumulação destas moléculas altamente hidrofóbicas. Outro experimento realizado por HONG *et al.* (2000) demonstrou a adsorção de 1,2,3,4-TCDD pela biomassa de *Bacillus pumilus*, com resultados interessantes visto que as células inativadas por aquecimento apresentaram maior capacidade de adsorção do que as células vivas, sendo este efeito atribuído à falta de controle de permeabilidade na membrana celular inativada e a presença de compostos desconhecidos cuja secreção é promovida pelo aquecimento.

Entretanto, não apenas processos de adsorção micelial são responsáveis pela baixa recuperação do substrato do meio de cultura. Através da avaliação de dados da literatura que possam contribuir para a elucidação do problema encontrado no experimento, foram observados relatos por SHITAMURA *et al.* (2005) de que não só dioxinas como outros compostos aromáticos e/ou altamente hidrofóbicos apresentam tendências de rápida adsorção nos materiais comumente utilizados para realização de experimentos de crescimento microbiano como polipropileno, poliestireno e vidro, sendo este fenômeno observado após poucas horas de exposição do material aos compostos. Mesmo realizando diversos

procedimentos na tentativa de tornar a camada exterior menos susceptível à adsorção como o uso de albumina bovina sérica (BSA), conhecida por bloquear a adsorção de células e proteínas em tubos de plástico, ou através de reações de silanização com diclorodimetilsilano para tornar inerte a superfície do plástico e do vidro os autores não conseguiram recuperar as dioxinas do meio de cultura líquido, mesmo após 2 horas de incubação. Entretanto, a extração com solventes orgânicos como metanol, etanol ou dimetilsulfóxido (DMSO) apresentaram capacidade de extração dos compostos adsorvidos no plástico, com eficiências de até 85%.

Para confirmar a adsorção da 1,2,3,4-TCDD no recipiente de polipropileno utilizado para acondicionar o experimento, uma extração feita com adição de 40mL acetato de etila durante 3 horas a 30°C foi realizada, após a remoção do meio de cultura e da massa microbiana. Também foi realizada a extração exaustiva da biomassa microbiana, submersa em acetato de etila durante 48 horas a 30°C, para verificação da quantidade de dioxinas que havia sido retirado do meio de cultura líquido através da adsorção ao micélio. A concentração de dioxina encontrada adsorvida ao material foram superiores aos encontrados na extração do meio de cultura, porém a maior concentração foi observada na massa microbiana, como mostra a TABELA 4.16.

TABELA 4.16 - Comparação entre a concentração de 1,2,3,4-TCDD encontrada no meio de cultura após 30 dias, no erlenmeyer de polipropileno usado para realização do experimento e na massa micelial.

	[1,2,3,4-TCDD] $\mu\text{g.mL}^{-1}$				
	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>P. chrysosporium</i>	Controle
Meio de cultivo	0,00	0,89	0,09	0,13	0,63
Erlenmeyer	4,63	12,64	18,98	9,07	16,84
Micélio	74,37	83,85	80,95	75,15	-
Total	79,00	97,37	100,02	84,35	17,47

Assim, pode-se explicar a alta eficiência obtida na validação do método de extração realizado com acetato de etila, feita logo após a incubação da dioxina

em meio de cultura no próprio tubo eppendorf usado para o preparo da amostra, pois a dioxina ainda não havia sido adsorvida pelo polipropileno e o solvente orgânico entrou em contato com o plástico, sendo eficiente na remoção de quaisquer moléculas de dioxinas que eventualmente já haviam sido adsorvidas ao plástico. Todavia, com o aumento do período do experimento, em conjunto com o tempo prolongado de exposição da dioxina ao plástico e à massa microbiana, como no caso do experimento realizado durante 30 dias e nas amostras mantidas em tubos eppendorf no freezer, a adsorção provavelmente se tornou preponderante e a disponibilidade da 1,2,3,4-TCDD na amostra de meio de cultura utilizada para extração foi severamente reduzida. Desta maneira, ao retirar uma alíquota do tubo usado para armazenar a amostra no freezer para posterior extração, a quantidade de dioxinas presente na alíquota era dramaticamente reduzida, levando a baixos rendimentos de extração mesmo sendo este procedimento comprovadamente eficiente, através dos testes de validação do método de extração.

Somando-se as extrações feitas no meio de cultivo, no micélio e no erlenmeyer, podemos observar as quantidades apresentadas na Figura 4.50.

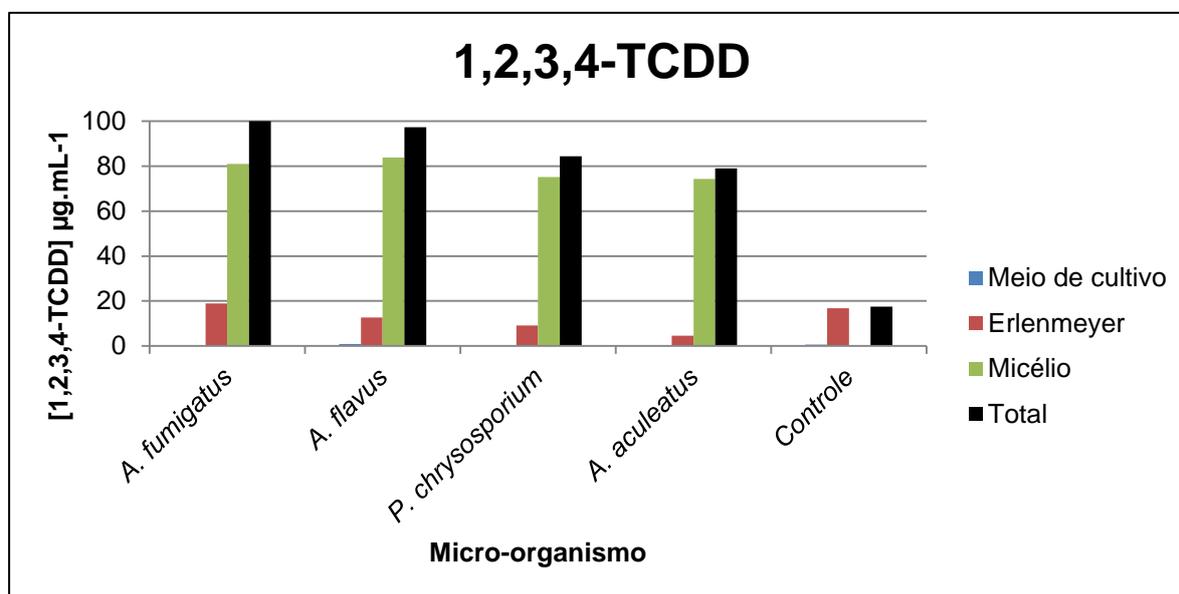


Figura 4.50 – Concentrações de 1,2,3,4-TCDD encontrada nas amostras analisadas.

Como se pode perceber pelos dados apresentados, foram encontradas concentrações de dioxinas nas amostras que se encontram entre 80 e 100% do valor inicial. Os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus aculeatus*

apresentaram alguma capacidade de remoção das dioxinas, sendo observada uma diminuição de 15 e 21% das concentrações iniciais de 1,2,3,4-TCDD respectivamente. Para o fungo *Aspergillus flavus* foi observada uma diminuição de 3% da concentração inicial, enquanto que para o fungo *Aspergillus fumigatus*, toda a dioxina utilizada foi recuperada.

Entre as sugestões para a nova configuração experimental, está o uso de volumes menores de meio, permitindo a montagem do experimento em alíquotas individuais, onde seja possível que a extração de cada alíquota de maneira completa, sendo extraídos os componentes do meio de cultura, da massa microbiana e das paredes do material utilizado para o experimento usando solvente orgânico. Deste modo torna-se possível uma visão mais completa da quantidade de dioxina presente. Da mesma forma, cuidados como a falta de vedação adequada e o uso de lâmpadas que possam promover processos de fotodegradação devem ser evitados, para que não haja a perda de dioxinas por processos indesejados.

4.4.2 – Busca por produtos de degradação e elucidação das rotas metabólicas

A degradação microbiana aeróbica das dioxinas pela ação de enzimas tem como principal alvo a oxidação dos carbonos adjacentes à ligação com o oxigênio, da mesma maneira que atuam na quebra da cadeia polimérica da lignina, gerando como principais subprodutos catecóis e muconatos com padrão de átomos clorados de acordo com a dioxina degradada (FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008). Outros trabalhos também indicam a formação de metabólitos hidroxilados (HARMS *et al.*, 1990; VALLI *et al.*, 1992; MORI e KONDO, 2002). Sendo assim, foi feita a verificação da presença de íons que podem ser decorrentes de moléculas provenientes da rota de biodegradação da dioxina utilizada como substrato. Para confirmação dos íons, os mesmos foram procurados nas amostras de controle, para comprovar que a presença dos íons são exógenas ao metabolismo do micro-organismo e do meio de cultura. Alguns dos possíveis produtos de degradação estão dispostos na FIGURA 4.51, de acordo com modificações realizadas em diversos tipos de dioxinas por diferentes micro-organismos (HARMS *et al.*, 1990; WILKES *et al.*, 1996; HONG *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2004.; FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008).

