

**Universidade Federal de São Carlos, UFSCar**  
**Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

**Marcos Vinícius de Almeida**

**“Remediação *in vitro* de poluentes orgânicos  
persistentes com utilização de plantas e  
nanopartículas”**

**São Carlos**

**2013**

**Marcos Vinícius de Almeida**

**“Remediação *in vitro* de poluentes orgânicos  
persistentes com utilização de plantas e  
nanopartículas”**

Tese apresentada para a Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Cláudio Antônio Cardoso

Profa. Dra. Sandra Regina Rissato

**São Carlos**

**2013**

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

A447rp

Almeida, Marcos Vinícius de.

Remediação *in vitro* de poluentes orgânicos persistentes com utilização de plantas e nanopartículas / Marcos Vinícius de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
151 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Remediação. 3. Micropropagação. 4. Nanopartículas. 5. Poluentes. 6. Fitorremediação. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Marcos Vinícius de Almeida**

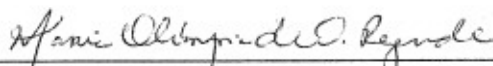
Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 14/08/2013**

**BANCA EXAMINADORA**



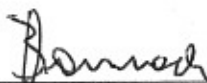
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Fissato (Presidente)  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/ Bauru-SP)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Olímpia O. Rezende  
(Instituto de Química da Universidade de São Paulo/ São Carlos-SP)



Prof. Dr. Mário Sérgio Galhiane  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/ Bauru-SP)



Prof. Dr. Gilbert Bannach  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/ Bauru-SP)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo Moreira  
(Universidade Federal de São Carlos)

## EPÍGRAFE

*“Todas as graças da mente e do coração escapam quando o propósito não é firme”*

*Willian Shakespeare*

**Termo de aprovação**

O aluno fez uma apresentação perfeita, relacionando de forma inquestionável o trabalho realizado com a literatura.

Discutiu de modo maduro, mostrando sua alta capacidade e conhecimento adquiridos, estando apto ao título de doutor de Biotecnologia.



*Dedico este trabalho aos meus pais Maria Palmira Zagato de Almeida, Orandi de Almeida, ao meu filho Cauã Squinca de Almeida e minha esposa Daniela Augusta Squinca.*



## AGRADECIMENTOS

- Ao Laboratório de Química Analítica e Cromatografia da Faculdade de Ciências de Bauru pelo acolhimento e oportunidade de execução da pesquisa realizada.
- A minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Rissato pela confiança, parceria e auxílio que foram além das normalmente incumbidas pelo cargo.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Antônio Cardoso pela confiança e oportunidade de trabalho.
- Ao professor Prof. Dr. Marco Antônio do Reis Pereira que gentilmente cedeu as mudas de Bambus, e além de um orientador nesta área, foi um grande incentivador e amigo.
- Ao professor Prof. Dr. Fenelon Martinho Pontes que gentilmente cedeu o material nanoestruturado e alguns reagentes utilizados no trabalho.
- Ao CEBITEC, USP - ESALQ que contribuíram para o meu aprendizado quanto às questões moleculares, bioquímicas e fisiológicas de vegetais.
- A Profa. Dra. Inês Cechim que forneceu a casa de vegetação utilizada no estudo.
- A amiga Renata Ribeiro que sempre foi meu braço direito nas execuções de laboratório, nas análises por GC/MS, nas execuções de experimentos na casa de vegetação, apoio logístico e especialmente pelas “dicas de pesca” e nos desabafos quanto ao andamento do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Luis Carlos Trevelin pela competência e profissionalismo.
- Ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo pelo apoio nas interpretações de software e formatações de texto.
- A amiga Gilda Hisae Mabuchi, pelas receitas japonesas, e interpretações no campo da nanotecnologia.
- A amiga Francine Pizzinato kataoka, pelo companheirismo de todos estes anos.
- Ao amigo Evandro Tambarusi pelos ensinamentos quanto à cultura de tecidos e pelas conversas nas viagens.

- Ao amigo Estevão Salvagnini, pelas plantas, chás, discussões, lanches da tarde, brigas, passeios, argumentações filosóficas transcendentais, espirituais, quânticas e outras nestes anos de estudo.
- Aos estagiários que colaboraram cada um a sua maneira, para a execução deste trabalho.
- Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru pelo apoio inicial no empréstimo do laboratório de cultura de tecidos.
- Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e realização profissional.
- A Profa. Dra. Ignez Caracelli e seu esposo Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, pelas aulas de bioquímica, conhecimentos compartilhados, seriedade, compromisso e exemplos de integridade científica a serem seguidos.
- Ao Prof. Dr. Katsumasa Hoshino pelas discussões científicas e questionamentos na área.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu pai, Orandi de Almeida, que sempre mais que companheiro, nunca faltou em seu apoio de todas as formas que lhe foram possíveis e impossíveis, sempre com a mesma tônica: realizar.

## APRESENTAÇÃO

O interesse na investigação de processos mitigadores de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) surgiu pela constatação de sua bioacumulação através das cadeias tróficas, efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente. Com as evidências de transporte destes compostos a longas distâncias, incluindo regiões onde elas nunca foram utilizadas ou produzidas, e os consequentes riscos que estes podem causar, a comunidade internacional (UNEP - *United Nations Environment Programme*) considera importante a redução e eliminação destes compostos.

Uma vez que os métodos atualmente disponíveis para a remoção destes compostos são extremamente caros e de difícil execução, existe uma crescente necessidade pelo desenvolvimento de metodologias mais eficientes e com custos menores. As tecnologias fitorremediativas e a aplicação de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado para a degradação de POPs surge como uma alternativa atrativa para reverter o impacto destes poluentes no meio ambiente.

Uma vez que os estudos de remediação para esta finalidade necessitariam de grandes quantidades de materiais e ao final poderiam gerar matrizes contaminadas, a proposta desse trabalho foi implementar um método de remediação inédito por ser desenvolvido *in vitro*, utilizando quantidades exponencialmente menores de materiais e poluentes, minimizando custos, resíduos e sendo ambientalmente adequado.

Todas as metodologias usadas nesse trabalho seguiram as mesmas diretrizes com a preocupação no desenvolvimento de tecnologias e processos capazes de reduzir ou não gerar resíduos tóxicos, minimizando o impacto dos processos ao meio ambiente, gerando resultados de forma limpa e sustentável.

Reagentes utilizados em processos de desinfecções, como o tradicional Cloreto de Mercúrio II, antifúngicos generalistas, banidos de atividades agrícolas comuns e ainda usados em técnicas de produção *in vitro*, bem como, elevadas quantidades de solventes orgânicos clorados usados em processos de extração, foram substituídos por reagentes com menor toxicidade e em quantidades significativamente menores.

Outrossim, os efeitos do material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub> no cultivo dos vegetais *in vitro* foram avaliados e as espécies estudadas manuseadas com o máximo de controle e supervisão técnico a fim de, minimizar e evitar riscos ambientais.

O projeto FAPESP n° 2009/17248-0 sob a coordenação da Profa. Dra. Sandra Regina Rissato forneceu o suporte financeiro para a execução do presente trabalho, inclusive um equipamento de Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS), que possibilitou a análise e confirmação dos poluentes orgânicos persistentes e conseqüentemente a avaliação dos processos de remediação estudados.

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Química Analítica e Novos Materiais da Faculdade de Ciências da UNESP campus de Bauru-SP, em parceria com o Prof. Dr. Claudio Antônio Cardoso do Grupo de Materiais e Dispositivos do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

## RESUMO

A poluição ambiental é um problema capcioso com consequências ecológicas generalizadas. Entre todas as substâncias químicas produzidas, existe uma série de compostos orgânicos, de uso variado, que pelo conjunto de seus efeitos ao meio ambiente e à saúde humana, foram agrupados sob a sigla POPs, POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, as quais têm sido alvo de discussões com diferentes ênfases em convenções mundiais sobre o meio ambiente.

Técnicas como biorremediação, fitorremediação, tratamento térmico entre outras, vem sendo testadas nos últimos anos e em alguns casos demonstraram bons resultados de descontaminação das matrizes como solo e água, frente a diversos agentes poluidores. A nanotecnologia surge como uma importante ferramenta para remediação de matrizes ambientais e vem se destacando por se apresentar como uma tecnologia de oxidação “verde”. Plantas por sua vez também são elementos de agregação e transformação de compostos orgânicos em seus tecidos e podem também ser aplicadas em processos fitorremediativos *in vivo* ou como uma opção de estudo utilizando modelos *in vitro*.

Este trabalho desenvolveu um método de remediação totalmente *in vitro*, em contraste aos tradicionais métodos *in vivo*. Para tanto, foi possível estabelecer dois protocolos inéditos para o desenvolvimento de cultura *in vitro*: um para espécie de bambu *Bambusa vulgaris* var. *vitatta* e outro para o girassol *Helianthus annuus*. L. O estudo dos efeitos biorremediativos dessas espécies mantidas *in vitro* apresentou resultados promissores para dezessete dos vinte e quatro compostos avaliados com o uso do girassol alcançando até 87 % de remediação. Além disso, foi possível constatar a toxicidade do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado para as espécies testadas, em diferentes estágios do desenvolvimento do vegetal.

A utilização do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado na remediação de amostras aquosas contaminadas com POPs apresentou resultados promissores com degradação ao redor de 50 % para a maioria dos poluentes.

Este estudo possibilitou uma comparação interessante sobre o potencial dessas técnicas em aplicações ambientais com relação à eficiência, praticidade e toxicidade especialmente focando-se nos processos de remediação que certamente devido a sua dinâmica tendem a propiciar resultados ecologicamente atraentes e que podem inclusive serem usados em conjunto.

**Palavras chaves:** POPs, Remediação *In vitro*, fitorremediação, nanopartículas, TiO<sub>2</sub>, Bambu e Girassol.

## ABSTRACT

Environmental pollution has been a complex problem which generates a lot of ecological consequences. Among all chemicals produced by anthropic activity human, there is a wide range of organic compounds affecting on the environment and human health, which were grouped under the acronym POPs, Persistent Organic Pollutants. These compounds have been targeted at all conventions on the global environment.

Bioremediation, phytoremediation and thermal treatment are techniques that have been tested in recent years and in many cases showed good results for decontamination matrices such as soil and water. Nanotechnology emerged in the recent years as an important tool for environmental purification and has been highly used by presenting itself as technological option for "green oxidation". Plants can also be considered as component of aggregation and transformation of organic compounds in their tissues and can also be applied in phytoremediation purposes both *in vivo* and *in vitro* models.

This study developed a remediation method fully *in vitro*, in contrast to traditional methods *in vivo*. Two novel protocols were established by the development of *in vitro* culture: one for bamboo species *Bambusa vulgaris* var. *vitatta* and other for sunflower *Helianthus annuus*. L. The study of bioremediation effects of these species *in vitros* showed promising results for seventeen from twenty-four compounds evaluated using sunflower reaching until 87% for remediation. Moreover, it was possible to verify the nanostructured TiO<sub>2</sub> toxicity to the studied species at different stages of development.

The use of nanostructured TiO<sub>2</sub> in the remediation of aqueous samples contaminated with POPs showed promising results in degradation of around 50% for most pollutants.

This work suggests an interesting comparison of the potential of these techniques in environmental applications with respect to efficiency, practicality and toxicity especially focus in go remediation processes certainly due to its dynamic results can provide environmentally attractive and can even be used together.

**Key words:** POPs, Remediation *In vitro*, Phytoremediation, Nanostructured TiO<sub>2</sub>, Bambu and Sunflower.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Número de áreas avaliadas pela CETESB durante o período de maio de 2002 a novembro de 2008.

**Figura 2:** Principais compostos determinados em áreas contaminadas em novembro de 2008 no estado de São Paulo.

**Figura 3:** Fórmulas estruturais (da esquerda para a direita): Aldrin, Dieldrin e Endrin.

**Figura 4:** Fórmulas Estruturais do Clordano *cis* e *trans*, da esquerda para direita (fonte: U.S. Fish and Wildlife Service).

**Figura 5:** Fórmulas Estruturais do Heptacloro Epóxido e Heptacloro (fonte: NOAA).

**Figura 6:** Fórmulas Estruturais do DDT e seus metabolitos (Yogui, 2002).

**Figura 7:** Fórmulas Estruturais do Hexaclorobenzeno (HCB) e o dodecaclorohidro-1,3,4 metano -1 H- ciclobuta [c,d] pentaleno (Mirex) (Yogui, 2002).

**Figura 8:** Fórmulas Estruturais dos isômeros do hexaclorociclohexano HCH (Yogui 2002).

**Figura 9:** Mecânismo fotocatalítico de degradação na presença de radiação UV.

**Figura 10:** Fluxograma incluindo um resumo das principais etapas do presente trabalho.

**Figura 11:** Gema de ramo lateral e Gema de Colmo de *Bambusa Vulgaris* var. *Vitatta*.

**Figura 12:** Moita madura de Bambu *Dendrocalamus Giganteus*, da Fazenda Experimental do laboratório de Experimentação de Bambus Faculdade de Engenharia, UNESP de Bauru.

**Figura 13:** Broto com 2 semanas de brotação estágio em que realizaram as obtenções de células meristemáticas

**Figura 14:** Mudanças de girassol *Helianthus annuus* L. mantidas em casa de vegetação

**Figura 15:** Necrose dos tecidos em cultura *in vitro* com TiO<sub>2</sub>.

**Figura 16:** Grupo controle do girassol em cultivo *in vitro*.

**Figura 17:** Semente de girassol *Helianthus annuus* L., corte longitudinal do embrião, aumento 40x, grupo tratado com TiO<sub>2</sub> 5 µg.mL<sup>-1</sup> (m/v).

**Figura 18:** Girassol com 12 dias de desenvolvimento, após germinação.

**Figura 19:** Cromatograma do Íon Total (TIC) obtido por GC/MS de uma solução padrão de 24 POPs na concentração de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 20:** Esquema Representativo da translocação de fotossintatos, H<sub>2</sub>O, Nutrientes, Compostos orgânicos, e outros compostos em floema e xilema de plantas.

**Figura 21:** Proposta de vias de biotransformação do Endosulfan descritas por Weir et al. (2006), e (SUTHERLAND et al. 2002b) envolvendo “Ese mooxigenase”, reação na presença do microorganismos *Mycobacterium sp.* e a via ESD envolvendo ESD monooxigenase, gerando endosulfan monoaldeido ou endosulfan hidroxietter de  $\beta$ -endosulfan.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Limites de detecção e intervalos lineares de vários detectores usados em Cromatografia Gasosa.