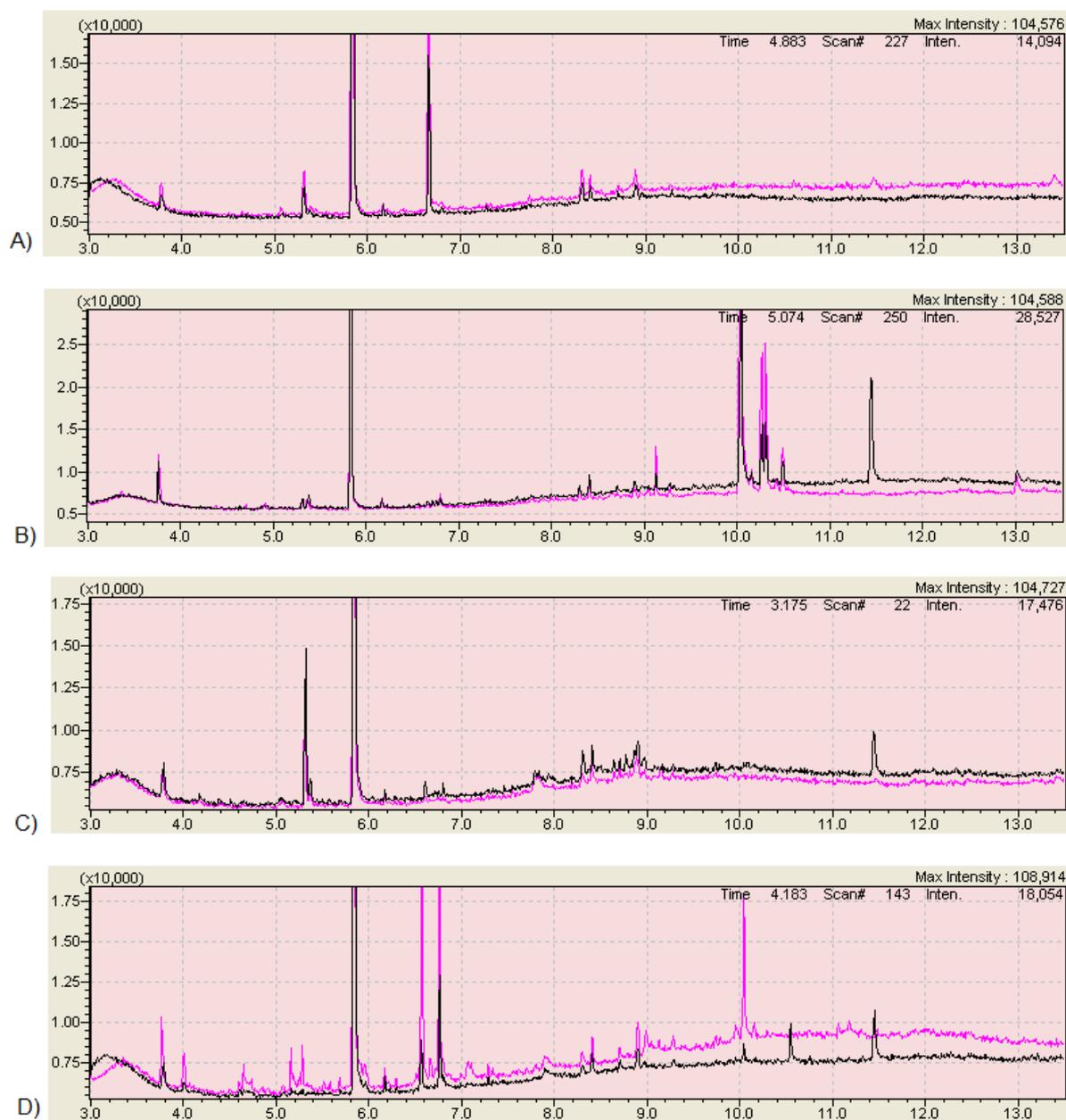


FIGURA 4.52 - Comparação dos cromatogramas obtidos para amostras com 30 dias de cultivo com 1,2,3,4-TCDD (preto) e o controle (rosa) para cada espécie. A) *Aspergillus aculeatus*; B) *Aspergillus flavus*; C) *Aspergillus fumigatus* e D) *Phanerochaete chrysosporium*.

Para as cepas de *Aspergillus*, não foi possível caracterizar nenhum dos sinais observados como potenciais produtos de degradação. Para a amostra de *Phanerochaete chrysosporium*, foi observado um sinal em 10,6 minutos, apresentando um fragmento de baixa intensidade em m/z 102, e um de maior intensidade em m/z 142, compatível com o padrão de fragmentação para a molécula de ácido *cis-cis*-mucônico. Este sinal não foi identificado em nenhuma das amostras

de controle deste micro-organismo, podendo ser um indício da presença de um produto de degradação da 1,2,3,4-TCDD, através do mecanismo proposto na FIGURA 4.53.

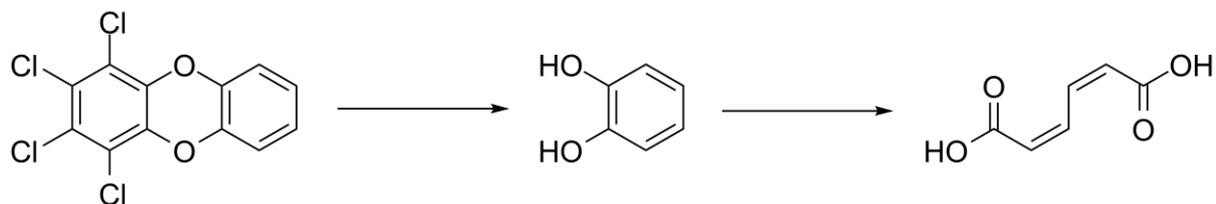


FIGURA 4.53 - Proposta de biodegradação da 1,2,3,4-TCDD pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

5 – Conclusões

O uso do IVCM como indicador do crescimento do micro-organismo aliado a técnicas estatísticas de comparação de médias permitiu avaliar comparativamente a capacidade de crescimento em substratos diferentes provenientes da indústria sucroalcooleira. O método de Scott-Knott permitiu a desambiguidade das médias e a classificação em grupos definidos, mostrando um maior poder de agrupamento entre as médias do que a análise por UPGMA.

Foi desenvolvido e otimizado um método de HPLC-(ESI)-MS/MS no modo SRM para a quantificação do corante RBBR em meio de cultura BD. O pré-tratamento e o *clean-up* da amostra foram eficientemente substituídos pela técnica de *dilute-and-shoot*, o que diminuiu drasticamente o tempo de preparo de amostra. As condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas, possibilitando a detecção de 4,6pM de corante RBBR. A metodologia foi validada e método se mostrou estável, seletivo, linear na faixa de trabalho aplicada ($R^2=0,9995$), sensível (LOQ = 6,0ng.ml⁻¹; LOD = 3,0ng.mL⁻¹), exato (n=15, RSD <3%) e preciso (n=15, RSD <5%).

A avaliação qualitativa da capacidade microbiana de degradação do corante RBBR através de placas meio de cultura sólido incorporadas com corante se mostrou uma ferramenta versátil, pois a capacidade de degradação do corante pelos fungos observada nas placas evoluiu de similar ao método quantitativo de análise da degradação do corante RBBR pelos mesmos micro-organismos em meio líquido, sendo possível o uso do meio sólido como ferramenta de triagem de micro-organismos degradadores do corante RBBR. O fungo *Phanerochaete chrysosporium* apresentou a menor taxa de degradação, de 35% após 30 dias. Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam os melhores resultados, com 61% de degradação por *Aspergillus fumigatus*, 82% por *Aspergillus aculeatus* e >99% por *Aspergillus flavus* após 30 dias de cultivo.

A identificação dos produtos de degradação do corante por HPLC-(ESI)-MS se mostrou uma ferramenta importante na busca pela compreensão do mecanismo atuante na transformação de moléculas orgânicas exógenas ao metabolismo microbiano, como na degradação do corante RBBR pelos fungos testados.

Métodos de análise para 1,2,3,4-TCDD foram desenvolvidos para HPLC-(APCI+)-MS/MS e por GC-MS. O primeiro apresentou boa linearidade na faixa de trabalho aplicada, porém baixa sensibilidade, com LOQ $\approx 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O método por GC-MS se mostrou mais eficiente, com LOQ de $10,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ e LOD de $4,0 \text{ ng.mL}^{-1}$, apresentando ótima linearidade na faixa dinâmica de trabalho entre 0,02 e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R^2=0,9993$). A extração usando acetato de etila se mostrou eficiente, com ótimos resultados de recuperação ($>98\%$). O método foi validado, se mostrando estável, seletivo, sensível, exato ($n=15$, RSD $<3\%$) e preciso ($n=15$, RSD $<5\%$).

A avaliação da capacidade de degradação microbiana da 1,2,3,4-TCDD e a identificação dos possíveis produtos de degradação não apresentaram resultados esperados, devido a fatores como perda por adsorção do componente no material usado como recipiente para acondicionar o meio de cultura incubado e na própria biomassa. Mesmo assim, resultados promissores foram obtidos, como a remoção de até 21% da concentração de dioxinas pelos fungos, como no caso do *Aspergillus aculeatus*. Novos trabalhos no sentido de otimizar o desenho experimental serão necessários para obter resultados mais consistentes.

6 – Referências Bibliográficas

- AB/Sciex. Triple quadrupole power and performance, at a single quadrupole price. 2010. Disponível em http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_039793.pdf. Acessado em 06/03/12
- ADDINK, R. & OLIE, K. “Mechanisms of formation and destruction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in heterogeneous systems”. *Environ. Sci. Technol.*, **29** : 1425–1435, 1995.
- ALMEIDA, F.V.; CENTENO, A.J.; BISINOTI, M.C. & JARDIM, W.F. “Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil”. *Quim. Nova*, **30** (8): 1976-1985, 2007.
- ALTARAWNEH, M.; DLUGOGORSKI, B.Z.; KENNEDY, E.M. & MACHIE, J.C. “Mechanisms for formation, chlorination, dechlorination and destruction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs)”. *Progress in Energy and Combustion Science*, **35**: 245–274, 2009.
- ALTWICKER, E.R.,. “Relative rates of formation of polychlorinated dioxins and furans from precursor and de novo reactions”. *Chemosphere*, **33** (10): 1897–1904, 1996.
- ALVARENGA, R.P. & QUEIROZ, T.R. “Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira”. *2nd international Workshop Advances in Cleaner Production*. São Paulo-SP, 2009.
- ALVES, F.; FERRAZ, J.M.G.; PINTO, L.F.G. & SZMRECSÁNYI, T. *Certificação Socioambiental para a Agricultura: Desafios para o Setor Sucroalcooleiro*. São Carlos, EdUFSCar, 2008, 300p.
- ANDLEEB, S.; ATIQ, N.; PARMAR, A.; ROBSON, G.D. & AHMED, S. “An HPLC method development for the assessment of degradation products of anthraquinone dye”. *Environ. Monit. Assess.* **176** : 597–604, 2011a.
- ANDLEEB, S.; ATIQ, N.; ROBSON, G.D. & AHMED, S. “An investigation of anthraquinone dye biodegradation by immobilized *Aspergillus flavus* in fluidized bed bioreactor”. *Environ. Sci. Pollut. Res.* DOI: 10.1007/s11356-011-0687-x, 2011b.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.
- ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R.; BRUNS, R.E. & CARVALHO, L.R.F. “Dioxins and furans in the atmosphere of São Paulo City, Brazil”. *Chemosphere*, **58**(10): 1391-1398, 2005.
- ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R.; CARVALHO, L.R.F.; NÓBREGA, R.P.; de ABRANTES, R. & SANT’ANA, R.A. “Dioxins and furans in São Paulo city – Brazil: 2006 levels, comparison with 2000-2001 levels, and discussion of potential emission sources”. *Organohalogen Compounds*, **70** : 1518-1521, 2008.
- BEHNISCH, P.A.; HOSOE, K. & SAKAI, S.-I. “Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds — a review of bioassay/biomarker technology”. *Environment International*, **27** : 413–439, 2001.
- BERTONCINI, E.I. “Aspectos ambientais da cadeia do etanol da cana-de-açúcar”. Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo - Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Disponível em http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position_paper_painel4_bertoncini.pdf. Acessado 07/03/12.
- BETTS, W.B. & DART, R.K. “The degradation of lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*”. *Journal of General Microbiology*, **134**(9): 2413-2420, 1988.
- BOOPATHY, R. “Factors limiting bioremediation technologies”. *Bioresource Technology*, **74** : 63-67, 2000.

BORGES, L.C. & FERREIRA, D.F. "Poder e taxas de erro do tipo I dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newman-Keuls sob distribuição normal e não-normal dos resíduos". *Rev. Mat. Estat.*, **21**(1) : 67-83, 2003.

BRASIL. Lei nº 6.894, de 16 de Dezembro de 1980. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 1980. Seção 1. p. 25289.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de Agosto de 1981. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 set. 1981. Seção 1. p. 16509.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de Fevereiro de 1998. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 fev. 1998. Seção 1. p. 1.

BRASIL. Lei nº 9.795, de 27 de Abril de 1999. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 abr. 1999. Seção 1. p. 1.

BRASIL, MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Decreto nº 4954, de 16 de setembro de 2004;

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 ago. 2010a. Seção 1. p. 3.

BRASIL. Decreto nº 7.404, de 23 de Dezembro de 2010. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 dez. 2010b. Seção 1. Edição Extra. p. 63.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 5 de outubro de 1988. Artigo 23º, incisos Vi e VII. Contém as emendas constitucionais posteriores. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRAY, S.C.; FERREIRA, E.R. & RUAS, D.G.G. *As Políticas da Agroindústria Canavieira e o PROALCOOL no Brasil*. Marília, UNESP-Marília Publicações, 2000, p.104.

BRIOIS, C.; RYAN, S.; TABOR, D.; TOUATI, A. & GULLETT, B.K. "Formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans from a mixture of chlorophenols over fly ash: Influence of water vapor". *Environ. Sci. Technol.*, **41** : 850-856, 2007.

BROWN, D.J.; NAKAMURA, M.; CHU, M.D.; DENISON, M.S.; MURATA, H. & CLARK, G.C. "Recovery determinations for bioassay analysis: Considerations and results". *Organohalogen Compounds*, **58** : 357-360, 2002.

BRUNELLI, A.M.M.DO P. & PISANI JR., R. "Proposta de disposição de resíduo gerado a partir da queima do bagaço de cana em caldeiras como fonte de nutriente e corretivo do Solo". *XXX Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Punta del Leste - Uruguai, 2006. v. 1. p. 1-9.

BUMB, R.R.; CRUMMETT, W.B.; CUTIE, S.S.; GLEDHILL, J.R.; HUMMEL, R.H.; KAGEL, R.O.; LAMPARSKI, L.L.; LUOMA, E.V.; MILLER, D.L.; NESTRICK, T.J.; SHADOFF, L.A.; STEHL, R.H. & WOODS, J.S. "Trace chemistries of fire: a source of chlorinated dioxins". *Science*, **210**(4468): 385-390, 1980.

BUSER, H-R. "Determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in environmental samples by high-resolution gas chromatography and low resolution mass spectrometry". *Analytical Chemistry*, **49**(7): 918-922, 1977.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S. & AUST, S.D. "Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54** : 751-758, 2000.

CETESB. Avaliação de Compostos Orgânicos Provenientes da Queima de Palha de Cana-de-Açúcar em Araraquara e Comparação com Medições Efetuadas em São Paulo e em Cubatão - Resultados Parciais. CETESB, São Paulo-SP, 1996.

CETESB. Avaliação de Compostos Orgânicos Provenientes da Queima de Palha de Cana-de-Açúcar em Araraquara e Comparação com Medições Efetuadas em São Paulo e em Cubatão – Relatório Final. CETESB, São Paulo-SP, 2002, 97p.

CHERNETSOVA, E.L.; REVELSKY, A.I.; REVELSKY, I.A.; MIKHASENKO, I.A. & SOBOLEVSKY, T.G. "Determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins,

dibenzofurans, and byphenyls by gas chromatography/mass spectrometry in the negative chemical ionization mode with different reagent gases. *Mass Spectrometry Reviews*, **21** : 373-387, 2002.

CHIU, C.; POOLE, G.; TARDIF, M.; MILES, W. & TURLE, R. "Microwave vs. Soxhlet for the extraction of dioxins and furans from solid samples". *Organohalogen Compounds*, **31** : 175-180, 1997.

CHROMA, L.; MACEK, T.; DEMNEROVA, K. & MACKOVÁ, M. "Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs". *Chemosphere* **49** : 739-748, 2002.

COMMISSION Directive 2002/69/EC of 26 July 2002. *Off. J. Eur. Communities*, **L209**, 2002a.

COMMISSION Directive 2002/70/EC of 26 July 2002. *Off. J. Eur. Communities*, **L209**, 2002b.

CONAB. "Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-Açúcar – 1ª Estimativa - Maio/2011". Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2011^a, 19p.

CONAB. "A Geração Termoelétrica com a Queima do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Brasil Análise do Desempenho da Safra 2009-2010". Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, 2011b, 159p.

CONAMA. Resolução CONAMA nº 316, de 29 de outubro de 2002.

CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO SOBRE POPS, 2001. <http://www.pops.int/>. Acessado em 28/01/2012.

COP3. *Third meeting of the Conference of the Parties (COP) to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Dakar - Senegal, 2007. <http://chm.pops.int/Convention/COP/COPDecisions/tabid/208/Default.aspx> Acessado 30/01/2012.

CORDEIRO, G.C.; TOLEDO FILHO, R.D.; TAVARES, L.M. & FAIRBAIRN, E.M.R. "Pozzolanic activity and filler effect of sugar cane bagasse ash in Portland cement and lime mortars". *Cement and Concrete Composites*, **30** : 410-418, 2008.

CORDEIRO, G.C.; FILHO, R.D.T. & FAIRBAIRN, E.M.R. "Caracterização de cinza do bagaço de cana-de-açúcar para emprego como pozolana em materiais cimentícios". *Quim. Nova*, **32**(1): 82-86, 2009.

COUCH, R.D. & GAUCHER, G.C. "Rational elimination of *Aspergillus terreus* sulochrin production". *Journal of Biotechnology*, **108** : 171-178, 2004.

CORTEZ, L.; MAGALHAES, P. & HAPPI, J. "Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização". *Revista Brasileira de Energia*, **2** : 1-17, 2002.

DAVY, C.W. "Legislation with respect to dioxins in the workplace". *Environment International*, **30** : 219- 233, 2004.

DIAS, M.D.; POZZA, E.A.; DE ABREU, M.S. & MIRANDA, E.O. "Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L1". *Ciênc. agrotec.*, **29**(3): 545-552, 2005.

D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K. & REDDY, C.A. "Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR". *Applied and environmental microbiology*, **62**(10): 3739-3744. 1996.

DWERNYCHUK, L.W.; CAU, H.D.; HATFIELD, C.T.; BOIVIN, T.G.; HUNG, T.M.; DUNG, P.T. & THAI, N.D. "Dioxin reservoirs in southern Viet Nam – A legacy of agent orange". *Chemosphere*, **47** : 117-137, 2002.

EN 1948-1. "Stationary source emissions - Determination of the mass concentration of PCDDs/PCDFs - Part 1: Sampling". 1996a.