**Tabela 2** - Quadrado latino de combinações de concentrações em mg L<sup>-1</sup>, variando de 0,0 mg a 10 mg, para os hormônios, auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudo realizado em triplicata.

**Tabela 3** - Quadrado latino de combinações de concentrações em mg L<sup>-1</sup>, variando de 1,2 mg a 2,0 mg, para os hormônios, auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudo realizado em triplicata.

**Tabela 4**- Quadrado latino de combinações de concentrações em mg L<sup>-1</sup>, variando de 3,0 mg a 10 mg, para os hormônios, auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudo realizado em triplicata.

**Tabela 5** - Quadrado latino de combinações de concentrações em mg L<sup>-1</sup>, variando de 0,0 mg a 10 mg, para os hormônios, auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudo realizado em triplicata.

**Tabela 6** - Condições testadas no estudo de degradação com uso de TiO<sub>2</sub> em água contaminadas com POPs na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 7**- Peso (g) de amostras de girassol provenientes do cultivo *in vitro*

**Tabela 8** – Resultados obtidos para os Limites de detecção (LD), Limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em dois níveis de fortificação, desvio padrão relativo (DPR) e regressão linear da curva de calibração (r<sup>2</sup>) para a matriz água.

**Tabela 9** – Resultados obtidos para os limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em dois níveis de fortificação, desvio padrão relativo (DPR) para a matriz girassol (raiz e parte aérea).

**Tabela 10** – Resultados obtidos no processo de Fitorremediação para o girassol (partes radicular e aérea: folhas, galhos e brotos).

**Tabela 11**- Resultados de remediação de POPs em água obtidos em experimento de Remediação utilizando TiO<sub>2</sub> comercial Degusa P25.

**Tabela 12** - Propriedades físico-químicas dos POPs utilizados no presente trabalho.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

2,4D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido Indol acético
ANA	Agencia nacional das águas
ANA	Ácido indolil-3-butírico
AOAC	Guidelines for Single Laboratory Validation of Analytical Methods for Tracelevel Concentrations of Organic Chemicals
ATM	Atmosfera
BAP	Benzol amino purina
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CV	Coeficiente de variação
C-18	Octadecyl
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Extraction
ECD	Detector de Captura de Elétrons
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency
FID	Detector de ionização de Chama
GC	Cromatografia Gasosa
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INBAR	International Network for Bamboo and Rattan
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de detecção
LLE	Liquid-Liquid extraction
LQ	Limite de quantificação
MS	Meio de cultura vegetal murashige & skook
MS	Spectrômetro de Massas
NM	Nanômetro
NPD	Detector Nitrogênio-Fósforo

NPK	Nitrogênio, Fosforo e Potássio.
P25 DegussaCo	Material nanoestruturado de TiO <sub>2</sub> comercial, da
PCBs	Bifenilas policloradas
PDMS	Polidimetilsiloxano
POA	Processo altamente oxidativo
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
ONU	Organização das nações unidas
RSD	Relative Standard Deviation
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SLE	Solid Liquid Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
UV	Ultra Violeta
µg	Micrograma

## Índice

Epigrafe	i
Termo de aprovação	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Agradecimento especial	v
Apresentação	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tabela	x
Lista de abreviações e siglas	xi
Índice	xii
Sumário	
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1 Contaminações de solos e águas subterrâneas	2
2.2 Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)	6
2.2.1. Ciclodienos	7
2.2.1.1. Aldrin, Dieldrin e Endrin	7
2.2.1.2 Clordano	9
2.2.1.3 Heptacloro	10
2.2.2 DDT e metabólitos	12
2.2.3 HCB E MIREX	13
2.2.4 ISÔMEROS DO HCH	14
2.3 Remediação e Biorremediação	15
2.3.1 Fitorremediação	17
2.3.1.1 Bambus como fitorremediadores	18

2.3.1.2 Girassol como fitorremediadora	20
2.3.2 Utilização de nanomateriais na remediação ambiental	21
2.3.2.1 Processos Homogêneos	22
2.3.2.2 Processos Heterogêneos	22
2.3.3 TiO <sub>2</sub> Nanoestruturado	25
2.4 Métodos analíticos para a determinação de poluentes orgânicos	27
2.4.1 Extração e “Clean-up”	28
2.4.2 Análise	30
2.4.3 Validação de métodos analíticos	32
2.4.3.1 Especificidade e Seletividade	33
2.4.3.2 Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho	33
2.4.3.3 Linearidade	34
2.4.3.4 Sensibilidade	35
2.4.3.5 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)	35
2.4.3.5.1 Exatidão	36
2.4.3.5.2 Precisão	36
3. Justificativas e relevância da pesquisa	38
4. Objetivos	41
4.1 Objetivos gerais	41
4.2 Objetivos específicos	41
5- Materiais e métodos	42
5.1 Delineações experimentais da tese	42
5.2 Reagentes	45
5.2.1 Preparação das soluções padrões	46
5.2.2.1 Preparo das soluções de trabalho	46
5.2.2.2 Solução de meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).	46

5.3 Remediação	48
5.3.1 Experimento 1: Estabelecimento dos protocolos de micropropagação	48
5.3.1.1 Etapa 1. Procedimentos para geração de matrizes: explantes vegetais lenhosos de bambus	49
5.3.1.2 Etapa 2. Procedimentos de esterilização e desinfecção	52
5.3.1.2.1 Procedimentos generalísticos de esterilização das gemas caulinares	52
5.3.1.2.1.1 Inoculação das estacas	56
5.3.1.2.2 Procedimentos específicos: avaliação de diferentes antibiogramas	56
5.3.1.3 Etapa 3. Avaliação de diferentes tipos de meio de cultura <i>in vitro</i>	57
5.3.1.3.1 bambus	57
5.3.1.3.2 Para o girassol	61
5.3.2 Experimento 2	62
5.3.2.1 Estudo da fitotoxicidade do material nanoestruturado TiO <sub>2</sub>	62
5.3.3 Estudo de fitorremediação de POPs com <i>Bambusa vulgaris</i> var. <i>vitatta</i> e Girassol <i>Helianthus annuus</i> L.	64
5.3.4 Experimento 4 – Estudo do efeito de remediação de TiO <sub>2</sub> nanoestruturado em água contaminada com POPs	65
5.3.5 Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação dos POPs em amostras de plantas e água	65
5.3.5.1 Lavagem da vidraria	65
5.3.5.2 Materiais	66
5.3.5.3 Equipamentos usados	66
5.3.5.4 Extração e “clean-up” das amostras de plantas e água	67
5.3.5.5 Validação do método	68
5.3.5.6 Análise	70
5.3.5.7 Quantificação	69
6. Resultados	73
6.1 Resultados do Experimento 1	73
6.1.1 Etapa 1. Formação do jardim somaclonal	73
6.1.1.1 Bambus do gênero <i>Dendrocalamus ssp</i> , <i>Bambusa ssp</i> e <i>Guada ssp</i> .	73

6.1.1.2 Girassol <i>Helianthus annuus</i> L.	73
6.1.2 Etapa 2. Esterilização dos explantes	74
6.1.2.3 Antibiogramas	76
6.1.3 Etapa 3. Inoculações	76
6.2 Resultados do experimento 2. Estudo de fitotoxicidade das nanopartículas de TiO <sub>2</sub>	77
6.2.1 Plantas testadas	77
6.2.2 Testes de fitotoxicidade	77
6.2.2.1 <i>Bambusa vulgaris</i> var. <i>vitatta</i>	77
6.2.2.2 Girassol <i>Helianthus annuus</i> L.	78
6.3 Experimento 3. Avaliação das Plantas para Processo de Fitorremediação	80
6.3.1 <i>Bambusa vulgaris</i> variedade <i>vitatta</i>	80
6.3.2 Girassol <i>Helianthus annuus</i> L.	80
6.3.3 Validação da metodologia analítica	81
6.4 Resultados dos processos de remediação	82
6.4.1 Estudo de fitorremediação utilizando Girassol	82
6.4.2 Experimento 4. Estudo de Remediação de POPs em Água utilizando TiO <sub>2</sub> Nanoestruturado (Degusa P25).	82
7. Discussão	87
7.1 Validação da Metodologia Analítica	87
7.2. Experimento 1	89
7.3 Experimento 2	93
7.4 Experimento 3	95
7.5 Experimento 4	101
8. Conclusão	103
9. Referências Bibliográficas	105
10- Anexos	121



## Sumário

Epigrafe	i
Termo de aprovação	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Agradecimento especial	v
Apresentação	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviações e siglas	xi
Índice	xii
Sumário	xx
1. Introdução	1
2. Revisão de Bibliográfica	2
3. Justificativa e relevância da pesquisa	38
4. Objetivos	41
5. Materiais e métodos	42
6. Resultados	73
7. Discussão	87
8. Conclusão	103
9. Referências Bibliográficas	105
10. Anexos	122

## 1. Introdução

O ciclo da água é um ciclo natural que ocorre há milhões de anos, em que transformações sofridas permitem sua renovação e reutilização. Porém uma das principais transformações que os sistemas hídricos vêm sofrendo no último século são suas crescentes contaminações, que afeta principalmente as zonas litorâneas e as grandes cidades. Entre os principais fatores que influenciam a poluição das águas estão o lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais, a urbanização desenfreada, as atividades agrícolas e de mineração, os poluentes presentes na atmosfera carregados pelas chuvas, as mudanças climáticas, entre outros. Esses fatores comprometem de modo irrefutável a qualidade da água para consumo na Terra e já provocaram a morte de quase dois milhões de crianças no mundo nos últimos vinte anos (RELATÓRIO DO DESENVOLVIMENTO HUMANO 2013).

O artigo 3º da Declaração Universal pelos Direitos da Água recomenda: “Os recursos naturais de transformação da água em água potável são lentos, frágeis e muito limitados. Assim sendo, a água deve ser manipulada com racionalidade, precaução e parcimônia” (WORLD WATER FÓRUM 6, 2012). Segundo relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) divulgado no dia 12 de março de 2012 durante o 6º Fórum Mundial da Água, 80% das águas residuais não é recolhido ou tratado e muitas vezes esse percentual é descartado com outros efluentes, resultando em contaminações do lençol freático.

No Brasil os rios mais poluídos se encontram em áreas urbanas. Segundo Ney Maranhão, superintendente de Planejamento de Recursos Hídricos da Agência Nacional de Águas (ANA), de acordo com o Censo 2010, a população urbana do País é de cerca de 161 milhões de pessoas o que correspondente a 84,4% da população total (IBGE, 2010). Este elevado nível de urbanização causa um impacto significativo nos rios que atravessam as cidades, pois somente 42,6% dos esgotos domésticos são coletados e apenas 30,5% recebe algum tratamento (ATLAS BRASIL 2012).

No âmbito dos tratamentos convencionais a maioria é inadequada na remoção de contaminantes orgânicos, fato que tem propiciado o desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento. Dentre estas se destacam os processos físicos fundamentados em adsorção e alguns processos químicos que utilizam oxidantes como cloro e ozônio. Nos últimos anos, processos oxidativos avançados tem se mostrado uma alternativa promissora de tratamento, permitindo a degradação de inúmeros poluentes resistentes. Em geral, os radicais que surgem neste tipo de reações, principalmente hidroxila, permitem a completa degradação de substratos orgânicos, com elevadas taxas de mineralização. Neste sentido, novas tecnologias vêm sendo propostas, porém sem o estabelecimento sistemático da técnica, que permita constituir-se como uma nova tecnologia. Com vistas a essa finalidade, esses processos de inovação devem ser embasados em estudos científicos a fim de propiciar viabilidade técnica, segurança a saúde humana e ao meio ambiente e fornecer dados seguros sobre os efeitos de novos produtos ou técnicas a serem aplicados.

## **2. Revisão Bibliográfica**

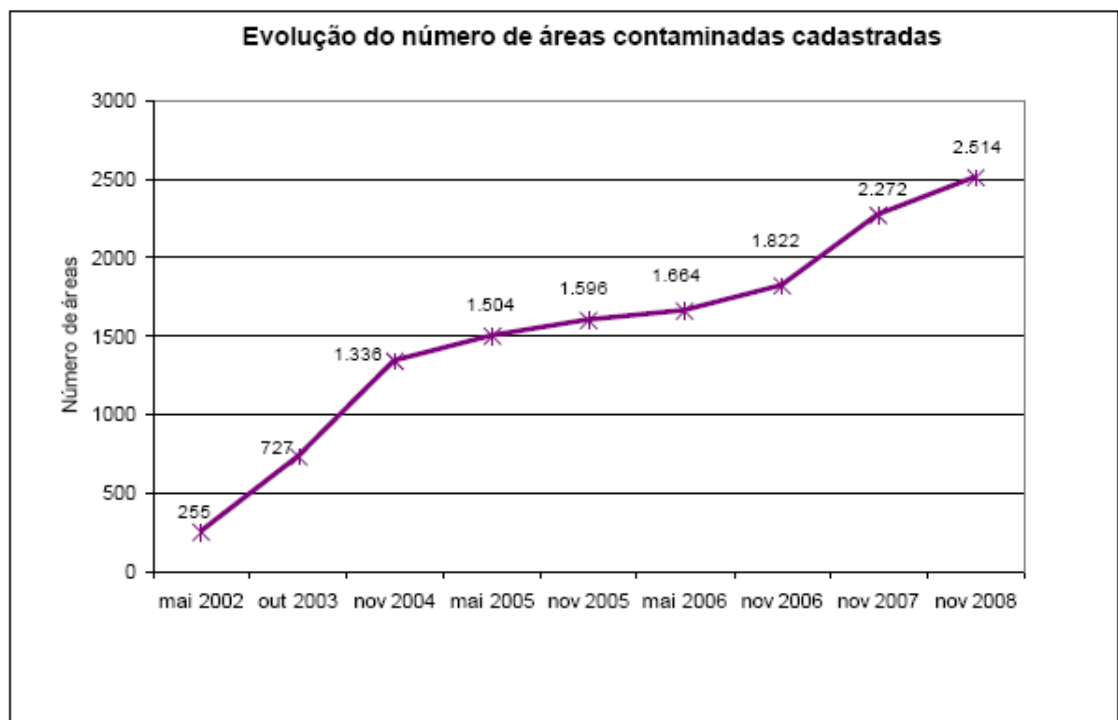
### **2.1. Contaminação de solos e águas subterrâneas**

A contaminação de solos e águas subterrâneas é um dos grandes problemas ambientais contemporâneos. A origem das áreas contaminadas está relacionada ao desconhecimento em épocas passadas do grau de toxicidade, de procedimentos seguros para o manejo de substâncias perigosas e à ocorrência de acidentes ou vazamentos durante ações produtivas, de transporte ou de armazenamento de matérias primas e produtos acabados. Com o advento da industrialização, a visão de desenvolvimento voltou-se para a redução de custos e para o aumento da capacidade de produção (DUBOIS, 2008; TERRY & BANUELOS, 2000).