EN 1948-2. "Stationary source emissions - Determination of the mass concentration of PCDDs/PCDFs - Part 2: Extraction and clean-up". 1996b.

EN 1948-3. "Stationary source emissions - Determination of the mass concentration of PCDDs/PCDFs - Part 3: Identification and quantification". 1996c.

ERUM, S. & AHMED, S. "Comparison of dye decolorization efficiencies of indigenous fungal isolates". *African Journal of Biotechnology*, **10**(17):3399-3411, 2011.

EVANS, C.S.; HEDGER, J.N. "Degradation of plant cell wall polymers". IN: *Fungi in Bioremediation*. GADD, G.M. (Ed.). Cambridge University Press, 2001, pp. 20.

EVERAERT, K. & BAEYENS, J. "The formation and emission of dioxins in large scale thermal processes". *Chemosphere*, **46** : 439-448, 2002.

FANCHIANG, J.-M. & TSENG, D.-H. "Degradation of anthraquinone dye C.I. Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation". *Chemosphere*, **77** : 214–221, 2009.

FEDOROV, A. L.; "Dioxin problem in Russian chemical industry". *Chemosphere*, **27** : 477-481, 1993.

FERREIRA, D.F. "SISVAR: Um programa para análise e ensino de estatística". *Revista Científica Symposium*, **6**(2): 36-41, 2008. Site para download do programa: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>. Acessado em 28/01/2012.

FIELD, J.A. & SIERRA-ALVAREZ, R. "Microbial degradation of chlorinated dioxins". *Chemosphere*, **71** : 1005-1018, 2008.

FITZGERALD, R.L.; GRIFFIN, T.L.; YUN, T.-M.; GODFREY, R.A.; WEST, R.; PESCE, A.J. & HEROLD, D.A. "Dilute and shoot: Analysis of drugs of abuse using selected reaction monitoring for quantification and full scan product ion spectra for identification. *Journal of Analytical Toxicology*, **36**(2): 106-111, 2012.

FOCANT, J.-F.; EPPE, G. & DE PAUW, E. "Optimisation and use of tandem-in-time mass spectrometry in comparison with immunoassay and HRGC/HRMS for PCDD/F screening". *Chemosphere* **43** : 417-424, 2001.

FOCANT, J.-F.; PIRARD, C. & DE PAUW, E. "Automated sample preparation-fractionation for the measurement of dioxins and related compounds in biological matrices: a review". *Talanta* **63** : 1101–1113, 2004.

FOCANT, J.-F.; PIRARD, C.; EPPE, G & DE PAUW, E. "Recent advances in mass spectrometric measurement of dioxins". *Journal of Chromatography A*, **1067** : 265–275, 2005.

FOCANT, J.-F.; EPPE, G.; MASSART, A.-C.; SCHOLL, G; PIRARD, C & DE PAUW, E. "High-throughput biomonitoring of dioxins and polychlorinated biphenyls at the sub-picogram level in human serum". *Journal of Chromatography A*, **1130** : 97–107, 2006.

FOLTRAN, R. *Aplicação de Cálcario, Silicato e Gesso em Soqueira de Cana-de-Açúcar Sem Despalha a Fogo*. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, 2008. Dissertação de Mestrado, 100p.

FUJII, I.; EBIZUKA, Y. & SANKAWA, U. "A novel anthraquinone ring cleavage enzyme from *Aspergillus terreus*". *J. Biochem.*, **103** : 878–883, 1988.

FULMER, M.E. *Electricity-Ethanol Co-Production From Sugar Cane: A Technical and Economic Assessment*. Princeton, Center for Environmental Studies-Princeton University, 1991. Master of Science in Engineering Dissertation – 317p.

GIRARDI, L.H.; CARGNELUTTI FILHO, A. & STORCK, L. "Erro tipo I e poder de cinco testes de comparação múltipla de médias". *Rev. Bras. Biom.*, **27**(1): 23-36, 2009.

GLENN, J. K. & GOLD, M. H. "Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degradating basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(6): 1741-1747, 1983.

GOMAA, O.M.; EL KAREEM, H.A. & FATHEY, R. "Assessment of the efficacy of brown rot fungi in real textile waste water treatment". *Journal of Biotechnology*, **150S** : S1–S576, 2010.

GOMAA, O.M. & MOMTAZ, O.A.; "Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*". *Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology*. Rhodes Island - Greece, 2011, 367B-375B

GREEN, N.J.L.; HASSANIN, A.; JOHNSTON, A.E. & JONES, K.C. "Observations on historical, contemporary, and natural PCDD/Fs". *Environ. Sci. Technol.*, **38** : 715–723, 2004.

GROSSI, M.G.L. *Avaliação da Qualidade dos Produtos Obtidos de Usinas de Compostagem Brasileiras de Lixo Doméstico, Através de Determinação de Metais Pesados e Substâncias Orgânicas Tóxicas*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química-USP, 1993. Tese de Doutorado - 223p.

GU, H.; DENG, Y.; WANG, J.; AUBRY, A.-N. & ARNOLD, M.E. "Development and validation of sensitive and selective LC–MS/MS methods for the determination of BMS-708163, a γ -secretase inhibitor, in plasma and cerebrospinal fluid using deprotonated or formate adduct ions as precursor ions". *Journal of Chromatography B*, **878** : 2319–2326, 2010.

GULLETT, B.K.; TOUATI, A.; HUWE, J. & HAKK, H. "PCDD and PCDF emissions from simulated sugarcane field burning". *Environ. Sci. Technol.*, **40** : 6228-6234, 2006.

GUO, Y.L.; RYAN, J.J.; LAU, B.P.Y.; YU, M.L. & HSU, C.C. "Blood serum levels of PCBs and PCDFs in Yucheng women 14 years after exposure to a toxic rice oil". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33** : 104–108, 1997.

HADIBARATA, T.; YUSOFF, A.R.M. & KRISTANTI, R.A. "Decolorization and metabolism of anthraquinone-type dye by laccase of white-rot fungi *Polyporus* sp. S133". *Water Air Soil Pollut.*, **223**(2): 933-941, 2012.

HARMS, H.; WITTICH, R.-M.; SINNEWELL, V.; MEYER, H.; FORTNAGEL, P. & FRACKE, W. "Transformation of dibenzo-p-dioxin by *Pseudomonas* sp. strain HH-69". *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(4): 1157-1159, 1990.

HASHIMOTO, S.; WATANABE, K.; NOSE, K. & MORITA, M. "Remediation of soil contaminated with dioxins by subcritical water extraction". *Chemosphere* **54** : 89–96, 2004.

HERNÁNDEZ, J.F.M.; MIDDENDORF, B.; GEHRKE, M. & BUDELMANN, H. "Use of wastes of the sugar industry as pozzolana in lime-pozzolana binders: study of the reactions". *Cement and Concrete Research* **28** : 1525–1536, 1998.

HIRAIISHI, A. "Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilization in bioremediation". *Microbes Environ.* **18** : 105-125, 2003.

HITES, R.A. "Dioxins: An Overview and History". *Environ. Sci. Technol.*, **45** : 16–20, 2011.

HOLČAPEK, M.; JANDERA, P. & PŘIKRYL, J. "Analysis of sulphonated dyes and intermediates by electrospray mass spectrometry". *Dyes and Pigments*, **43** : 127-137, 1999.

HOLČAPEK, M.; VOLNÁ, K. & VANĚRKOVÁ, D. "Effects of functional groups on the fragmentation of dyes in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectra". *Dyes and Pigments*, **75** : 156-165, 2007.

HONG, H.-B.; HWANG, S.-H. & CHANG, Y.-S. "Biosorption of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofurans by *Bacillus pumilus*". *Wat. Res.*, **34**(1): 349-353, 2000.

HONG, H.-B.; CHANG, Y.-S.; NAM, I.-H.; FORTNAGEL, P. & SCHMIDT, S. "Biotransformation of 2,7-dichloro- and 1,2,3,4- tetrachloro-*p*-dioxin by

Sphingomonas wittichii RW1". *Applied and Environmental Microbiology*, **68** : 2584-2588, 2002.

HONG, H-B.; NAM, I-H.; MURUGESAN, K.; KIM, W-M. & CHANG, Y-S. "Biodegradation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-*p*-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. *Biodegradation*, **15** : 303–313, 2004.

HOSOYA, K.; KIMATA, K.; FUKUNISHI, K. & TANAKA, N. "Photodecomposition of 1,2,3,4- and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (tcdd) in water-alcohol media on a solid support". *Chemosphere*, **31**(7): 3687-3698, 1995.

HUANG, H. & BUEKENS, A. "On the mechanisms of dioxin formation in combustion processes". *Chemosphere*, **31**(9): 4099-4117, 1995.

HUNSINGER, H.; KREISZ, S. & VOGG, H. "Formation of chlorinated aromatic compounds in the raw gas of waste incineration plants. *Chemosphere*, **34**(5-7): 1033-1043, 1997.

ISENSEE, A.R. & JONES, G.E. "Absorption and Translocation of Root and Foliage Applied 2,4-Dichlorophenol, 2,7-Dichlorodibenzo-*p*-dioxin, and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin". *J. Agr. Food Chem.*, **19**(6): 1210-1214, 1971.

ISENSEE, A.R. & JONES, G.E. "Distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in aquatic model ecosystem. *Environmental Science and Technology*, **9**(7): 668-672, 1975.

ISHII, K. & FURUICHI, T. "Development of bioreactor system for treatment of dioxin-contaminated soil using *Pseudallescheria boydii*". *Journal of Hazardous Materials* **148** : 693–700, 2007.

ISOSAARI, P.; LAINE, O.; TUHKANEN, T. & VARTIAINEN, T. "Photolysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans dissolved in vegetable oils: influence of oil quality". *Science of the Total Environment*, **340** : 1294–1300, 2005.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2^a ed. (the "Gold Book"). Compilado por McNaught, A. D & Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997. Versão Online - <http://goldbook.iupac.org>, 2006.doi:10.1351/goldbook.

JEWETT, B.N.; RAMALEY, L. & KWAK, J.C.T. "Atmospheric pressure ionization mass spectrometry techniques for the analysis of alkyl ethoxysulfate mixtures". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **10**(6): 529-536, 1999.

JIS K0311: 2005(J), Japanese Standards Association, June 20, 2005.

JURAS, I.A.G.M. "Destinos dos resíduos sólidos e legislação sobre o tema". Nota Técnica da Consultora Legislativa da Área XI: Meio Ambiente e Direito Ambiental, Organização Territorial, Desenvolvimento Urbano e Regional. Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados de Brasília – DF, 2001. Disponível em <http://www2.camara.gov.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/pdf/010371.pdf>. Acessado 07/03/12.

KAMEI, I.; WATANABE, M.; HARADA, K.; MIYAHARA, T.; SUZUKI, S.; MATSUFUJI, Y. & KONDO, R. "Influence of soil properties on the biodegradation of 1,3,6,8-tetrachlorodibenzo-*p*- dioxin and fungal treatment of contaminated paddy soil by white rot fungus *Phlebia brevispora*". *Chemosphere*, **75** : 1294–1300, 2009.

KANG, Y.-S.; YAMAMURO, M., MASUNAGA, S. & NAKANISHI, J. "Specific biomagnification of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in tufted ducks (*Aythya fuligula*), common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) and their prey from Lake Shinji, Japan". *Chemosphere*, **46** : 1373–1382, 2002.

KIGUCHI, O.; SAITOH, K. & OGAWA, N. "Simultaneous extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls from contaminated soil using pressurized liquid extraction". *Journal of Chromatography A*, **1144** : 262–268, 2007.

KIRK, T.K.; LAMAR, R.T. & GLASER, J.A." The potential of white-rot fungi in bioremediation. IN: *Biotechnology and Environmental Science-Molecular Approaches*. Mongkolsuk, S.; Lovett, P.S. & Trempy, J.E. (Eds.) New York, Plenum Press, 1992. 131-138.

KRAUSMANN, F.; GINGRICH, S.; EISENMENGER, N.; ERB, K.-H.; HABERL, H. & KOWALSKI-FISCHER, M. "Growth in global materials use, GDP and population during the 20th century". *Ecological Economics*, **68**(10): 2696–2705, 2009.

KRISHNAN, S.; PRABHU, Y. & PHALE, P.S. "o-Phthalic acid, a dead-end product in one of the two pathways of phenanthrene degradation in *Pseudomonas* sp. strain PP2". *Indian Journal of Biochemistry&Biophysics*, **41** : 227-232, 2004.

KUBÁTOVÁ, A.; ERBANOVA, P.; EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. & SASEK, V. "PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil". *Chemosphere*, **43** : 207-215, 2001.

KULKARNI, P.S.; CRESPO, J.G. & AFONSO, C.A.M. "Dioxins sources and current remediation technologies - A review". *Environment International*, **34** : 139–153, 2008a.

KULKARNI, P.S.; NEVES, L.; AFONSO, C.A.M. & CRESPO, J.G. "Absorption of dioxins using high temperature stable ionic liquids". *Organohalogen Compounds*, **70** : 2036-2038, 2008b.

LARAMEÉ, J.A.; ARBOGAST, B.C. & DEINZER, M.L. " Electron capture negative chemical ionization mass spectrometry of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Analytical Chemistry*, **58** : 2907-2912, 1986.

LATTUADA, R.M. *Avaliação da Metodologia de Detecção de Massas de Baixa Resolução Associado ao Modo MS/MS na Determinação de Dioxinas e Fruanos*. Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Química – UFRGS, 2003. Dissertação de Mestrado, 86 p.

LAWRENCE, R.S. *Dioxins and Dioxin-Like Compounds in the Food Supply : Strategies to Decrease Exposure*. Washigton, The National Academic Press, 2003. Disponível em <http://www.nap.edu/catalog/10763.html>.

LEE, J.-M.; KIM, J.-H.; CHANG, Y.-Y. & CHANG, Y.-S. "Steel dust catalysis for Fenton-like oxidation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins". *Journal of Hazardous Materials* **163** : 222–230, 2009.

LEME, P.R.; SILVA, S.L.; PEREIRA, A.S.C.; PUTRINO, S.M.; LANNA, D.P.D. & FILHO, J.C.M.N. "Utilização do bagaço de cana-de-açúcar em dietas com elevada proporção de concentrados para novilhos nelore em confinamento". *R. Bras. Zootec.*, **32**(6):1786-1791, 2003.

LI, X-D.; ZHANG, J.; YAN, J-H.; CHEN, T.; LU, S-Y. & CEN, K-F. "Effect of water on catalyzed de novo formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofuranos". *Journal of Hazardous Materials*, **A137** : 57–61, 2006.

LIEM, A.K.D. "Important developments in methods and techniques for the determination of dioxins and PCBs in foodstuffs and human tissues". *Trends in Analytical Chemistry*, **18**(7): 499-507, 1999.

LIEM A.K.D.; FURST, P. & RAPPE, C. "Exposure of populations to dioxins and related compounds". *Food Addit. Contam.* **17**(4): 241-59, 2000.

LIN, S.; YANG, Z.; SHEN, Y. & CAI, Z. "LC/MS-based non-targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice". *International Journal of Mass Spectrometry*, **301** : 29–36, 2011.

LIU, Y.; HUANG, J. & ZHANG, X. "Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**(6): 496–500, 2009.

LONGORIA, A.; TINOCO, R. & VÁZQUEZ-DUHALT, R.; “Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds”. *Chemosphere* **72** : 485–490, 2008.

LOZUPONE, C. & KNIGHT, R. “UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities”. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(12): 8228–8235, 2005.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R. & BONONI, V.L.R. “Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi”. *Brazilian Journal of Microbiology*, **36** : 246-252, 2005.

MADAN, M. & THIND, K.S. *Physiology of Fungi*. New Delhi, A.P.H. Publishing Corporation, , 1998, p.126.

MAGUIRE, J. D. “Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour”. *Crop Science*, **2** : 176-177, 1962.

MANJI, S. & ISHIHARA, A. “Screening of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-degrading fungi capable of producing extracellular peroxidases under various conditions”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63** : 438–444, 2004.

MARTÍNEZ-CORED, M.; PUJADAS, E.; DÍAZ-FERRERO, J.; COLL, M.; MARTÍ, R.; BROTO-PUIG, F.; COMELLAS, L. & RODRÍGUEZ-LARENA, M.C. “Fractionation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and planar polychlorinated biphenyls by high performance liquid chromatography on a pyrenyl-silica column”. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364** : 576–583, 1999.

MCCAULEY-MYERS, D.L.; EICHHOLD, T.H.; BAILEY, R.E.; DOBROZSI, D.J.; BEST, K.J.; HAYES II, J.W. & HOKE II, S.H. “Rapid bioanalytical determination of dextromethorphan in canine plasma by dilute-and-shoot preparation combined with one minute per sample LC-MS:MS analysis to optimize formulations for drug delivery”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23** : 825–835, 2000.

MECHICHI, T.; MHIRI, N. & SAYADI, C. “Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*”. *Chemosphere*, **64** : 998–1005, 2006.

Ministry of the Environment, Japan. *The Method Regulated in Regulations of the Law Concerning Special Measures Against Dioxins*. Clause 2, Article 1, Section 4, 2005.

MOREIRA, P.R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F.X. & DUARTE, J.C. “Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via a novel *Bjerkandera* sp. strain”. *Journal of Biotechnology*, **89** : 107–111, 2001

MORI, T. & KONDO, R. “Oxidation of chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran by white-rot fungus, *Phlebia lindtneri*”. *FEMS Microbiology Letters*, **216** : 223-227, 2002.

MORI, T.; NAKAMURA, K. & KONDO, R. “Fungal hydroxylation of polychlorinated naphthalenes with chlorine migration by wood rotting fungi”. *Chemosphere*, **77** : 1230–1235, 2009.

MORIMOTO, K. & TATSUMI, K. “Effect of humic substances on the enzymatic formation of OCDD from PCP”. *Chemosphere*, **34** : 1277-1283, 1997.

NAM I.-H.; KIM, Y.M.; SCHMIDT, S. & CHANG, Y.-S. “Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachloro-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1”. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** :112-116, 2005.

NAM, I.-H.; KIM, Y.-M.; MURUGESAN, K.; JEON, J.-R.; CHANG, Y.-Y. & CHANG, Y.-S. “Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst”. *Journal of Hazardous Materials*, **157** : 114–121, 2008.

NASSER, P.P.; DE SOUZA, S.M.C.; BATISTA, L.R. & MERCER, J.R. “Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de ocratoxina A”. *Ciênc. agrotec.*, **27**(5): 1172-1175, 2003

NAKAMIYA, K.; HASHIMOTO, S.; ITO, H.; EDMONDS, J.S.; YASUHARA, A. & MORITA, M. "Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, *Cordyceps sinensis*". *FEMS Microbiology Letters*, **248** : 17–22, 2005.

NÓBREGA, R.P.; DE ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R. & DE ABRANTES, R. "Dioxin and furan emission evaluation in automotive diesel engines". *Organohalogen Compounds*, **71** : 528-533, 2009.