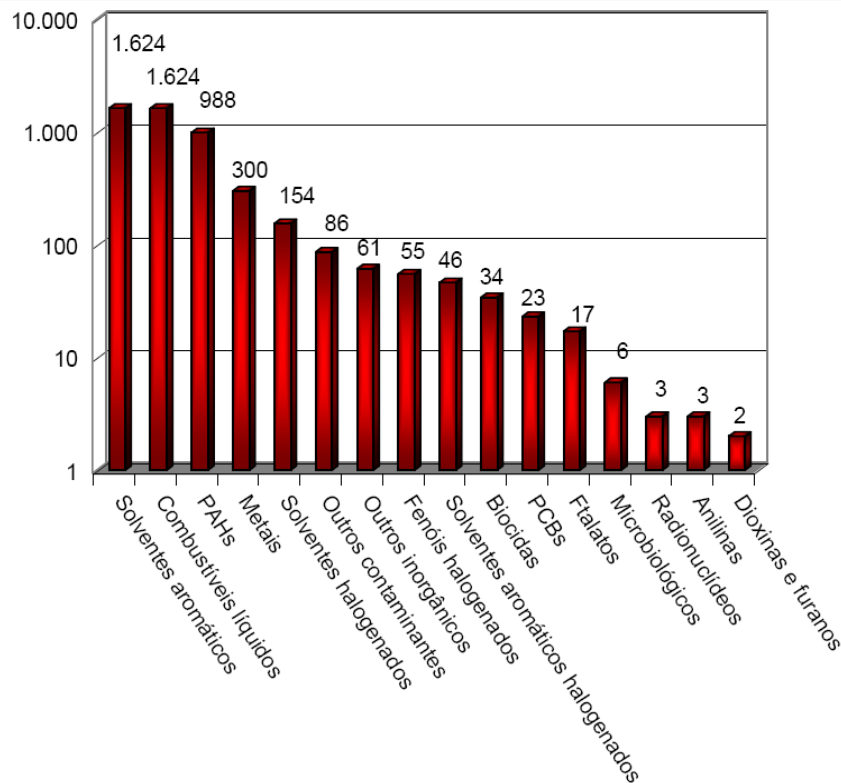
Uma área contaminada pode gerar comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a consequente desvalorização de propriedades, além de danos ao meio ambiente (CAESPMA, 2009A; NYSDOH, 2009; TERRY& BANUELOS, 2000).

A CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental é a agência do Governo do Estado de São Paulo responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, com a preocupação fundamental de preservar e recuperar a qualidade da água, do ar e do solo (CAESPMA, 2009b).

Em maio de 2002, a CETESB divulgou pela primeira vez a lista de áreas contaminadas, registrando a existência de 255 pontos no Estado de São Paulo. Em novembro de 2008, o número de áreas contaminadas avaliadas totalizou 2.514. As Figuras 1 e 2 apresentam a avaliação de áreas contaminadas já cadastradas (CETESB/GTZ, 1997).



**Figura 1:** Número de áreas avaliadas pela CETESB durante o período de maio de 2002 a novembro de 2008 (CETESB, 2009).



**Figura 2:** Principais compostos determinados em áreas contaminadas em novembro de 2008 no estado de São Paulo (CETESB, 2009).

Dentre os compostos identificados em áreas avaliadas pela CETESB encontram-se uma série de compostos orgânicos, de uso variado pertencente a distintas classes químicas, que pelo conjunto de seus efeitos no meio ambiente e na saúde humana, foram agrupadas e classificadas como POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes) (RAND, & PETROCELLI, 1998).

A contaminação do subsolo de aterros tem origem principalmente na infiltração dos lixiviados através das camadas impermeabilizantes. A interação solo-contaminante é muito complexa, uma vez que, muitos fenômenos físicos, químicos e biológicos podem ocorrer simultaneamente. Sendo assim, são inúmeros os fenômenos que controlam o transporte de contaminantes no solo, que se constitui de um meio poroso, onde o contaminante pode mover-se solubilizado (água) pelas lacunas do meio poroso (solo) seja ele saturado ou não (NOBRE, 1987).

O transporte de poluentes não depende apenas do fluxo do fluido no qual essas substâncias podem estar solubilizadas, mas principalmente dos mecanismos que são caracterizados por processos físicos, químicos e biológicos.

O movimento da água nos solos ocorre em um meio poroso heterogêneo, onde o tamanho, a forma e as conexões entre as lacunas existentes nessa matriz e a viscosidade do fluido acabam por determinar a velocidade de percolação. Os poros que estão presentes na matriz solo podem estar interconectados formando caminhos, e, por esses, os fluidos podem migrar em sub-superfície (BEAR & VERRUIJT, 1979). Para que ocorra o deslocamento de um poluente em sub-superfície é necessário uma pressão para gerar um gradiente hidráulico que force esse movimento (BEAR & VERRUIJT, 1979).

Um contaminante lançado em quantidade suficiente pode percolar de forma descendente uma sub-superfície não saturada (FETTER, 1999). Um contaminante orgânico que atinge o subsolo pode se encontrar, principalmente em quatro formas:

- (a) fase livre – parte não miscível sobre o topo do lençol freático;
- (b) fase dissolvida – na água do lençol freático;
- (c) fase adsorvida ou residual – na interface envolvendo grumos de solo ou descontinuidade na rocha;
- (d) fase vaporizada – na fase gasosa que ocupa vazios do solo ou da rocha.

As propriedades dos contaminantes como pressão de vapor e solubilidade em água definirão o equilíbrio entre as 4 fases (FETTER, 1999). As propriedades que afetam a persistência de um contaminante em sub-superfície incluem a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade (medida pelo coeficiente de partição octanol/água), a volatilidade (relacionada com a pressão de vapor) e o grau de halogenação do contaminante. Os contaminantes com alto grau de halogenação são lentamente biodegradados em solos aeróbicos por causa do seu alto estado de oxidação. Contaminantes hidrofóbicos tendem a se adsorver ao solo (Walker, 2002) e contaminantes com baixa pressão de vapor volatilizam lentamente, conseqüentemente, o alto grau de halogenação, a alta hidrofobicidade e a baixa pressão de vapor são características comuns de contaminantes recalcitrantes (WALKER, 2002). Devido à baixa solubilidade e alta toxicidade, contaminantes como os poluentes orgânicos persistentes (POPs) podem continuar a degradar a qualidade do aquífero por muitos anos por processos de dissolução.

## 2.2. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)

Os poluentes orgânicos persistentes ou POPs são encontrados amplamente distribuídos em todo o planeta nos solos, águas, alimentos, organismos vegetais e já foram detectados também em tecido adiposo dos seres humano e em amostras de leite materno (YOGUI, 2001).

Em 1985 a EPA, Agência de Proteção Ambiental Americana, do inglês “Environmental Protection Agency” classificou as dioxinas, POPs gerados pela combustão de materiais clorados, como os mais potentes carcinogênicos jamais testados em laboratório (KOOPMAM-ESSEBOOM et al., 1994).

Por se desconhecer os efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, tais como, acumulação química e persistência na cadeia alimentar, estes compostos foram amplamente introduzidos no mercado visando à diminuição, controle ou extermínio de pragas entre outros organismos que afetavam a produção agrícola (COUTINHO & BARBOSA, 2007).

Devido à sua alta solubilidade em compostos apolares, os POPs são encontrados depositados em gorduras, ceras e outros compostos lipídicos de animais e plantas, destacando-se por sua estabilidade química perante a degradação natural, decomposição e pela sua toxicidade amplamente relatada há mais de 30 anos (KOOPMAM-ESSEBOOM et al., 1994).

Sua nomenclatura “POPs” (poluentes orgânicos persistentes) foi atribuída quando confirmado seus efeitos acumulativos por mais de 40 anos na cadeia alimentar. Até a confirmação destes efeitos acreditava-se que sua toxicidade a humanos fosse muito baixa e sendo agudamente tóxico apenas para insetos e outros artrópodes (MAHLER et al., 2007).

Após várias pesquisas, foram reconhecidos como compostos de elevada toxicidade e rotulados de POPs.

A partir disso, passaram a ser alvo de leis, estratégias políticas e sanitárias que proibiram sua fabricação, comercialização e aplicação e forçaram a sua eliminação em todo mundo, decisão reafirmada pela convenção de Estocolmo no ano de 2004. Foram propostos ainda estudos que possibilitassem sua separação e a descontaminação de toda cadeia biológica e meio abiótico (STOCKHOLM CONVENTION, 2004). Frente a esta decisão muitas técnicas de descontaminação e eliminação foram propostas para áreas já poluídas como, métodos como biorremediação e tratamento térmico as quais vêm sendo testadas para averiguação de sua eficácia, viabilidade técnica e econômica (COUTINHO & BARBOSA 2007, DINARDI et al., 2003).

Uma vez liberados no ambiente natural uma substância poluidora pode apresentar três comportamentos distintos:

- a) permanecer inalterado no local ou próximo ao local de sua liberação.
- b) ser deslocado para água, solo e ar por processos de solubilização, volatilização, dissolução, adsorção e precipitação.
- c) ser transformado em outros compostos através de reações químicas como: oxido-redução, reações de ácido base, complexações, hidrólises, fotólises, e por processos biológicos como biodegração (ARTIOLA et al., 2004)

Independentemente do destino ou trajetória do poluente após sua liberação, o risco de sua contaminação e toxicidade ao meio ambiente e a saúde humana fazem dos POPs moléculas de alta prioridade a serem removidas da natureza. Para isto, técnicas como fitorremediação, biorremediação, degradação enzimática ou métodos químicos diversos vem sendo aplicados com o objetivo de remover, remediar ou destruir estes poluentes (JACOBSON & JACOBSON, 1990).

### **2.2.1. Ciclodienos**

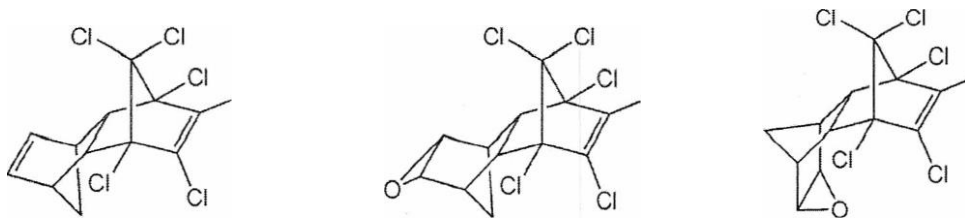
Os ciclodienos são um grande grupo de compostos organoclorados, dentre os quais estão Aldrin, Dieldrin, Endrin, Clordanos, Heptacloro, entre outros.



### 2.2.1.1. Aldrin, Dieldrin e Endrin

Os compostos mostrados na Figura 3 são obtidos pela reação da síntese diênica descoberta por Ouo Diels e Kurt Alder (daí a origem dos nomes).

Primeiramente a ação inseticida do aldrin foi descoberta em 1948, por Julius Hyman, que o denominara "composto 118". Em 1950 começou a produção em escala industrial do inseticida, primeiro nos Estados Unidos e em seguida na Holanda.



**Figura 3:** Fórmulas estruturais (da esquerda para a direita): Aldrin, Dieldrin e Endrin.

O aldrin é um inseticida de amplo espectro e altamente efetivo, matando os insetos por contato e ingestão, possuindo também ação fumigante leve dentro da terra, o que assegura o controle de insetos na camada superficial do solo. Uma vez no solo, o aldrin pode se volatilizar, contaminando a atmosfera. O teor restante é rapidamente epoxidado e convertido a dieldrin, que é mais resistente à biotransformação e à degradação abiótica que o aldrin. O aldrin e o dieldrin foram extensivamente usados durante os anos 50 a 70 como inseticidas em lavouras de milho e algodão. Nos Estados Unidos, o uso agrícola destes compostos foi restrito a partir de 1970 e, para controle de térmitas em 1987, quando o fabricante voluntariamente solicitou o cancelamento de seu registro. No Brasil, o aldrin, juntamente com diversos outros inseticidas organoclorados teve seu uso, comercialização e distribuição proibidos pela Portaria 329, de 2 de Setembro de 1985, do Ministério da Agricultura (Adaptado de Neto, 2002).

O dieldrin pode ser encontrado na natureza tanto como resultado direto de seu uso como inseticida quanto como metabólito pela epoxidação do aldrin.

Nos Estados Unidos, foi proibido como inseticida em 1970, voltou a ser liberado em 1972 para combate a cupins e formigas. Finalmente em 1987 ocorreu o cancelamento total de seu uso naquele país. No Brasil, ele foi proibido pela mesma Portaria 329, mas continuou sendo produzido para exportação até 1990. Em 1993 houve então a proibição total para esse inseticida. Na América Latina, a maioria dos países (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, México, Paraguai e Peru) já vetou completamente o dieldrin.

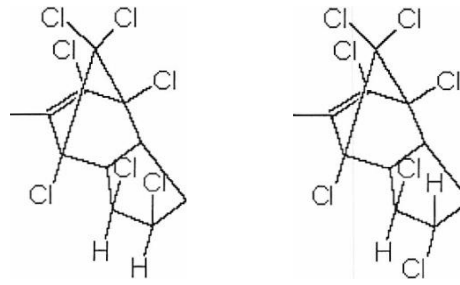
O Uruguai permite o uso restrito do composto e na Venezuela, a aplicação do inseticida (mesmo na agricultura) ainda é totalmente permitida (Adaptado de Leite, 2002).

O endrin, que é um estereoisômero do dieldrin, teve sua patente requerida pela *Shell Development Company* em abril de 1950 e concedida em abril de 1954. A partir de então, o endrin foi utilizado em vários países como inseticida, rodenticida e avicida, bem como em culturas de algodão, trigo e maçã.

Seu uso declinou à medida que a resistência desenvolvida pelos insetos crescia. O endrin teve sua fabricação encerrada nos Estados Unidos em 1991, quando a *Velsicol Chemical Company* solicitou voluntariamente o cancelamento do registro da produção. O endrin não chegou a ser produzido no Brasil; todas as formulações utilizadas aqui foram preparadas com produto importado. Atualmente, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) permite a comercialização de endrin e produtos afins apenas para preservação de madeira, sendo vetado a qualquer outra atividade (Adaptado de Assumpção, 2002).