ÖBERG, T.; BERGBÄCK, B. & FILIPSSON, M. "Catalytic effects by metal oxides on the formation and degradation of chlorinated aromatic compounds in fly ash". *Chemosphere*, **71** : 1135–1143, 2008.

OJANPERÄ, S. "*Drug Analysis Without Primary Reference Standards: Application of LC-TOFMS and LC-CLND to Biofluids and Seized Materials*". Helsinki - Finland, Department of Forensic Medicine, University of Helsinki, 2008. Masters Dissertation, 64p.

OKUYAMA, M.; KOBAYASHI, N.; TAKEDA, W.; ANJO, T.; MATSUKI, Y.; GOTO, J.; KAMBEGAWA, A. & HORI, S. "Enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring toxic dioxin congeners in milk based on a newly generated monoclonal anti-dioxin antibody". *Anal. Chem.*, **76** : 1948-1956, 2004.

OLESZEK-KUDLAK, S.; SHIBATA, E.; NAKAMURA, T.; LI, X-W.; YU, Y-M. & DONG, X-D. "Review of the sampling and pretreatment methods for dioxins determination in solids, liquids and gases". *Journal of the Chinese Chemical Society*, **54** : 245-262, 2007.

OLIE, K.; VERMEULEN, P.L. & HUTZINGER, O. "Chlorodibenzo-*p*-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands". *Chemosphere*, **6** : 455–459, 1977.

OLIVEIRA, J. A. "*Efeito do Tratamento Fungicida em Sementes no Controle de Tombamento de Plântulas de Pepino (Cucumis sativus L.) e Pimentão (Capsicum annum L.)*". Lavras – MG, Mestrado em Fitossanidade – UFLA, 1991. Dissertação de Mestrado, 111 p.

ONOZUKA, D.; HIRATA, T. & FURUE, M. "Relative survival after exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins: A follow-up of Japanese patients affected in the Yusho incident". *Science of the Total Environment*, **409** : 2361–2365, 2011.

ORTEGA, S.N.; NITSCHKE, M.; MOUAD, A.M.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O.; SELEGHIM, M.H.R.; SETTE, L.D. & PORTO, A.L.M. "Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide". *Biodegradation*, **22** : 43–50, 2011.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L. & RODRÍGUEZ-COUTO, S. "Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase". *Bioresource Technology*, **101** : 8509–8514, 2010.

PANT, D. & ADHOLEYA, A. "Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation". *Biodegradation*, **18** : 647–659, 2007.

PARSONS, J.R. & STORMS, M.C.M. "Biodegradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1". *Chemosphere*, **19** : 1297-1308, 1989.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; da SILVA, M. & SETTE, L.D. "Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation". *Marine Pollution Bulletin*, **62** : 364–370, 2011.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A.M. & KIVAISI, A. "Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajorcaju*". *African Journal of Biotechnology*, **10**(50): 10166-10177, 2011

PERAZOLLI, C.; MANCINI, I. & GUELLA, G. "Benzene-assisted atmospheric-pressure chemical ionization: a new liquid chromatography/mass spectrometry approach to the analysis of selected hydrophobic compounds". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19** : 461–469, 2005.

PEREIRA, M.S. "Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): Main sources, environmental behavior and risk to man and biota". *Quim. Nova*, **27**(6): 934-943, 2004.

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; PERINA, F.J.; DE RESENDE, M.L.V. & ALVES, E. "Potencial of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants". *Ciênc. agrotec.*, **35**(1):115-123, 2011.

PIACENTE, F.J. *Agroindústria Canavieira e o Sistema de Gestão Ambiental: o Caso das Usinas Localizadas nas Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico - UNICAMP, 2004.

PIRES, A.M.M. & MATTIAZZO, M.E. "Avaliação da viabilidade do uso de resíduos na agricultura". Circular Técnica nº 19, Embrapa Meio Ambiente, 2008.

PODOLL, R.T.; JABER, H.M. & MILL, T. "Tetrachlorodibenzodioxin: rates of volatilization and photolysis in the environment". *Enviro. Sci. Technol.*, **20** : 490-492, 1986.

POHLAND, A.E.; YANG, G.C. "Preparation and characterization of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20**(6): 1093-1099, 1972.

POLAND, A. & KNUTSON, J.C.. "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22** : 517-554, 1982.

POLAND, A.; KNUTSON, J. & GLOVER, E. "Studies on the mechanism of action of halogenated aromatic hydrocarbons". *Clin. Physiol. Biochem.*, **3** : 147–154, 1985.

PREUD'HOMME, H. & POTIN-GAUTIER, M. "Optimization of accelerated solvent extraction for polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins and benzo-*p*-furans in mineral and environmental matrixes using experimental designs". *Anal. Chem.*, **75** : 6109-6118, 2003.

RÀFOLS, C. & BARCELÓ, D. "Determination of mono- and disulphonated azo dyes by liquid chromatography–atmospheric pressure ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, **777** : 177-192, 1997.

RAO, M.A.; SCELZA, R.; SCOTTI, R.; GIANFREDA, L. "Role of enzymes in the remediation of polluted environments" *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **10**(3): 333- 353, 2010.

REINER, E.J.; CLEMENT, R.E.; OKEY, A.B. & MARVIN, C.H. "Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs". *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**(4): 791-806, 2006.

REINER, E.J. "The analysis of dioxins and related compounds". *Mass Spectrometry Reviews*, **29** : 526– 559, 2010.

RICHTER, V.A.; ROMANNIKOVA, I.V.; KIT, Y.Y. & LITVAK, V.V. "Study of chromatographic behavior of polyhalogenated dioxins in high performance reverse phase liquid chromatography with C-18 phase in water-dioxane systems". *Organohalogen Compounds*, **31** : 38-40, 1997.

RISSARDI JÚNIOR, D.J. & SHIKIDA, P.F.A. "A agroindústria canavieira do Paraná pós-desregulamentação: uma abordagem neoschumpeteriana". *Rev. Econ. Sociol. Rural*, **45**(2): 445-473, 2007.

RODRIGUES, L.H. *Análises de Metabólitos Secundários em Culturas de Pestalotiopsis sp e Aspergillus aculeatus*. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 93 p.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. "Production of laccase and decolouration of the textile dye Remazol Brilliant Blue R in temporary immersion bioreactors". *Journal of Hazardous Materials*, **194** : 297-302, 2011.

ROSSETO, R. "A cultura da cana, da degradação à conservação". *Visão Agrícola*, **1** : 80-85., 2004.

RUZO, L.O. & CLASS, T. "Modern approaches to analysis of pesticide residues in foods and the environment". IN: *Handbook of Pesticide Toxicology*. KRIEGER, R.I. & KRIEGER, W.C. (Eds.) Elsevier, 2001 pp. 676.

RYU, J.-Y.; MULHOLLAND, J.A.; DUNN, J.; IINO, F. & GULLETT, B. "Potential role of chlorination pathways in PCDD/F formation in a municipal waste incinerator". *Environ. Sci. Technol.*, **38** : 5112-5119, 2004.

RYU, J.-H.; MULHOLLAND, J.A.; TAKEUCHI, M.; KIM, D.-H. & HATANAKA, T. "CuCl₂-catalyzed PCDD/F formation and congener patterns from phenols". *Chemosphere*, **61** : 1312-1326, 2005a.

RYU, J.-Y.; MULHOLLAND, J.A.; KIM, D.-H. & TAKEUCHI, M. "Homologue and isomer patterns of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans from phenol precursors: Comparison with municipal waste incinerator data". *Environ. Sci. Technol.*, **39** : 4398-4406, 2005b.

SAFE, S.; BANDIERA, S.; SAWYER, T.; ROBERTSON, L.; SAFE, L.; PARKINSON, A.; THOMAS, P. E.; RYAN, D. E.; REIK, L. M. & LEVIN, W. "PCBs: Structure-function relationships and mechanism of action". *Environ. Health Perspect.*, **60** : 47-56, 1985.

SAFE, S.H. "Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26** : 371-398, 1986.

SALES, A. & LIMA, S.A. "Use of Brazilian sugarcane bagasse ash in concrete as sand replacement". *Waste Management*, **30** : 1114-1122, 2010.

SANCTORUM, H.; ELSKENS, M. & BAEYENS, W. "Bioassay (CALUX) measurements of 2,3,7,8-TCDD and PCB 126: Interference effects". *Talanta*, **73** : 185-188, 2007.

SÃO PAULO. Lei nº11.241, de 19 de Setembro de 2002. Diário Oficial do Estado, São Paulo, SP, 20 set. 2002. Volume 112, número 180, seção 01, p.02

SÃO PAULO. Decisão da Diretoria Plena da CETESB – DD 388/2010/P, de 21 de Dezembro de 2010. Diário Oficial do Estado, São Paulo, SP, 24 dez. 2010. Caderno 1 Executivo p. 59.

SATO, A.; WATANABE, T.; WATANABE, Y.; HARAZONO, K. & FUKATSU, T. "Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin". *FEMS Microbiology Letters*, **213** : 213-217, 2002.

SCHECTER, A.; CRAMER, P.; BOGGESS, K.; STANLEY, J.; PÄPKE, O.; OLSON, J.; SILVER, A. & SCHMITZ, M. "Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population". *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, **63** : 1-18, 2001.

SCHECTER, A.; BIRNBAUM, L.; RYAN, J.J. & CONSTABLE, J.D. "Dioxins: An overview". *Environmental Research*, **101** : 419-428, 2006.

SCHREINER, G.; WIEDMANN, T.; SCHIMMEL, H. & BALLSCHMITER, K. "Influence of the substitution pattern on the microbial degradation of mono- to tetrachlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans". *Chemosphere*, **34** : 1315-1331, 1997.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M.A. "A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance". *Biometrics*, **30**(3): 507-512, 1974.

SILVA, E.C. *Avaliação do Poder e Taxas de Erro Tipo I do Teste de Scott-Knott por Meio do Método de Monte Carlo*. Lavras, Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação Agropecuária – UFLA, 1998. Dissertação de Mestrado.

SINKKONEN, S.; PAASIVERTA, J. "Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling". *Chemosphere*, **40** : 943-949, 2000.

SIRIMANNE, S.R.; BARR, J.R. & PATTERSON, D.G. "Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC". *Anal. Chem.*, **68** : 1556-1560, 1996.

SIRIPONG, P.; ORAPHIN, B.; SANRO, T. & DUANPORN, P. "Screening of fungi from natural sources in Thailand for degradation of polychlorinated hydrocarbons". *Am.-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.*, **5**(4) : 466-472, 2009.

SOARES, G.M.B.; de AMORIM, M.T.P. & COSTA-FERREIRA, M. "Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R". *Journal of Biotechnology*, **89** : 123–129, 2001.

SOKAL, R.R. & MCHENER, C.D. "A statistical method for evaluating systematic relationships". *The University of Kansas Science Bulletin*, **38**(2): 1409-1438, 1958.

STACH, J.; PAKÁREK, V.; GRABIC, R.; LOJKÁSEK, M. & PACÁKOVÁ, V. "Dechlorination of polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans on fly ash". *Chemosphere*, **41** : 1881-1887, 2000.

STANMORE, R.B. "The formation of dioxins in combustion systems". *Combustion and Flame* , **136** 398–427, 2004.

STIEGLITZ, L.; BAUTZ, H.; ROTH, W. & ZWICK, G. "Investigation of precursor reactions in the de-novo-synthesis of PCDD/PCDF on fly ash". *Chemosphere*, **34**(S-1): 1083-1090, 1997.

SUHARA, H.; DAIKOKU, C.; TAKATA, H.; SUZUKI, S.; MATSUFUJI, Y.; SAKAI, K. & KONDO, R. "Monitoring of white-rot fungus during bioremediation of polychlorinated dioxin-contaminated fly ash". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62** : 601–607, 2003.

SUGANO, Y.; MATSUSHIMA, Y.; TSUCHITA, K.; AOKI, H.; HIRAI, M. & SHODA, M. "Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1". *Biodegradation*, **20** : 433–440, 2009.

TAKAHASHI, M.; TSUKAMOTO, S.; KAWAGUCHI, A.; SAKAMOTO, A. & MORIKAWA, H. "Phytoremediators from abandoned rice field". *Plant Biotechnology*, **22**(2): 167–170, 2005.

TAKIGAMI, H.; SUZUKI, G. & SAKAI, S-I. "Application of bioassays for the detection of dioxins and dioxin-like compounds in wastes and the environment". IN: *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Chemical Pollutants*. MURAKAMI, Y.; NAKAYAMA, K.; KITAMURA, S.-I.; IWATA, H & TANABE, S. (Eds.). Tóquio, Terrapub, 2008. p. 87-94.

TÁVORA, F.L. "História e Economia dos Biocombustíveis no Brasil". Centro de Estudos da Consultoria do Senado, 2011.
<http://www.senado.gov.br/conleg/centroaltoestudos1.html>.

TEIXEIRA, S.R.; DE SOUZA, A.E.; PEÑA, A.F.V.; DE LIMA, R.G. & MIGUEL, Á.G. "Use of charcoal and partially pyrolysed biomaterial in fly ash to produce briquettes: sugarcane bagasse". IN : *Alternative Fuels*. MANZANERA, M. (Ed.) Rijeka, InTech - Open Access Publisher, 2011. p. 177-200.

TORRES-DUARTE, C.; ROMAN, R.; TINOCO, R. & VAZQUEZ-DUHALT, R. "Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system". *Chemosphere*, **77** : 687–692, 2009.

TUPPURAINEN, K.; ASIKAINEN, A.; RUOKOJÄRVI, P. & RUUSKANEN, J. "Perspectives on the formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans during municipal solid waste (MSW) incineration and other combustion processes". *Acc. Chem. Res.*, **36** : 652-658, 2003.

TURGUT, M.; ÖZSUNAR, Y.; ÖNCÜ, S.; AKYÜZ, O.; ERTUĞRUL, M.B.; TEKIN, C.; GÜLTEKIN, B. & SAKARIA, S. "Invasive fungal granuloma of the brain caused by *Aspergillus fumigatus*: a case report and review of the literature". *Surgical Neurology*, **69** : 169-174, 2008.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G. & CAPIELLO, A. "Na overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry". *Mass Spectrometry Reviews*, **30** : 491-509, 2011.

UNICA. *Açúcar e Álcool do Brasil Commodities da Energia e do Meio Ambiente*. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2004. 34p.

UNICA. *Produção e Uso do Etanol Combustível no Brasil: Respostas às Questões mais Freqüentes*. São Paulo. Março, 2007. Disponível em http://www.ie.ufrj.br/infosucro/biblioteca/bic_Unica_ProducaoUsoEtanol.pdf. Acesso 07/03/12.

UKISU, Y. & MIYADERA, T. "Dechlorination of dioxins with supported palladium catalysts in 2-propanol solution". *Applied Catalysis A: General*, **271** : 165–170, 2004.

URANO, K.; KATO, M.; NAGAYANAGI, Y.; SAITO, Y.; AONO, A.; NAGATA, J. & SYUDO, H. "Convenient dioxin measuring method using an efficient sampling train, an efficient HPLC system and a highly sensitive HRGC/LRMS with a PTV injector". *Chemosphere*, **43** : 425-431, 2001.

U.S. EPA. 1989. *Interim Procedures for Estimating Risks Associated with Exposures to Mixtures of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans (CDDs and CDFs) and 1989 Update*. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, EPA/625/3-89/016 (NTIS PB90145756), 1989.

US EPA ,2008. *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/ Chemical Methods*. SW-846 Manual. Disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm> Acessado 23/01/2012.

VAITHIYANATHAN, S.; MSHRA, A.S.; PRASAD, R.; TRIPATHI, M.K.; MISRA, A.K.; CHATURVEDI, O.H. & JAKHMOLA, R.C. "Remazol brilliant blue reactive dye decolouration and mustard straw utilization by white rot fungi". *Indian Journal of Biotechnology*, **4** : 144-148, 2005.

VALLE-VIGÓN, P. & FUERTES, A.B. "Magnetically separable carbon capsules loaded with laccase and their application to dye degradation". *RSC Adv.*, **1** : 1756-1762, 2011.

VALLI, K.; WARISHII, H. & GOLD, M.H. "Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *Journal of Bacteriology*, **174**(7): 2131-2137, 1992.

VAN DEN BERG, M.; BIRNBAUM, L.S.; DENISON, M.; DE VITO, M.; FARLAND, W.; FEELEY, M.; FIEDLER, H.; HAKANSSON, H.; HANBERG, A.; HAWS, L.; ROSE, M.; SAFE, S.; SCHRENK, D.; TOHYAMA, C.; TRITSCHER, A.; TUOMISTO, J.; TYSKLIND, M.; WALKER, N. & PETERSON, R.E. "The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds". *Toxicological Sciences*, **2** : 223–241, 2006.

VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DÖRR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V. & RIVEROS, J.M. "Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa". *Química Nova*, **34**(10): 1875-1887, 2011.

VIDALI, M. "Bioremediation. An Overview". *Pure Appl. Chem.*, **73**(7): 1163–1172, 2001.

VITALI, V.M.V.; MACHADO, K.M.G.; DE ANDREA, M.M. & BONONI, V.L.R. "Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation". *Brazilian Journal of Microbiology*, **37** : 256-261, 2006.

VON HOLST, C.; MAIO, G.; WENCLAWIAK, B.W. & DARSKUS, R.L. "Extraction of PCDD/PCDF from soil with supercritical CO₂: Optimization by a three-level factorial design approach". *Frenesius Journal of Analytical Chemistry*, **368** : 378-383, 2000.

VYAS, B.R.M. & MOLITORIS, H.P. "Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R". *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(11): 3919–3927, 1995.

WAITE, S.; KALLURY, K. & MCGINLEY, M. "Using aromatic selectivity with Gemini C6-Phenyl for difficult separations". Phenomenex Technical note TN-1029, 2006. Disponível em www.Phenomenex.com/TechNotes/1029. Acessado 05/03/12.

WANG, W.; GAO, X.; ZHENG, L. & LAN, Y. "Reductive dechlorination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in MSWI fly ash by sodium hypophosphite". *Separation and Purification Technology*, **52** : 186–190, 2006.

WANG, B.-E. & HU, Y.-Y. "Bioaccumulation versus adsorption of reactive dye by immobilized growing *Aspergillus fumigatus* beads". *Journal of Hazardous Materials*, **157** : 1–7, 2008.

WEBER, R.; SAKURAI, T. & HAGENMAIER, H. "Formation and destruction of PCDD/PCDF during heat treatment of fly ash samples from fluidized bed incinerators". *Chemosphere*, **38** : 2633-2642, 1999.

WEBER, R. & SAKURAI, T. "Formation characteristics of PCDD and PCDF during pyrolysis processes". *Chemosphere*, **45** : 1111-1117, 2001.

WEBER, R. "Relevance of PCDD/PCDF formation for the evaluation of POPs destruction technologies – Review on current status and assessment gaps". *Chemosphere*, **67** : S109–S117, 2007.