#### **2.2.1.2. Clordano**

O clordano (mostrado em suas duas formas na Figura 4) é um inseticida de contato de amplo espectro, utilizado na agricultura em diversas culturas e no controle de cupins.



**Figura 4:** Fórmulas Estruturais do Clordano *cis* e *trans*, da esquerda para direita (fonte: U.S. Fish and Wildlife Service).

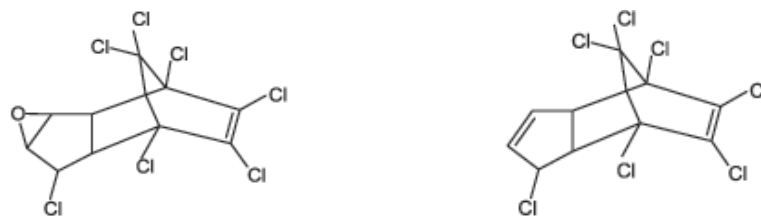
O clordano técnico é uma mistura de mais de 140 compostos, sendo sua composição aproximada: 15% *cis*-clordano, 15% *trans*-clordano, 21,5% de isômeros de clordene, 3,8% heptacloro, 9,7% *trans*-nonacloro, 2,7% *cis*-nonacloro, 3,9% octaclordano, 2,6% "Composto K", 2,2% dihidroclordene, 2% Nonaclor, 10,2% de três estereoisômeros do dihidroheptacloro. Os 33% restantes são uma mistura de 135 outros compostos. Do clordano propriamente dito, o isômero *cis* é o que possui maior atividade inseticida. O clordano foi primeiramente sintetizado em 1947 pela Velsicol Chemical Corporation e durante 35 anos foi, junto com o heptacloro, um dos agrotóxicos mais utilizados nos Estados Unidos.

Em março de 1978, a Agência de Proteção Ambiental norte americana (EPA) noticiou a suspensão do uso do clordano nos EUA, mas manteve a autorização para injeções para controle de cupins em fundações e em plantas ornamentais, autorização essa que prosseguiu até 1987 para as plantas ornamentais e 1988 para os cupins. Neste mesmo ano, foram anunciados o cancelamento do uso comercial e a suspensão de todos os produtos de Clordano e foram impostas restrições para a venda e uso do estoque existente nos EUA, mas até 1995 a Velsicol possuía autorização para a exportação do produto. Em 1997, a empresa interrompeu voluntariamente a produção tanto nos EUA como em outros países. No Brasil, não há agrotóxicos cujo principal ingrediente ativo seja o clordano, mas sim três produtos destinados à preservação de madeira (por adição à cola, pincelamento ou imersão): Biarbinex 200 CE, Biarbinex 400 CE e Nadefour 400, todos contendo além de clordano, heptacloro e nonacloro. Esses produtos são feitos pela Action Agro, subsidiária brasileira da Velsicol (Adaptado de Oliveira, 2002).

### 2.2.1.3. Heptacloro

O heptacloro é um inseticida organoclorado isolado do clordano em 1946 e foi extensivamente usado entre os anos de 1953 e 1974 no controle de pragas do solo, de sementes como milho e sorgo.

Também foi usado no controle de formigas, larvas de mosca, cupins e outros insetos em solos cultivados e não cultivados e para insetos domésticos. O heptacloro epóxido, produto da degradação do heptacloro (ambos representados na Figura 5) é mais tóxico e mais persistente no ambiente do que o seu precursor.

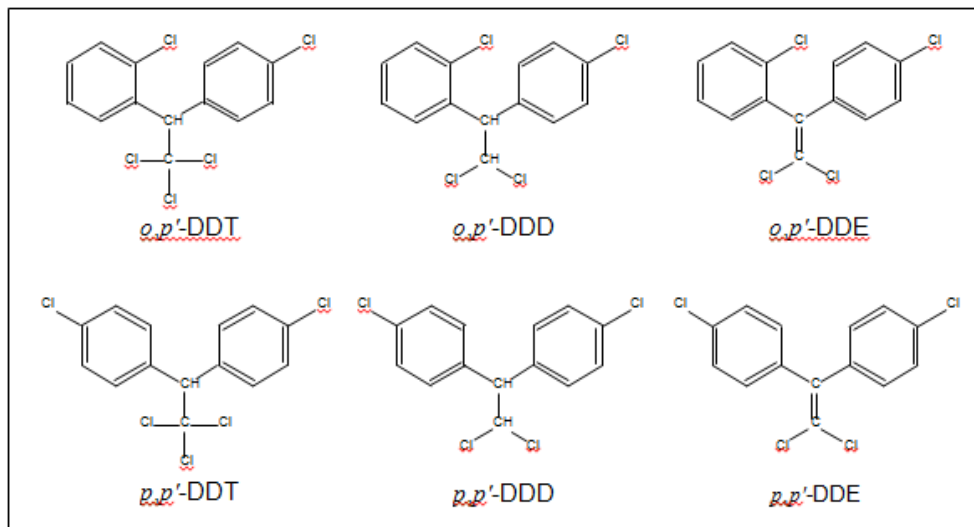


**Figura 5:** Fórmulas Estruturais do Heptacloro Epóxido e Heptacloro (fonte: NOAA).

Vale ressaltar que o heptacloro é um constituinte importante do clordano grau técnico, chegando a 20% em peso. Quanto à produção e comercialização, quase todos os registros foram cancelados em 1974, devido ao seu potencial risco carcinogênico, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar. Sua venda foi cancelada espontaneamente em 1987, pelo único fabricante, a Vesicol Chemical Corporation e a venda e distribuição dos estoques foram proibidas em abril de 1988. Todavia, seu uso ainda é permitido nos EUA para controle de formigas de fogo em transformadores e os estoques domésticos, para controle de cupins subterrâneos. No Brasil, ainda é usado na preservação de madeira. Desde meados dos anos 80, a utilização de organoclorados tem sido restringida no Brasil. Entretanto, sabe-se de grandes estoques na agropecuária e que provavelmente estejam sendo vendidos por indústrias não registradas (adaptado de Lima, 2002).

### 2.2.2. DDT e metabólitos

O DDT (mostrado com seus metabólitos na Figura 6) é um inseticida persistente de amplo espectro que foi utilizado largamente na agricultura e no controle de vetores de doenças.



**Figura 6:** Fórmulas Estruturais do DDT e seus metabólitos.

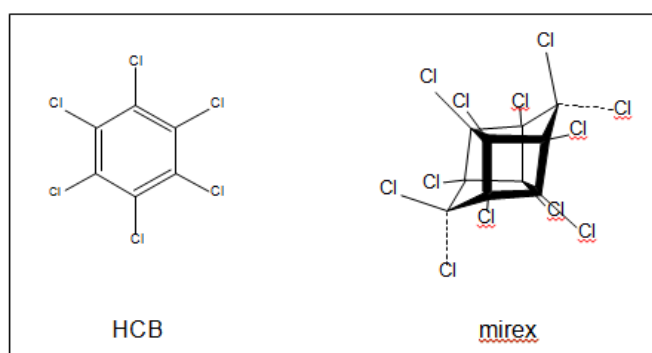
O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1874 por Othmar Zeidler, mas suas propriedades inseticidas foram descobertas apenas em 1939 por Paul Muller, que recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1948 pela importância da descoberta e pelo posterior uso no combate a mosquitos transmissores de doenças. Porém, os insetos passaram a desenvolver resistência ao composto e os efeitos ambientais negativos foram evidenciados. Além do DDT, há também o DDD e o DDE, como resultado da transformação do DDT e também como impurezas no DDT grau técnico (JESUS, 2002). Na transformação por via oxidativa, a molécula do DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio, se transformando em DDE. Na via redutiva, há apenas a perda de um átomo de cloro e a formação de DDD, que ainda apresenta alguma atividade inseticida, mas é menos tóxico para peixes do que o DDT. Já o DDE é o menos tóxico dos três, porém encontrado em maiores concentrações nos organismos.

Estima-se que 80% do total de DDTs estejam na forma de DDE nos organismos marinhos (adaptado de Yogui, 2002). No início da década de 70, seu poder residual, antes tido como qualidade, começou a ser encarado como sério inconveniente de grande significado ecológico, dados os diversos efeitos deletérios reportados. A Suécia proibiu seu uso em 1970 e desde então diversos países têm banido ou restringido rigorosamente sua utilização. Os EUA proibiram seu uso agrícola em 1973 e diversos países europeus na década seguinte. No Brasil, a proibição ocorreu em 1985, exceto para questões de saúde pública.

Atualmente, seu emprego é limitado ao controle de zoonoses em países em desenvolvimento (Adaptado de Jesus, 2002).

### 2.2.3. HCB E MIREX

O HCB (Hexaclorobenzeno, mostrado na Figura 7) é um produto químico sintético, utilizado principalmente como fungicida, que foi introduzido no mercado em 1945. Sua introdução no ambiente ocorreu também como subproduto de diversos processos industriais, como a fabricação de outros pesticidas, de tetracloreto de carbono, pentaclorofenol e monômeros de cloreto de vinila (YOGUI, 2002) e também como resultado da decomposição térmica incompleta em incineradores de diversos compostos organoclorados.

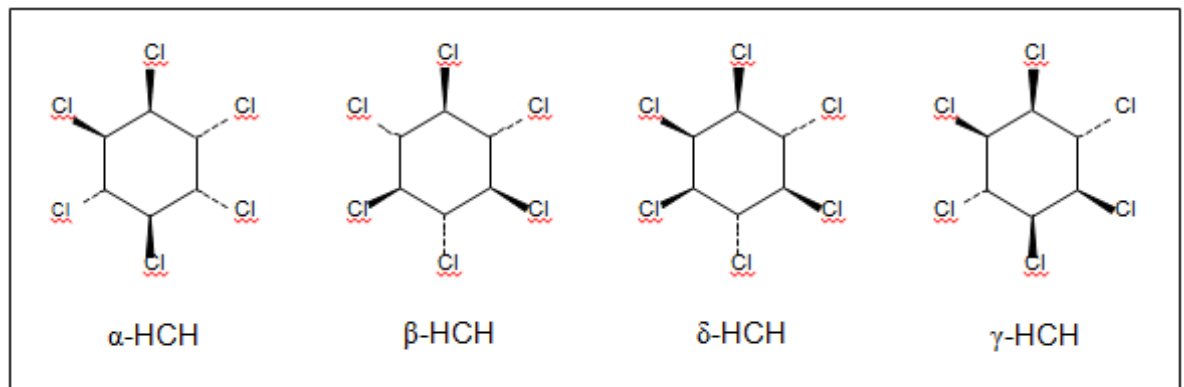


**Figura 7:** Fórmulas Estruturais do Hexaclorobenzeno (HCB) e o dodecaclorohidro-1,3,4 metano -1 H- ciclobuta [c,d] pentaleno (Mirex).

Devido à sua capacidade de volatilização, o HCB pode contaminar também a água da chuva, evidenciando o processo de destilação global e por isso o transporte de longa distância tem importância significativa na sua redistribuição no meio ambiente (TOLEDO, 2002).

O mirex (também representado na Figura 7) foi sintetizado pela primeira vez em 1946, mas só apareceu em formulações de agrotóxicos em 1955 e foi comercialmente disponibilizado em 1958. Por ter grande especificidade no combate a formigas, foi utilizado no sudeste dos EUA, na América do Sul e na África do Sul. A mesma substância, porém com o nome de declorano foi utilizada como retardador de chama em plásticos, borracha, papel e materiais elétricos. O uso como retardante de chama superou, em alguns casos, o agrícola. Nos EUA, estima-se que 75% do total tenham sido usados em aplicações não agrícolas. No Canadá, ele sequer foi registrado como agrotóxico, mas apenas como retardante de fogo (Adaptado de Fernícola, 2002).

#### 2.2.4. Isômeros do HCH



**Figura 8:** Fórmulas Estruturais dos isômeros do hexaclorociclohexano HCH.

O HCH (hexaclorociclohexano), também chamado erroneamente de BHC (hexacloreto de benzeno), começou a ser utilizado quase na mesma época do DDT, como veneno de contato para insetos.

Ele é um composto muito volátil, sendo perdido em altas taxas para a atmosfera durante sua aplicação. Clark (1992) demonstrou em um estudo no sul da Índia, que 99,6% do HCH aplicado em campos de arroz podiam ser perdidos para a atmosfera. Em um contexto mundial, o HCH foi muito usado na fumigação de sementes, devido à sua estabilidade térmica. No Brasil, ele foi especificamente usado nas culturas de café, soja e algodão, bem como no controle da doença de Chagas (WEBER & MONTONE, 1990).

A formulação técnica possui uma série de isômeros (Figura 8), porém, o único que apresenta propriedades inseticidas é o  $\gamma$ -HCH. Ele também foi vendido purificado com o nome de Lindano, mas devido ao preço, foi menos utilizado do que o produto técnico (Adaptado de Yogui, 2002).

### **2.3. Remediação e Biorremediação**

O conceito de ecologia sustentável é muito comum na atualidade e torna-se cada vez mais importante e difundido na sociedade contemporânea.

Conferências mundiais, como a de Kyoto, definiram que é necessário aumentar as buscas por métodos mais eficazes de descontaminação de matrizes imprescindíveis para vida humana tais como, alimentos, água e solo (KYOTO PROTOCOL, 2009).

Atualmente muitas tecnologias são propostas com este intuito, uma vez que é evidente que há uma pressão muito intensa por uso de recursos naturais despoluídos, os quais são cada vez mais raros na natureza.

A remediação ambiental é um conceito amplo para um conjunto de medidas mitigadoras que visam reparação dos danos ambientais ocasionados por interferência antrópica ou natural, como contaminantes químicos, físicos ou radioativos no meio ambiente.



Nessa constante busca de alternativas para despoluir áreas contaminadas por diversos compostos orgânicos, tem-se optado por soluções que englobem processos com alta eficiência, simplicidade, rapidez e baixo custo. Nesse contexto, cresce o interesse pela utilização da “biorremediação”, que é caracterizada como uma técnica que consiste em descontaminar solo e água por meio da utilização de organismos vivos, como microorganismos e/ou plantas (SURESH, 2004).

Tecnologias que visam à remoção de poluentes orgânicos do meio ambiente, utilizando processos de separação e estabilização (adsorção em carvão ativado ou lavagem de solo) não fornecem solução permanente, apenas transferem o contaminante de um sistema para outro. A incineração do material contaminado pode ser outra solução desfavorável, pois além de demandar custo, pode produzir outros compostos químicos tão ou mais tóxicos que os originais (BURKEN, 2002; LITCHFIELD, 2005).

A biorremediação (utilização de organismos vivos para eliminação de compostos tóxicos) vem sendo muito estudada nos últimos anos porque, além de menos dispendiosa, pode resultar na mineralização ou na transformação dos contaminantes em produtos finais inócuos. Pela biorremediação, grandes volumes de solo, água ou sedimentos podem ser tratados pela estimulação dos microrganismos autóctones ou pela introdução de microrganismos com capacidade comprovada de degradar o poluente. Entretanto, estas técnicas de biotecnologia possuem custo elevado e há a necessidade de definições de normas específicas para utilização comercial. A fitorremediação se destaca como uma técnica muito eficaz, de baixo custo, segura, rentável, renovável e com maiores retornos sociais e ambientais do que a utilização de microrganismos selecionados e/ou modificados (BURKEN, 2002; LITCHFIELD, 2005; ATTERBY et al., 2002).

### 2.3.1. Fitorremediação

Dentro do conceito de biorremediação insere-se a fitorremediação, que envolve o emprego de plantas, sua microbiota associada e de amenizantes (corretivos, fertilizantes, matéria orgânica etc.) do solo, além de práticas agrônômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou podem tornar os contaminantes inofensivos ao ecossistema. A utilização da fitorremediação tem sido estudada e difundida nos últimos anos, principalmente nos Estados Unidos e na Europa (DAVIS et al., 2005).

Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela remediação mais relatados na literatura são a fitoextração (SCHNOOR et al., 1995) e a fitoestimulação. Na fitoextração, o contaminante é absorvido pelo sistema radicular da planta remediadora, podendo ser posteriormente fitocompartimentalizado, fitovolatilizado, fitoexsudado ou fitodegradado (SUSARLA et al., 2002). Já na fitoestimulação a planta remediadora libera no solo compostos que estimulam determinada microbiota a metabolizar o xenobiótico (rizodegradação) (SANTOS et al., 2007). Ambos os mecanismos podem ser influenciados pela densidade populacional das espécies remediadoras (SANTOS et al., 2006a), pois o aumento no volume de exploração do sistema radicular e da transpiração das plantas por área pode resultar em maior absorção dos xenobióticos, além de aumentar a população dos microrganismos rizodegradadores associados às suas raízes.

A seleção de vegetais destinados a processos fitorremediativos tem como principais características:

- Alta produtividade e desenvolvimento vegetativo de folhas, galhos e ramos;
- Sistema radicular exuberante e denso;
- Resistência a adversidades de solo como pH, matéria orgânica, compactação etc;
- Fácil cultivo, pouco trato cultural e preferencialmente com retorno econômico.

Obedecendo a estas características, diferentes vegetais foram estudados para este objetivo. Plantas como capim Sapé, capim Brachiaria, Aguapé, Mamona entre outras se destacaram em estudos com poluentes orgânicos e elementos tóxicos. Outros tipos de culturas como eucalipto, também foram utilizadas experimentalmente em processos fitorremediativos de esgoto doméstico ou lodo de esgoto (FARIA & RODRIGUEZ, 2008).

Grupos de plantas com crescimento rápido como as Gramíneas ou Poaceas são indubitavelmente um dos melhores grupos vegetais com finalidades fitorremediativas, e que obedecem a todos os critérios de seleção.

Estas plantas podem ser utilizadas como fonte de biomassa energética e não carecem de nenhum tipo de correção do solo ou implementos, o que diminui o custo de produção frente às culturas agrícolas ou florestais convencionais. O bambu sendo uma gramínea lenhosa também foi utilizado com sucesso em tratamentos de esgoto doméstico, uma vez que possui em seus feixes condutores uma vasta ocorrência de microorganismos aeróbios e anaeróbios que auxiliam em seu metabolismo e secundariamente atuam na degradação de possíveis moléculas poluidoras (CARNEIRO et al., 2002).

#### **2.3.1.1. Bambu como fitorremediador**

Diferentemente das culturas florestais tradicionais, os bambus têm crescimento rápido e excelentes resultados ecológicos de plantio, como alta diversidade de animais e invertebrados concomitantes (LOZOVEI, 2001; ZIMMER & ISLER 2003; RAJÃO & CERQUEIRA, 2006). Além de não utilizar água subterrânea, uma vez que, suas raízes são superficiais, suportam bem solos arenosos, ácidos e pouco produtivos. Essas características fazem desta cultura uma excelente fonte de biomassa para produção de álcool, carvão ou papel (AZZINI et al., 1998; PEREIRA & BERALDO, 2007).

O bambu possui forte vitalidade, grande versatilidade, propriedades estruturais e admirável beleza natural, e estas características têm permitido a esta planta milenar o mais longo e variado papel na evolução da cultura humana. Suas características fazem do bambu uma interessante alternativa para os diferentes propósitos e aplicações tecnológicas incluindo fitorremediação e controle de elementos erosivos do solo (HSIUNG, 1988; FARRELY, 1984).

Existem no mundo 75 gêneros e 1250 espécies de bambu, dos quais 62% são nativos da Ásia, 34% das Américas e 4% da África e Oceania. Entretanto, no âmbito global, 75% das espécies de bambu conhecidas possuem apenas uso local, e somente 50 espécies são intensivamente utilizadas.

Desde 1994 o INBAR (International Network for Bamboo and Rattan -órgão internacional de pesquisa, promoção e comércio de tecnologias com bambus) recomenda o plantio e experimentação de 19 espécies consideradas como prioritárias, com base em critérios relativos à utilização, cultivo, processamento, produção, recursos genéticos, recuperadores de áreas degradadas e agroecologia, (INBAR, 1994).

Outra característica importante para o uso do bambu como uma espécie adequada à fitorremediação consisteem sua boa propagação *in vitro*, a qual permite executar estudos pré-campo. Os experimentos preliminares contribuem de forma irrefutável na elaboração de processos de fitorremediação *in vitro*, com geração mínima de resíduos tóxicos.

O estudo de obtenção de plantas de bambu *in vitro* foi descrito por Alexander e Rao em 1968, utilizando embriões zigóticos maduros. Desde então, foi demonstrado a produção de protoplastos de folhas e cultura de calos (HUANG & MURASHIGE, 1983), regeneração de plantas de *Bambusa oldhamii* Munro (YEH & CHANG, 1986A) e *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana* (YEH & CHANG, 1986b). Komatsu (1995) realizou um estudo da morfogênese em calos de *Phyllostachys bambusoides* Sieb. & Zucc e empresas internacionais, como a Oprens vem comercializando com sucesso milhares de mudas/ano mantidos por sistema *in vitro* de cultivo.

No Brasil existem atualmente poucas empresas ligadas ao ramo, porém algumas alcançam a produção de mais de 3 milhões de mudas/ano com destino a biomassa energética.

Quanto às condições dos meios nutricionais destinados a regeneração de bambus, na maioria das espécies testadas, os pesquisadores utilizaram como explantes sementes e inflorescências (ALEXANDER & RAO, 1968; MEHTA et al., 1982; YEH & CHANG, 1996A; YEH & CHANG, 1986B; TSAY et al., 1990; CHAMBERS et al., 1991; MURUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992; LEMOS et al., 2006); e para poucas espécies, outras partes da planta adulta como gemas apicais e/ou laterais, rizomas e nós (RAO et al., 1985; EL-HASSAN & DEBERGH, 1987; PRUPTONGESE & GAVINLERTVATANA, 1992; CHATURVEDI et al., 1993; LEMOS et al., 2006).

O meio de cultura básico (MS) Murashige & Skoog (1962) com suas modificações e diluições tem demonstrado ser satisfatório para diversas espécies, tanto herbáceas como lenhosas no desenvolvimento de calos e regeneração de plantas. Para o bambu, o meio MS modificado e complementado com diferentes concentrações de citocininas (cinetina e benzilaminopurina), auxinas (ácido naftalenoacético e ácido indolbutírico) e água de coco, constituíram o meio de cultura para a grande maioria dos estudos envolvendo as diferentes espécies de bambu (KOMATSU, 1995).

### **2.3.1.2. Girassol como fitorremediador**

A espécie vegetal *Helianthus annuus* L., conhecida popularmente como girassol é uma espécie pertencente à família das Asteraceae, e utilizada pelos seres humanos a mais de 1000 anos. Dos seus frutos, popularmente chamado semente, é extraído o óleo de girassol que é comestível e no Brasil é utilizado como fonte para produção de biodiesel. Atualmente, a produção mundial ultrapassa 20 milhões de toneladas anuais de grão (CENPES, 2008).

Devido ao seu crescimento rápido, o girassol vem sendo aplicado como alternativa de ciclo intermediário a outras culturas como soja e milho. Entretanto, nessas áreas, observou-se que os produtos utilizados em cultivos anteriores estavam sendo detectados em seus frutos e em sua biomassa, indicando um provável processo de fitoextração de resíduos do solo para partes da planta. Vários estudos têm mostrado a utilização do girassol em processos fitorremediativos para elementos tóxicos, ferro, urânio entre outros contaminantes ambientais de difícil remoção (JANUARY et al., 2008).

Por se tratar de uma planta amplamente difundida e de fácil cultivo, não foram grandes os interesses de pesquisas em estabelecer um protocolo *in vitro* completo, com finalidade comercial, para essa espécie, pois a semeadura mecanizada, o baixo custo das sementes e a alta taxa de germinação superariam monetariamente o cultivo *in vitro*, (SEMENTES DO BRASIL, 2001).

Mesmo sem um protocolo específico, testes com o cultivo seletivo apenas de raízes *in vitro* evidenciaram a toxicidade de antibióticos como tetraciclina e oxitetraciclina para estes tecidos (GUJARATHI, et al. 2005).

### **2.3.2. Utilização de nanomateriais na remediação ambiental**

A nanotecnologia estende a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de um a cem nanômetros. Partículas deste tamanho, ou “nanopartículas”, apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas.

Os processos de remediação ambiental utilizando nanomateriais se baseiam na geração de radical hidroxila como agente oxidante e são conhecidos como processos oxidativos avançados (POAs). O radical hidroxila tem um alto potencial padrão de redução (cerca de 2,8 V) possibilitando a oxidação de uma elevada variedade de substâncias orgânicas (DERBALAH et al., 2004).

Estes processos podem ser divididos em homogêneo e heterogêneo, ambos com ou sem uso de radiação UV (ANDREOZZI et al., 1999). A diferença entre os processos homogêneos e heterogêneos está no mecanismo de produção de HO•, nos reagentes utilizados para sua produção e na fase em que se encontra o fotocatalisador, quando presente (FATTA-KASSINOS et al., 2011).

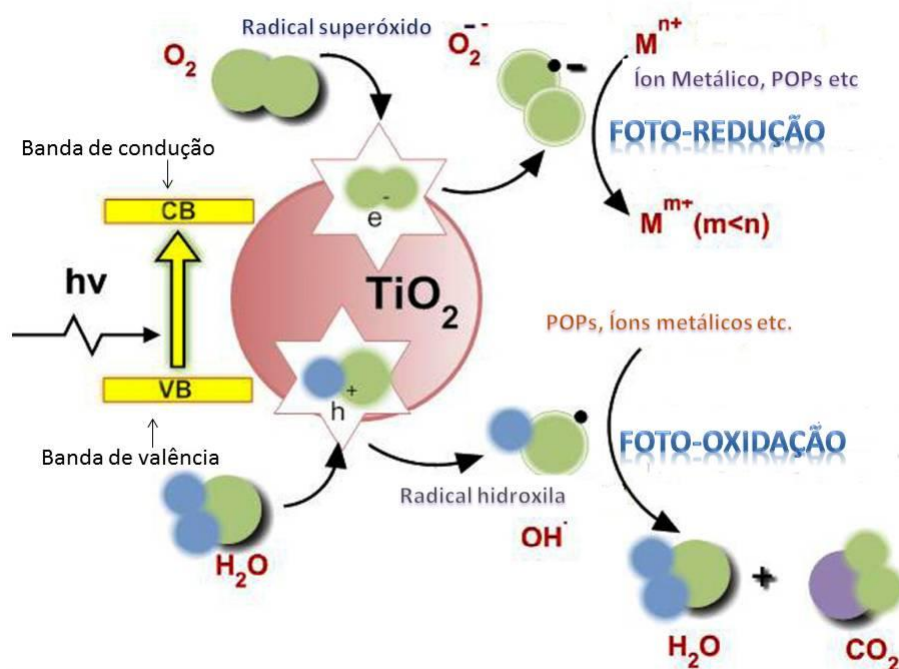
### **2.3.2.1. Processos Homogêneos**

Nos sistemas homogêneos não existe a presença de catalisadores na forma sólida, estes processos apresentam formas diferentes quanto ao modo de geração de radicais hidroxila, podendo ocorrer com ou sem o uso da radiação UV. Os mais utilizados são os processos fenton, foto-fenton, ozonólise e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (LEGRINI et al., 1993).

### **2.3.2.2. Processos Heterogêneos**

Fotocatálise heterogênea é um processo no qual duas fases ativas sólido e líquido estão presentes. A fase sólida é um catalisador, geralmente um semicondutor que possui a possibilidade de gerar bandas denominadas banda de valência (BV) e banda de condução (BC), que é comumente caracterizada por uma faixa de energia (“*band gap*”). A absorção de fótons na superfície de um semicondutor com energia igual ou maior à energia de “*band gap*” resulta na promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução, gerando um par elétron/lacuna. Esse par pode sofrer recombinação interna ou migrar para a superfície do catalisador. Na superfície, pode sofrer recombinação externa ou participar de reações de oxirredução, com espécies adsorvidas como H<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup>, O<sub>2</sub> e compostos orgânicos (LITTER, 1999; NOGUEIRA & JARDIM, 1998).

Os semicondutores podem ser foto excitados para formar sítios elétron-doadores (redução) e elétron-receptores (oxidação), propiciando as reações redox. Quando ocorre incidência de luz sobre um semicondutor é iluminado com um fóton ( $h\nu$ ) maior do que a energia da lacuna da banda, um elétron é promovido da BV para a BC deixando um buraco positivo na banda de valência e um elétron na banda de condução, como ilustrado na Figura 9.



**Figura 9:** Mecânismo fotocatalítico de degradação na presença de radiação UV.

Especialmente, a lacuna que pode ser considerada como um sítio elétron-receptor ( $h^+_{bv}$ ) pode reagir com moléculas de  $H_2O$  ligadas à superfície ou  $OH^-$  para produzir o radical hidroxila e o sítio elétron-doador ( $e^-_{bc}$ ) é captado pelo oxigênio para gerar o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ).

O mecanismo proposto na Figura 9 mostra que o processo de fotocatalise ocorre em etapas, e pode ser esquematizado de acordo com as reações 2 a 12.