WELLINGTON LABS. Reference and Handling Guide. GC/MS Characterization and Analysis of Selected Halogenated Aromatic Compounds. 2009. Disponível em http://www.well-labs.com/docs/gc_ms_ref_guide.pdf. Acessado 07/03/12.

WILKES, H.; WITTICH, R.-M.; TIMMIS, K.N.; FORTNAGEL, P. & FRANCKE, W. "Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1". *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(2): 367-371, 1996.

WILLIAMS, L.M. Woods Hole Oceanographic Institution, 2011. Disponível em <http://www.whoi.edu/page.do?pid=52736&tid=441&cid=127988&ct=61&article=89708> . Acessado 17/*04/2012, 15h00.

WU, Z.; GAO, W.; PHELPS, M.A.; WU, D.; MILLER, D.W. & DALTON, J.T. "Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry". *Analytical Chemistry*, **76**(3): 839-847, 2004.

XHROUET, C.; PIRARD, C. & DE PAUW, E. "De novo synthesis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans on fly ash from a sintering process". *Environ. Sci. Technol.*, **35** : 1616-1623, 2001.

YABE, K.; NAKAMURA, Y.; NAKAJIMA, H.; ANDO, Y. & HAMASAKI, T. "Enzymatic conversion of norsolorinic acid to averufin in aflatoxin biosynthesis". *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(5): 1340-1345, 1991.

YANG, M.; FAZIO, S.; MUNCH, D. & DRUMM, P. "Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π-π interactions with a reversed-phase phenyl column". *Journal of Chromatography A*, **1097** : 124-129, 2005.

YANG, Z.; XIA, C.; ZHANG, Q.; CHEN, J. & LIANG, X. "Catalytic detoxification of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in fly ash". *Waste Management*, **27** : 588–592, 2007.

YIVE, N.S.C.K. & TIROUMALECHETTY, M. "Dioxin levels in fly ash coming from the combustion of bagasse". *Journal of Hazardous Materials*, **155** : 179–182, 2008.

- YU, J.; BHATNAGAR, D. & EHRLICH, K.C.; "Aflatoxin biosynthesis". *Rev. Iberoam. Micol.*, **19** : 191-200, 2002.
- ZAIA, J. "Mass spectrometry of oligosaccharides". *Mass Spectrometry Reviews*, **23** : 161-227, 2004.
- ZHANG, F.; CHEN, J.; ZHANG, H.; NI, Y.; ZHANG, Q. & LIANG, X. "Dechlorination of dioxins with Pd/C in ethanol–water solution under mild conditions". *Separation and Purification Technology*, **59** : 164–168, 2008.

ANEXO I

Análise das amostras obtidas pela empresa Baraúna para quantificação de dioxinas em torta de filtro, leira de compostagem, cinzas volantes e caixa de cinza obtidas da Usina São José da Estiva, em Novo Horizonte – SP, por laboratórios particulares.

TABELA A.1 – Análise de dioxinas na torta de filtro rotativo de cana-de-açúcar.
Método usado: GC-HRMS.

Parâmetros	Resultados Unidade: ng/kg dw
2,3,7,8 – TetraCDD	<0,27
1,2,3,7,8 – PentaCDD	<0,36
1,2,3,7,8,9 – HexaCDD	<0,71
1,2,3,6,7,8 – HexaCDD	<0,71
1,2,3,4,7,8 – HexaCDD	<0,71
1,2,3,4,6,7,8 – HeptaCDD	<5,04
OctaCDD	<77,2
2,3,7,8 – TetraCDF	<0,47
2,3,4,7,8 – PentaCDF	<0,65
1,2,3,7,8 – PentaCDF	<0,65
2,3,4,6,7,8 – HexaCDF	<0,59
1,2,3,7,8,9 – HexaCDF	<0,59
1,2,3,6,7,8 – HexaCDF	<0,59
1,2,3,4,7,8 – HexaCDF	<0,59
1,2,3,4,7,8,9 – HeptaCDF	<0,56
1,2,3,4,6,7,8 – HeptaCDF	<0,77
OctaCDF	<4,75
OMS(1998)PCDD/FTEQ incl.LOQ	1,55
OMS(1998)PCDD/FTEQ excl.LOQ	ND
OMS(2005)PCDD/FTEQ incl.LOQ	1,43
OMS(2005)PCDD/FTEQ excl.LOQ	ND
I-TEQ(OTAN/CCMS) incl.LOQ	1,45
I-TEQ(OTAN/CCMS) excl.LOQ	ND

TABELA A.2 – Análises de dioxinas em cinzas volantes da caldeira de queima do bagaço de cana. Método usado: EPA 8290 (US EPA, 2008).

Parâmetros - Dioxina e Furanos			
Parâmetros	Unidade	LQM	0907/019R-01
			09h50min
2,3,7,8 - TetraCDF	ng/kg,	---	23,6
1,2,3,7,8 - PentaCDF	ng/kg	---	6,64
2,3,4,7,8 - PentaCDF	ng/kg	---	8,24
1,2,3,4,7,8 - HexaCDF	ng/kg	---	1,55
1,2,3,6,7,8 - HexaCDF	ng/kg	---	1,57
1,2,3,7,8,9 - HexaCDF	ng/kg	---	< 0,40
2,3,4,6,7,8 - HexaCDF	ng/kg	---	1,08
1,2,3,4,6,7,8 - HeptaCDF	ng/kg	---	< 0,78
1,2,3,4,7,8,9 - HeptaCDF	ng/kg	---	< 0,38
OctaCDF	ng/kg	---	< 0,88
2,3,7,8 - TetraCDD	ng/kg	---	3,08
1,2,3,7,8 - PentaCDD	ng/kg	---	3,50
1,2,3,4,7,8 - HexaCDD	ng/kg	---	1,56
1,2,3,6,7,8 - HexaCDD	ng/kg	---	1,37
1,2,3,7,8,9 - HexaCDD	ng/kg	---	1,37
1,2,3,4,6,7,8 - HeptaCDD	ng/kg	---	2,86
OctaCDD	ng/kg	---	6,84
Dioxinas e Furanos TEQ- WHO (excl.LQ)	ng/kg	---	12,5
Dioxinas e Furanos TEQ- WHO (incl.LQ)	ng/kg	---	12,5
Dioxinas e Furanos TEQ- NATO/CCMS (excl.LQ)	ng/kg	---	12,5
Dioxinas e Furanos TEQ- NATO/CCMS (incl.LQ)	ng/kg	---	12,6

TABELA A.3 - Análises de dioxinas em amostras de cinza provenientes da caixa de cinza da caldeira. Análise por GC-HRMS.

Dioxinas e Furanos³

Parâmetros	Resultados Unidade: ng/kg
2,3,7,8 - TetraCDD	11,7
1,2,3,7,8 - PentaCDD	7,94
1,2,3,7,8,9 - HexaCDD	1,93
1,2,3,6,7,8 - HexaCDD	2,03
1,2,3,4,7,8 - HexaCDD	2,86
1,2,3,4,6,7,8 - HeptaCDD	<8,06
OctaCDD	<123
2,3,7,8 - TetraCDF	92,6
2,3,4,7,8 - PentaCDF	21,9
1,2,3,7,8 - PentaCDF	18,7
2,3,4,6,7,8 - HexaCDF	4,03
1,2,3,7,8,9 - HexaCDF	<0,95
1,2,3,6,7,8 - HexaCDF	3,31
1,2,3,4,7,8 - HexaCDF	3,72
1,2,3,4,7,8,9 - HeptaCDF	<0,90
1,2,3,4,6,7,8 - HeptaCDF	3,27
OctaCDF	<7,59
OMS(1998)PCDD/FTEQ incl.LOQ	42,9
OMS(1998)PCDD/FTEQ excl.LOQ	42,7
OMS(2005)PCDD/FTEQ incl.LOQ	38,1
OMS(2005)PCDD/FTEQ excl.LOQ	37,9
I-TEQ(OTAN/CCMS) incl.LOQ	39,0
I-TEC(OTAN/CCMS) excl.LOQ	38,7

TABELA A.4 - Análise de dioxinas na amostra de uma leira de compostagem. Análise por GC-HRMS seguindo o protocolo EPA 8290 (US EPA, 2008).

ENSAIO: DIOXINAS E FURANOS				
LOGIN: 5282/2010-1.0		PONTO: COMPOSTO ORGÂNICO		
MATRIZ: RESÍDUO INDUSTRIAL		DATA: 09/02/2010	HORA: 09:00	
Nome do Composto	Concentração ng/kg	i-TEQ de Nato ng/kg	WHO-TEQ ng/kg	LQ i-TEQ ng/kg
DIOXINAS				
2,3,7,8-TCDD	ND	ND	ND	1
1,2,3,7,8-PeCDD	ND	ND	ND	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	ND	ND	ND	0,15
OCDD	ND	ND	ND	0,045
Total de Isômeros non-targeted				
TCDD	18,50			
PeCDD	5,900			
HxCDD	0,7950			
HpCDD	ND			
Total de Dioxinas TEQ		ND	ND	
FURANOS				
2,3,7,8-TCDF	4,07	0,4070	0,4070	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	ND	ND	0,1
2,3,4,7,8-PeCDF	ND	ND	ND	1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,6,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	0,3
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	ND	0,3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	ND	ND	0,15
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	ND	0,15
OCDF	ND	ND	ND	0,045
Total de Isômeros non-targeted				
TCDF	5,330			
PeCDF	8,500			
HxCDF	0,5560			
HpCDF	ND			
Total de Furanos TEQ		0,4070	0,4070	
Total Geral TEQ		0,4070	0,4070	5,840