Fotoativação da partícula de semicondutor:

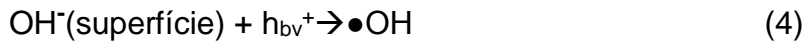




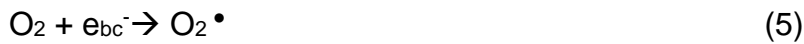
Reação entre a lacuna foto gerada e a água adsorvida:



Reação entre a lacuna foto gerada e os grupos  $\text{OH}^-$  na superfície da partícula do  $\text{TiO}_2$ :



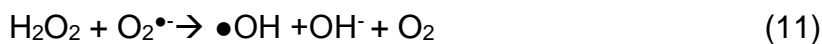
Formação de íon radical superóxido:



Formação de peróxido de hidrogênio:



Geração de radicais hidroxila pela quebra de peróxido de hidrogênio:



Quebra da molécula de peróxido de hidrogênio sob irradiação (fotólise) com produção de radicais hidroxila:



Para ocorrerem reações de oxidação, a BV deve ter um potencial de oxidação superior ao do analito ou poluente. O potencial redox da BV e da BC para diferentes semicondutores varia entre 4,0 e -1,5 volts contra o eletrodo de hidrogênio (NHE).

As energias de BV e BC para o TiO<sub>2</sub> são estimados em 3,1 e -0,1 volts, respectivamente, o que significa que a seu “*band gap*” é de 3,2 eV e, portanto, absorve no UV com  $\lambda < 387$  nm. Muitos compostos orgânicos possuem um potencial redox superior ao do TiO<sub>2</sub> e, por conseguinte, podem ser oxidados. Em contraste, os compostos orgânicos raramente podem ser reduzidos uma vez que poucos compostos possuem um potencial inferior ao da banda de condução de semicondutores.

O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais. Não há dúvida de que essa área da ciência apresenta-se como uma perspectiva que permite melhorar a qualidade de vida e ajudar a recuperar o meio ambiente.

### **2.3.3. TiO<sub>2</sub> Nanoestruturado**

As nanopartículas de dióxido de Titânio (TiO<sub>2</sub>) na forma anatase apresentam comportamento fotocatalítico quando expostas a radiação UV e podem oxidar substâncias orgânicas e organismos biológicos como fungos e bactérias (FERREIRA & DANIEL, 2004; RODRIGUES, et al., 2007).

Fujishima e Honda descreveram que em eventos de oxidação da água na presença de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado observou-se a produção de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> num processo de catálise heterogênea em células foto eletroquímicas.

A partir daí, outros estudos foram encaminhados para aprofundar o mecanismo fotocatalítico do TiO<sub>2</sub> (FERREIRA & DANIEL, 2004).

O dióxido de titânio se apresenta sob três formas diferentes, rutilo, anatase e brookite, que variam na propriedade e forma. Os métodos mais comuns para síntese do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado são o tratamento hidrotérmal, a síntese eletroquímica e a síntese química via template (FERREIRA & DANIEL, 2004; RODRIGUES et al., 2007; NOGUEIRA, 1995; ZIOLLI & JARDIM, 1997).

Sob irradiação da luz, um elétron é promovido da banda de valência para a banda de condução formando sítios oxidantes e redutores com capacidade para catalisar reações químicas, reduzindo outras espécies presentes (FERREIRA & DANIEL, 2004). O processo altamente oxidativo (POA) constitui um sistema heterogêneo utilizando  $\text{TiO}_2$ , que forma na presença da irradiação por luz UV, radicais hidroxila, os quais são agentes altamente oxidantes ( $E_0=2,33\text{V}$ ). Esses radicais mostraram elevada reatividade com inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos, gerando diferentes efeitos de degradação em tratamentos de efluentes industriais pela redução de elementos tóxicos presentes na água, utilizando a luz solar como fonte de radiação UV (FERREIRA & DANIEL, 2004; RODRIGUES et al., 2007; NOGUEIRA, 1995; ZIOLLI & JARDIM, 1997). Seus efeitos de degradação em amostras de pesticidas organofosforados também foram relatados em experimentos conduzidos para amostras ambientais (CHEN et al., 1999A; ZHAO et al., 1995).

Atualmente, a degradação fotocatalítica com semicondutor pode ser considerada como um método promissor para a remediação de contaminantes orgânicos e inorgânicos em água e solo (HAN, et. al. 2004). A fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$  tem sido aplicada com sucesso na degradação de algumas classes de compostos, devido à sua alta eficiência na decomposição de alguns poluentes orgânicos, bem como seu baixo custo, biocompatibilidade e baixa toxicidade (JOO & CHENG, 2006; QUAN et al. 2005; HAN, et al, 2004; ZHAO et al., 2004).

Fotocatalise heterogênea de poluentes orgânicos utilizando  $\text{TiO}_2$  nanoestruturado sob radiação UV e/ou luz solar tem demonstrado um ótimo desempenho em vários sistemas de remediação de solos contaminados. A adição de pequenas quantidades de  $\text{TiO}_2$  (0, 5, 1, 2 e 3 %m/m) aumentou significativamente a fotodegradação de *p,p*-DDT em solo, sendo que o pH do solo, fluxo de fótons e substâncias húmicas presentes também influenciaram o processo de degradação fotocatalítico (ZHAO et al. 2004; JANG et al. 2005).

O tratamento fotocatalítico utilizando  $\text{TiO}_2$  combinado com a luz solar apresentou resultados positivos na degradação de pesticidas como Diuron em solo contaminado, sendo que a taxa de degradação notavelmente mostrou-se dependente da intensidade de radiação (KATSUMATA et al. 2009).

Os solos contaminados com atrazina, 2-clorofenol, 2,7-diclorodibenzodioxina foram misturados com  $\text{TiO}_2$  e expostos a radiação UV. Os contaminantes orgânicos foram destruídos em um tempo relativamente curto (MCMURRAY, et al. 2006; WEBER, 2007). Bifenilas policloradas (PCBs) presentes no solo podem ser efetivamente fotodegradadas em uma dispersão contendo surfactante aniônico fluorado e  $\text{TiO}_2$  (HUANG & HONG 2000). Em amostras de água,  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  apresentou eficiência na remoção de vários compostos presentes na gasolina como MTBE e hidrocarbonetos aromáticos (HU et al. 2008).

Giri e colaboradores (GIRI et. al. 2008), estudaram os processos de degradação do ácido 2,4-dicloroacético em solução aquosa com  $\text{O}_3/\text{UV}/\text{TiO}_2$  e compararam com sistemas usando  $\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$ , mostrando que quando combinados a velocidade de degradação é cerca de 1 a 2 vezes maior.

#### **2.4. Métodos analíticos para a determinação de poluentes orgânicos**

O trabalho de remediação de poluentes orgânicos em matrizes ambientais requer o desenvolvimento e/ou aplicação de metodologias adequadas para a obtenção de resultados seguros. Em análise de resíduos de poluentes orgânicos, a validação do método de ensaio ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperação a partir de amostras livres de interferentes utilizando as condições experimentais do método a ser validado.

Dentro da validação de um método, a especificidade representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca o (s) analito (s) de interesse na presença de componentes que poderiam interferir em sua determinação qualitativa e quantitativa.

Grandes esforços têm sido realizados no intuito de aprimorar a determinação de substâncias tóxicas a baixas concentrações utilizando principalmente metodologias analíticas que possam garantir a seletividade, especificidade e exatidão dos resultados.

### 2.4.1. Extração e “Clean-up”

Dentre as técnicas de extração normalmente utilizadas para isolar e concentrar analitos destacam-se: a extração líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid extraction*), a extração sólido-líquido (SLE, *Solid Liquid Extraction*), extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), micro extração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra magnética (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*) (CALDAS et al.,2011)

O método de **extração sólido-líquido** (SLE) consiste na dissolução do analito presente em uma amostra em um solvente apropriado. Um exemplo da extração SLE utilizado em situações específicas é a extração Soxhlet. As extrações SLE, embora muito utilizadas, apresentam uma série de inconvenientes quando comparadas a outros métodos. Frequentemente, são envolvidas etapas de ajuste de pH, uso de grandes volumes de solventes tóxicos, concentração do analito, quantidade grande de amostra, altas temperaturas para extração, colocando em risco a integridade do analito e são em geral processos demorados que originam resultados pouco quantitativos e de baixa seletividade.

O método Soxhlet é um dos mais antigos e normalmente utilizados na extração do analito de interesse de uma matriz.

Foi o procedimento de extração padrão por quase 90 anos, apesar de falhar em muitos dos itens de um método de extração considerado ideal, ou seja, uma operação com baixo custo e que não altere a composição química do analito.

Após o término, a extração produz um grande volume de solvente que na maioria das vezes necessita ser concentrada antes da análise. Em muitos casos, a SE não é seletiva, pois compostos interferentes podem ser extraídos pelo solvente escolhido e, assim, prejudicar a análise do(s) analito(s) de interesse.

A escolha do solvente controla o poder de solvatação e também a temperatura de extração. Nestas condições a integridade do analito pode ser alterada, ocorrendo degradação térmica.

Um das maiores desvantagens desse método é a utilização de grandes volumes de solventes orgânicos de alta pureza, o que eleva o custo do procedimento analítico.

Em trabalhos quantitativos, deve ser tomado extremo cuidado para evitar a introdução de contaminantes e para minimizar perdas nas transferências de amostras e trocas de solventes (ANDERSON, 1987).

A extração em fase sólida (SPE) é baseada na cromatografia líquida de baixa pressão, consistindo de uma pequena coluna preenchida com um determinado adsorvente. A técnica é empregada tanto para a análise de analitos polares como para não polares, porém a amostra e o analito devem estar dissolvidos em um líquido. A SPE é utilizada para purificação da amostra, concentração de analitos e remoção de compostos de interesse de uma determinada matriz. As vantagens da técnica SPE com relação à extração líquido-líquido são: diminuição do uso e exposição a solventes tóxicos, metodologia adaptável à automação, menor tempo consumido e extrações que não estão sujeitas a formação de emulsão (WELLS & MICHAELS, 1987).

A SPE tem sido utilizada para a determinação de pesticidas em água, devido à necessidade de concentração destes compostos antes da análise cromatográfica. Os adsorventes mais usados são octadecyl (C-18) e mais recentemente também carbono grafitizado apresentando grande eficiência no processo de análises de água (SILVA & COLLINS, 2011).

A SPME foi introduzida em 1990. Nesta técnica, uma fibra de sílica fundida é coberta com a fase estacionária, geralmente de polidimetilsiloxano (PDMS), que é exposta à amostra aquosa por um determinado tempo, para que o equilíbrio seja alcançado e posteriormente o analito é desorvido pela fase móvel ou por aquecimento direto no injetor do cromatógrafo a gás.

A técnica SBSE foi introduzida em 1999 e baseia-se na extração sortiva sobre uma camada polimérica, que reveste uma barra de agitação magnética, ou seja, tem como base o mesmo princípio da SPME, com a diferença de utilizar maior volume de fase extratora. A DLLME foi desenvolvida em 2006 como avanço das técnicas de microextração em fase líquida, cujo método baseia-se no sistema ternário de solventes, que é uma miniaturização da LLE e utiliza microlitros de solvente extrator (DUROVIC et al. 2010; SILVA & COLLINS, 2011).

#### **2.4.2. Análise**

Devido à natureza complexa das amostras ambientais são indispensáveis poderosos métodos de separação tais como: Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a determinação analítica dos contaminantes.

A alta eficiência e velocidade de análise e fácil combinação com mecanismos de detecção tornam a Cromatografia Gasosa (GC) uma importante técnica analítica em determinações de resíduos de poluentes orgânicos em amostras ambientais. Uma das vantagens mais importantes da GC sobre outros métodos de separação é a disponibilidade de muitos mecanismos de detecção sensíveis e seletivos. Nos recentes anos, os detectores seletivos tem se tornado cada vez mais populares devido ao fato de diminuir o tempo na etapa de preparação de amostras como também o risco de identificações falsas. O uso de sistemas de detecção seletivos proporciona a determinação de compostos de interesse e diminuindo co-eluentes na etapa de análise.

As quantidades mínimas detectadas para vários detectores estão apresentadas na Tabela 1, estes valores representam a quantidade de um componente requerido para obter um pico com uma razão sinal/ruído (HYVER, 1989).

**Tabela 1:** Limites de detecção e intervalos lineares de vários detectores usados em Cromatografia Gasosa.

Detector	Quant. Mínima Detectada (g)	Intervalo de Linearidade
FID <sup>1</sup>	$5 \cdot 10^{-11}$	$10^6$
ECD <sup>2</sup>	$10^{-12}$	$10^4$
NPD <sup>3</sup>	$10^{-11}$	$10^3$
FPD <sup>4</sup>	$5 \cdot 10^{-12}$	$10^3$
MS <sup>5</sup>		
SIM	$10^{-12}$	$10^3$
“Full Scan”	$10^{-10}$	$10^3$

<sup>1</sup>Detector de ionização de Chama; <sup>2</sup>Detector de Captura de Elétrons; <sup>3</sup>Detector Nitrogênio-Fósforo; <sup>4</sup>Detector Fotométrico de Chama; <sup>5</sup>Spectrômetro de Massas.

Em alguns casos, como em técnicas cromatográficas, devem-se usar técnicas adicionais como cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrometria de massas (GC/MS; LC/MS), após os processos de extração e limpeza da matriz estudada. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (Vékey, 2001).

GC/MS é uma das principais ferramentas aplicadas em análise multiresíduo de poluentes por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente (BEZBARUAH et al., 1949).

Os baixos limites de detecção obtidos são consequência da alta seletividade promovida pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo SIM que tem sido utilizado para determinar resíduos de pesticidas em alimentos (RISSATO et al., 2005a, RISSATO et al.,b; RISSATO et al., 2007). Além disso, com a evolução dos analisadores de massas quadrupolos e *ion trap*, bem como seus softwares de aquisição e operação, contribuíram de maneira inquestionável em determinações de resíduo de poluentes orgânicos (CHIARADIA, et al., 2008).



Na seletividade, porém, interferências provenientes da matriz podem influenciar o resultado e a identificação dos analitos pode ficar comprometida. Recentes avanços em MS propõem um aumento da especificidade, a partir da exclusão dos íons dos interferentes da amostra. Uma maior seletividade também é observada quando se utiliza CI, entretanto, a informação relacionada à estrutura dos compostos que estão sendo analisados também é diminuída (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Basicamente, o GC/MS consiste de um cromatógrafo, geralmente com coluna capilar, uma interface que conecta os dois sistemas, uma câmara de ionização mantida sob vácuo, onde ocorre a separação dos íons e um sistema de detecção dos íons e interpretação dos dados.

Os íons que são formados, tanto por EI como por CI precisam ser separados de acordo com suas razões  $m/z$ . Há 4 classes de analisadores (filtros de massas), que são utilizados para selecionar e filtrar os íons, sendo eles: rádio frequência (tanto quadrupolo quanto trapeamento de íons); tempo de voo; Transformada de *Fourier* e setor magnético, sendo que os mais utilizados são a rádio frequência e o tempo de voo (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Os métodos de ionização mais empregados em GC/MS são ionização por impacto de elétrons (“electron ionization”) - IE e a ionização química (“chemical ionization”) – IQ (Vékey, 2001; Kitson, et al.1996). Na IE o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV).

As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ( $M^{+\bullet}$ ). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos (Ardrey, 2003; Kitson, et al., 1996). Isto consiste em um dos maiores problemas encontrados na aplicação de IE, pois a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela MS. A facilidade do acoplamento GC/MS, além da disponibilidade de um banco de espectros de massas padrão obtidos no modo de ionização por impacto de elétrons (*Electron Ionization*, EI) contribuíram para a disseminação da técnica GC-MS (LEANDRO et al., 2005).

#### **2.4.3. Validação de métodos analíticos**

A validação de métodos analíticos é o processo de estabelecimento de características de desempenho e limitações de um método, bem como a identificação das influências que podem alterar estas características e em qual extensão (EURACHEM, 2010). Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ISO/IEC 17025, 2005) a validação de métodos é um dos requisitos técnicos para a garantia da qualidade dos resultados analíticos.

Os parâmetros analíticos normalmente usados para a validação de métodos são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004).

#### **2.4.3.1. Especificidade e Seletividade**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes.

Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito, contendo estruturas semelhantes. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles.

#### **2.4.3.2. Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho**

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores da faixa podem ser os valores dos limites de detecção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações do analito na qual a sensibilidade pode ser considerada constante sendo normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. Os resultados obtidos precisam estar dentro da faixa de trabalho, e os valores que se encontrarem próximos ao limite inferior da faixa de trabalho necessitam ser diferentes dos brancos dos métodos (INMETRO, 2007).

### 2.4.3.3. Linearidade

A linearidade pode ser definida como a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis pode ser descrita como:

$$y = ax + b \quad (13)$$

Onde:

$y$  = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

$x$  = concentração;

$a$  = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

$b$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático.

Um valor de ( $r^2$ ) maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (ISO/IEC, 2005).

É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta (AOAC, 1999).

#### **2.4.3.4.Sensibilidade**

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito.

Pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração e pela equação de regressão linear e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

#### **2.4.3.5.Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)**

Na validação de um método analítico os resultados referentes tanto ao LD e LQ estão relacionados à sensibilidade do método desenvolvido. Ambos os limites podem ser calculados de três diferentes formas: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Um procedimento comum é aceitar como LD a concentração ou massa do analito que geram um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema. E para o cálculo do LQ considera-se aceitável uma relação sinal-ruído de 10:1. O LD pode também ser calculado considerando-se a regra da IUPAC de aproximadamente 3 desvios padrões e o LQ com base em 10 desvios padrões. No processo estatístico são considerados todos os efeitos a que o método está sujeito (variações do branco e variações das amostras fortificadas) (ICH Q 2B, 1996).

De acordo com o procedimento estatístico utilizado para análises de resíduos de pesticidas, por exemplo, o LQ corresponde ao menor nível de fortificação estudado. A recuperação pode variar entre 70 e 120%, com coeficiente de variação de até 20% (EURACHEM GUIDE, 2005; ISO/IEC, 2005).

#### **2.4.3.5.1. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro.

A exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionada à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, em triplicata. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (RIBANI et al., 2007, INMETRO, 2007).

#### **2.4.3.5.2. Precisão**

A precisão é um dos critérios mais relevantes na avaliação do desempenho de um procedimento analítico. Esse critério expressa a concordância entre vários resultados obtidos para uma mesma amostra, ou seja, avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas (INMETRO, 2001).

A precisão é normalmente determinada em termos de repetitividade (precisão intra-corrída), reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) e precisão intermediária.

Repetitividade é a precisão intra-corrída, ou seja, o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Todas as medições com o mesmo procedimento; mesmo analista; mesma instrumentação, dentro de um curto período de tempo. A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados sendo possível calcular o limite de repetitividade “*r*” que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra é significativa para um nível de confiança de 95%.

A reprodutibilidade refere-se à precisão avaliada sobre o mesmo método para a mesma amostra, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes variando uma das seguintes condições: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes tempos. A precisão intermediária é a concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A avaliação dessas três formas de precisão pode ser efetuada pelo cálculo do desvio padrão relativo (RSD, do inglês: *Relative Standard Deviation*), também conhecido como coeficiente de variação (CV). A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas (INMETRO, 2011; OLIVEIRA et al., .2009).

### 3. Justificativa e relevância da pesquisa

Métodos para limpar solos contaminados com POPs incluem incineração, dessorção, solidificação/vitrificação, fitorremediação, biorremediação e métodos eletrocinéticos. No entanto, uma vez que os custos envolvidos para alguns destes processos são muito elevados, estes métodos raramente são aplicados.

A fitorremediação é capaz de degradar poluentes orgânicos a concentrações inferiores às máximas aceitáveis pelo organismo humano e vem sendo usada na destruição de diversos Poluentes Orgânicos como pesticidas organoclorados em amostras de solo e águas subterrâneas. Além disso, essa técnica apresenta-se como uma das mais relevantes pela sua eficácia, imobilização do poluente em seus tecidos e no retorno financeiro, que pode ser obtido pela venda ou comercialização da biomassa gerada durante o período de descontaminação de determinada área.

Os materiais nanoestruturados quando aplicados de forma sistematizada e segura em processos de remediação de poluentes orgânicos têm apresentado resultados inovadores e eficientes. Uma vez que, comprovadamente moléculas de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado são passíveis de efeitos fotocatalíticos e reativos, sua aplicação frente a POPs pode indicar uma nova perspectiva em processos de recuperação de matrizes como água, solo e alimentos (ARANTEGUI, 1995).

Nas pesquisas realizadas e citadas em literatura um dos maiores problemas de estudos de técnicas fitorremediativas é o destino final das matrizes contaminadas utilizadas durante os experimentos. Além disto, grandes quantidades de solo muitas vezes precisam ser incineradas e/ou submetidas a tratamentos térmicos, o que limita o processo de seleção de plantas aptas a fitorremediação (FIGUEIREDO, 1994). Porém quando tais estudos utilizam técnicas de biotecnologia, como a cultura de tecidos *in vitro*, estes têm seus volumes e quantidades finais de resíduos diminuídos exponencialmente em relação a estudos realizados em casa de vegetação. Espécies de porte herbáceo, arbóreo ou florestal podem ser testadas previamente *in vitro*, estabelecendo normas relevantes como: relação de competência fitorremediativa, limites máximos de tolerância à toxicidade aos poluentes, avaliação de amostras em quantidades estatísticas muito maiores do que as de campo, adição de reguladores



do metabolismo e isolamento de variáveis como temperatura, luminosidade e pressão. Desta forma, a utilização de pequenas quantidades de material em estudos *in vitro* possibilita minimizar o descarte de resíduos gerados, custos econômicos, espaço físico, tempo de execução e respostas, e utilização de mão de obra envolvida. Frente a estas características a técnica de fitorremediação *In vitro*, proposta neste trabalho serviria a verificação de hipóteses, condições e testes de modelamento prático atuando na etapa piloto de um estudo fitorremediativo *in vivo*.

Uma vez que ambas as tecnologias de remediação, materiais nanoestruturados e plantas possuem elevado potencial para alcançarem bons resultados em processos remediativos de matrizes ambientais, seria de grande valor científico a avaliação desses processos em ambientes controlados.

Os resultados poderiam orientar futuros trabalhos de campo, aplicações tecnológicas, bem como processos de inovação agroindustrial na recuperação de recursos naturais contaminados e possíveis projetos de produção de energia e papel provenientes de fontes renováveis fitorremediadoras.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivos gerais

- Estabelecer um protocolo de cultura *in vitro* para os vegetais propostos (bambu e girassol) como possíveis fitoremediadores de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em matrizes ambientais.
- Avaliar os efeitos toxicológicos de TiO<sub>2</sub> em cultura de tecidos *in vitro*.
- Estudar o processo remediador de POPs em água utilizando material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub>.

### 4.2 Objetivos específicos

\* Desenvolvimento de um protocolo para culturas *in vitro* (bambus do gênero *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Guadua* girassol da espécie *Helianthus annuus* L. para a aplicação como fitoremediadores dos seguintes POPs: 2,4,5,6 Tetracloro-m-xileno,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, Aldrin, trans-chlordano, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, Clordano, Dieldrin, Endosulfan Alfa, Endosulfan Beta, Endosulfan sulfato, Endrin Aldeído, Endrin, Endrin cetona, Hexabromo benzeno, Heptacloro, Heptacloro epoxido, metoxicloro, Mirex e Decacloro Bifenila.

\* Estudo da degradação fotocatalítica de POPs em água com material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub> de uso comercial, P-25, DegussaCo, Alemanha.

## 5. Materiais e métodos

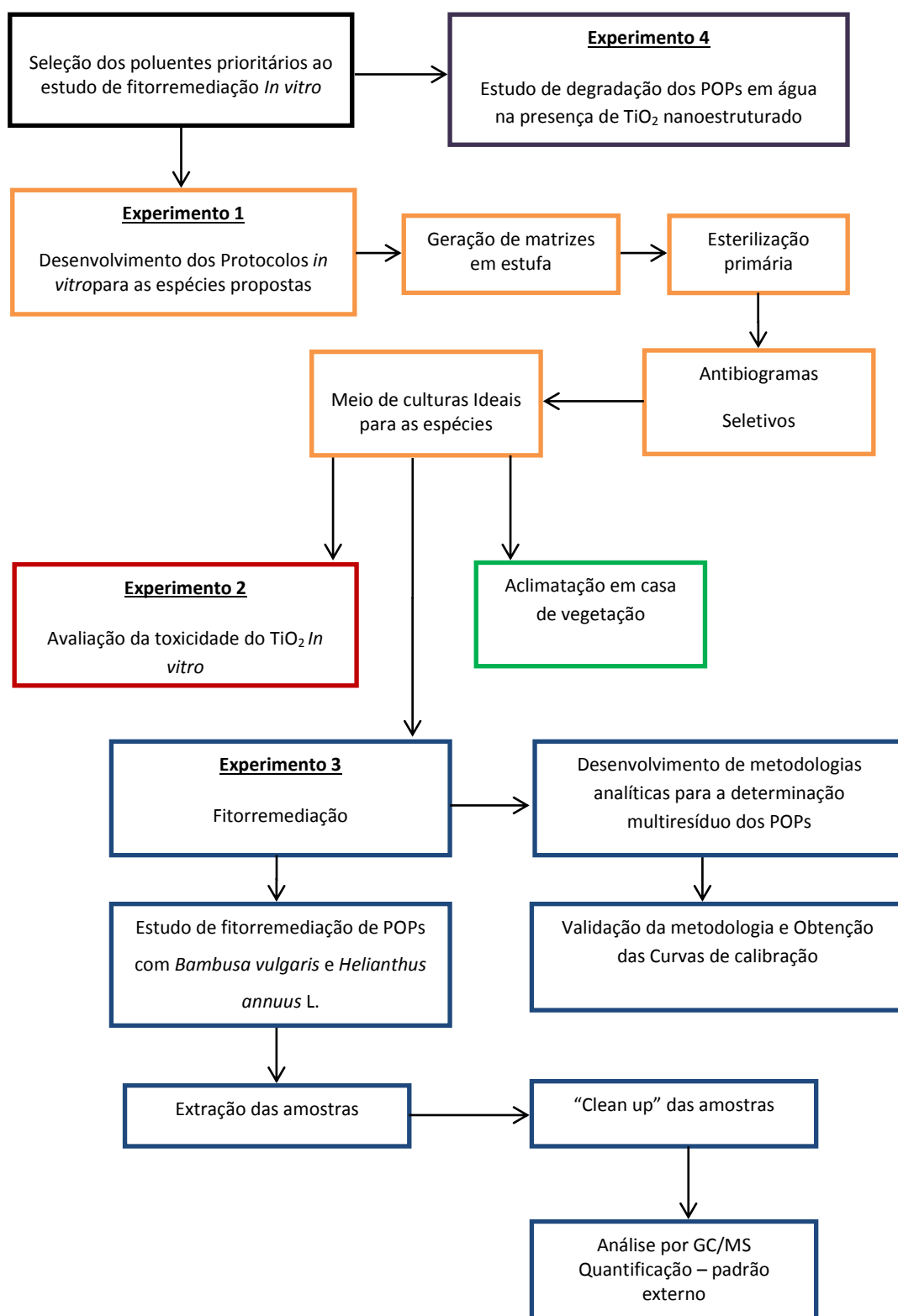
### 5.1. Delineação experimental do trabalho

O estudo da aplicação de técnicas de fitorremediação e catálise por material nanoestruturado de POPs em culturas vegetais *in vitro*, foi elaborado e subdividido em etapas distintas, afim de, possibilitar o isolamento de variáveis peculiares a cada etapa do trabalho que podem ser visualizadas no fluxograma da Figura 10.

Os vegetais selecionados para o estudo obedeceram aos critérios descritos por Burken, 2002, como sendo primordiais para os grupos mais propensos a processos fitorremediativos. Os dois vegetais escolhidos como possíveis candidatos aos testes *in vitro* foram bambu e girassol, sendo que ambos os grupos poderiam ser utilizados como fontes de biomassa para obtenção de energia e não seriam destinados a alimentação humana e/ou animal.

Dentre os grupos de bambus foram escolhidos aqueles mais propensos ao uso bioenergético como descrito por BRITO & TOMAZELLO, 1987, generalistas a condições climáticas e edáficas de plantio. A variedade de girassol selecionada, *Helianthus annuus* L. também, levou em consideração sua produção total de matéria seca em biomassa, seu farto desenvolvimento radicular e rápido crescimento vegetativo.

Avaliou-se também o possível efeito do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado frente as culturas *in vitro* que obtiveram sucesso no estabelecimento de seus protocolos. Este procedimento experimental visou verificar possíveis efeitos tóxicos e poluidores desta técnica em particular e prever sua aplicabilidade em ambiente natural e vegetado.



**Figura 10:** Fluxograma incluindo um resumo das principais etapas do presente trabalho.

Com o objetivo de apresentar todas as etapas experimentais desenvolvidas e suas padronizações de modo elucidativo, o trabalho foi dividido em experimentos distintos que se encontram descritos abaixo.

### **Experimento 1**

Estabelecimento de protocolos *in vitro* para cada um dos vegetais selecionados (bambu do gênero *Dendrocalamus ssp*, *Bambusa ssp*, *Guada ssp* e girassol *Helianthus annuus* L. propiciando adaptações a métodos existentes que culminaram em protocolo inédito na literatura e fornecimento de materiais vegetativos padronizados, aptos para os testes de fitotoxicidade e fitorremediação.

### **Experimento 2**

Teste de fitotoxicidade do material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub>, utilizando os vegetais que tiveram sucesso no estabelecimento de protocolos de cultura *in vitro* e que foram considerados aptos no experimento 1.

### **Experimento 3**

Testes de fitorremediação com os vegetais estudados que tiveram seus protocolos estabelecidos no experimento 1 na presença de poluentes orgânicos (POPS).

### **Experimento 4**

Teste de degradação dos POPs em água na presença de material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub> comercial P-25 (diâmetro de partícula: 25 nm, BET = 50 m<sup>2</sup>/g, 80% anatase e 20% rutilo, DegussaCo, Alemanha).

## 5.2. Reagentes

### Solventes:

Diclorometano (Merck, Alemanha) - grau pesticida;  
Acetona (Mallinckrodt Chem) - grau pesticida;  
Acetona (Chemis) - PA;  
Hexano (Fisher Scientific) - grau pesticida;  
Hexano (Mallinckrodt Chem), 95% n-hexano - grau pesticida;  
Acetato de Etila (Mallinckrodt Chem) - grau pesticida;  
Metanol (J.T. Baker) - grau pesticida;  
Etanol (J.T. Baker) – PA.

### Adsorventes

Sulfato de sódio anidro 60 mesh (J.T. Baker) - grau pesticida;  
Sulfato de sódio anidro (Chemis) –PA;

### Sais de cultivo vegetal

$\text{KNO}_3$ (Synth) - P.A.;  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (Synth) - P.A.;  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth) - P.A.;  
 $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Synth) - P.A.;  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Synth) - P.A.;  
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{H}_3\text{BO}_3$  P.A. (Synth) - P.A.;  
KI P.A. (Synth) - P.A.;  
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Synth) - P.A.;  
 $\text{FeSO}_4$ (Synth) - P.A.;  
Phytigel™. (Sigma Aldrich);

**Outros:**

Água purificada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

O mix de padrões de 24 pesticidas organoclorados foi adquirido da Absolute Standards na concentração  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tolueno/hexano [1:1, v/v] com pureza acima de 98 %.

**5.2.1. Preparação das soluções padrões.****5.2.1.1. Preparo das soluções de trabalho**

O preparo das soluções de trabalho foi baseado no método EPA 8270D. O mix de padrões de 24 pesticidas organoclorados foi adquirido da Absolute Standards na concentração  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tolueno/hexano [1:1, v/v] e foi utilizado no preparo da solução estoque.

As soluções de trabalho foram diluídas a partir da solução estoque com hexano/tolueno (1:1, v/v) e utilizadas nos estudos de recuperação e na obtenção das curvas de calibração (EPA, 1999).

**5.2.1.2. Solução de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).**

A solução de meio de cultura vegetal descrita como Meio MS, foi proposta Murashige e Skoog, em 1962, e consiste na mistura de quatro soluções: 100 mL de solução de macronutrientes, 5 mL de solução de micronutrientes vegetais, 10 mL de solução de ferro-EDTA e 10 mL de solução orgânica de vitaminas; acrescidos de 100 mg de mio inositol e 30 g de sacarose, como fontes de carboidratos. Depois de transferir todas as soluções para um balão volumétrico de 1 litro tendo seu volume ajustado com água destilada e o pH corrigido para 5,72, com solução de HCl 0,1 M e/ou solução de KOH 0,1 M.



**- Solução estoque de macronutrientes:**

A solução estoque de macronutrientes foi preparada em um balão de 1000mL utilizando água como solvente com os seguintes reagentes:

- KNO<sub>3</sub>: 15,20 g
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 13,20 g
- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 3,52 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2,96 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,36 g

**Solução estoque de micronutrientes**

A solução estoque de micronutrientes foi preparada em um balão de 1000mL utilizando água como solvente com os seguintes reagentes:

- MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O: 4,46 g
- ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1,72 g
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 1,24 g
- KI: 0,166 g
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,05 g
- CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,005 g
- CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,005 g

**Solução de Ferro-EDTA**

A solução de Ferro- ácido etilenodiamino tetra-acético foi preparada em um balão de 1000mL utilizando água como solvente com os seguintes reagentes:

- Na<sub>2</sub>EDTA: 3,72 g
- FeSO<sub>4</sub>: 2,78 g

**Solução estoque de vitaminas**

A solução aquosa de vitaminas é acrescentada aos meios de cultura para fornecer um aporte nutricional a células vegetais em seu primeiro estágio de desenvolvimento e foi preparada a partir de:

- Glicina: 2 mg mL<sup>-1</sup>.
- Ácido Nicotínico: 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.
- Piridoxin: 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.
- Tiamina: 1 mg mL<sup>-1</sup>.

### 5.3. Remediação

Os vegetais selecionados para o estudo de remediação obedeceram aos critérios descritos por Burken, 2002, como sendo primordiais na seleção dos grupos mais susceptíveis a suportar de maneira eficaz processos remediativos. Os dois vegetais selecionados para os testes *in vitro* foram bambu e girassol, que podem também ser empregados como fonte de biomassa para obtenção de energia e via de regra não são destinados a alimentação humana e/ou animal.

Dentre os grupos de bambus foram selecionados aqueles mais propensos à utilização bioenergética como descrito por Brito & Tomazelo, 1997. As espécies foram estrategicamente selecionadas por apresentarem características generalistas a condições climáticas e edáficas de plantio. Com relação à variedade de girassol, *Helianthus annuus L.*, utilizada nos testes, alguns parâmetros norteadores foram considerados tais como: a produção total de matéria seca em forma de biomassa, farto desenvolvimento radicular e rápido crescimento vegetativo.

Em uma etapa posterior, foi possível observar os efeitos do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado em culturas *in vitro*, os quais foram de grande utilidade na avaliação da toxicidade deste material e dos prognósticos de aplicabilidade em ambiente natural e de vegetação exuberante. Além disso, este experimento possibilitou o estabelecimento dos protocolos de remediação a serem desenvolvidos para o cultivo de cada cultura *in vitro*.

#### 5.3.1. Experimento 1: Estabelecimento dos protocolos de micropropagação

Esta etapa experimental visou estabelecer protocolos específicos para cada um dos vegetais propostos nesse trabalho. Para a definição dos protocolos a serem aplicados às diferentes matrizes, algumas etapas preliminares foram inseridas com o

objetivo de testar, reproduzir e validar os resultados obtidos. Conforme as etapas 1 a 3, abaixo relacionadas.

**Etapa 1:** nesta primeira fase, um jardim somaclonal de matrizes foi cultivado e as espécies mantidas em ambiente com luminosidade, temperatura e umidade controladas para que fossem obtidos explantes e ramos saudáveis e serem utilizados como fonte fidedigna de células indiferenciadas aptas a clonagem e geração dos canteiros de mudas *in vitro*.

**Etapa 2:** diferentes métodos de assepsia e desinfecção do material vegetal (sementes e explantes) foram testados com vistas à obtenção das matrizes a serem cultivadas em casa de vegetação. Esta etapa foi imprescindível, pois existem elevadas variedades e possibilidades na introdução de contaminantes endógenos em tecidos vegetais e por estarem em ambiente controlado podem ser introduzidos como fontes de inócuo contaminantes biológicos (fungos e bactérias).

**Etapa 3:** após o estabelecimento de um protocolo eficaz com vistas a desinfecção dos explantes e sementes seguiu-se o estudo visando estabelecer meios de cultura ideais a serem usados como suporte e nutrientes para o cultivo *in vitro*. Foram priorizados em cada meio de cultura, seus respectivos balanceamentos nutricionais e hormonais, bem como as demais condições de desenvolvimento das mudas. Os parâmetros estudados e otimizados foram: temperatura, luminosidade e tempo de residência para que a relação crescimento da planta x remediação fosse máxima.

#### **5.3.1.1. Etapa 1. Procedimentos para geração de matrizes: explantes vegetais lenhosos de bambus**

As mudas foram confeccionadas por sistema vegetativo de ramos laterais primários e colmos (Figura 11) dos três gêneros em estudo (*Dendrocalamus* Figura 12, *Guada* e *Bambusa*). Estas mudas foram plantadas em vermiculita de granulação média expandida e solução nutritiva para hidropônia, solução de Hoagland & Arnon, 1950. Estas mudas foram acondicionadas em casa de vegetação em ambiente controlado de temperatura e umidade de 30° Celsius e 60%, respectivamente. A área foi sombreada com 50% de luminosidade e a irrigação feita diariamente por gotejamento de ferti-irrigação com a solução.



**Figura 11:** Gema de ramo lateral e Gema de Colmo de *Bambusa Vulgaris* var. *Vitatta*.



**Figura 12:** Moita madura de Bambu *Dendrocalamus Giganteus*, da Fazenda Experimental do laboratório de Experimentação de Bambus Faculdade de Engenharia, UNESP de Bauru.

Após transcorridos 3 meses do plantio destas mudas, notou-se o brotamento lateral e o aparecimento de diversas gemas caulinares com tecido meristemático de crescimento. Os brotos (Figura 13) ricos em células meristemáticas não diferenciadas foram seccionados por incisão feita com uma lamina de bisturi devidamente esterilizada. Outras partes da planta, reconhecidamente promissoras com vistas à regeneração como ramos laterais (Figura 11) e ápices dos colmos foram submetidas aos procedimentos de esterilização.



**Figura 13** Broto com 2 semanas de brotação estágio em que realizaram as obtenções de células meristemáticas.

### **5.3.1.2. Etapa 2. Procedimentos de exterização e desinfecção**

#### **5.3.1.2.1. Procedimentos gerais de esterilização das gemas caulinares**

O desenvolvimento desta etapa foi realizado em estacas provenientes de ramos laterais, ápices de colmos e de sementes de girassol *Helianthus annuus* L.

Cada uma das partes dos materiais vegetais foi submetida a uma etapa de lavagem com água corrente utilizando escova de cerdas macias, permanecendo em solução de detergente neutro por 5 min.. Após esse tratamento de esterilização prévia para todas as espécies testadas foram adotados os seguintes protocolos experimentais de desinfecção generalista e primária:

### **Procedimento 1: Desinfecção**

Após o procedimento de lavagem em água corrente as plantas foram colocadas em sistema de pré-esterilização, que consistiu de uma solução de hipoclorito de Cálcio 30 %.

Como objetivo de eliminar patógenos e manter a integridade da planta foi realizado um estudo da influência do tempo de contato com a solução em diferentes tempos de permanência: 15, 20, 30 e 40 min..

Com vistas a completar o processo de desinfecção, os explantes foram transferidos para uma solução alcoólica de 70%, v/v. Um estudo similar visando otimizar a influência do tempo de contato da planta com a solução alcoólica foi realizado em 5, 10, 15 e 20 min.; buscando encontrar equilíbrio entre eliminação de prováveis fungos presentes, e manter a integridade da planta em relação a desidratação. Logo em seguida, os explantes foram submetidos à tríplice lavagem com água destilada e esterilizada e transferidos para um frasco também esterilizado contendo 20 mL de uma solução de Benomil (Benlat®) nas concentrações de 0,1%, 1% e 10% por 15 min., para completar o protocolo de desinfecção da planta.

### **Procedimento 2: Desinfecção utilizando cloreto de mercúrio (II)**

Os explantes submetidos ao estudo descrito no procedimento 1 foram então transferidos para um frasco esterilizado contendo 20 mL de uma solução de cloreto de mercúrio (II) seguindo procedimento realizado por Nadgir e colaboradores (NADGIR, et al., 1984) na concentração de 0,5% por 5 min. Este procedimento por ser reconhecido na área como seguro e eficaz, foi utilizado como referência de desinfecção durante todo desenvolvimento no presente trabalho.

### **Procedimento 3: Desinfecção por métodos combinados**

Devido às características peculiares da matriz e visando aprimorar o sistema de desinfecção, o presente método que utiliza controle de temperatura e pressão que normalmente é aplicado a outras matrizes como essências florestais e de

plantas lenhosas e micropropagadas (MC COMB & BENNETT, 1986) foi utilizado nas seguintes condições:

- A- Tratamento térmico com solução de hipoclorito de Cálcio nas seguintes concentrações: 10, 15, 20, 30 e 40%, (v/v). Um estudo visando otimizar o tempo de pré-esterilização foi realizado a 5, 10, 15 e 20 min. na temperatura de 50 °C visando evitar degradação de enzimas. Os explantes foram então sujeitos a tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.
- B- As amostras provenientes do item A foram transferidas para um frasco contendo 20 mL de solução de benomil nas concentrações de 0,1, 1 e 10% sob a pressão negativa de 0,01, 0,02 e 0,03 atm., de maneira semelhante, procedeu-se a otimização do tempo de esterilização em 5, 10, 15 e 20 min. Em seguida os explantes sofreram tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.
- C- Posteriormente, os explantes foram submetidos a banho de água esterilizada (tríplice lavagem) onde foram testadas condições de vácuo nas mesmas pressões 0,01, 0,02, 0,03 com estudo de variação de tempo em 5, 10, 15 e 20 min.

#### **Procedimento 4: Desinfecção por método combinado reverso**

De maneira similar e devido às dificuldades de migração axial de moléculas com capacidade de eliminação de fungos e/ou bactérias, uma adaptação ao método descrito no ítem 3 foi testada nas seguintes condições:

- A- As amostras foram transferidas para um frasco contendo 20 mL de solução de benomil nas concentrações de 0,1, 1 e 10% (m/v) sob a pressão negativa de 0,01, 0,02 e 0,03 atm. de maneira semelhante, procedeu-se a otimização do tempo de esterilização em 5, 10, 15 e 20 min. Em seguida os explantes sofreram tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.
- B- As amostras provenientes do ítem A sofreram tratamento térmico com solução de hipoclorito nas seguintes concentrações: 10, 15, 20, 30 e 40%, (v/v).



Um estudo visando otimizar o tempo de pré-esterilização foi realizado a 5, 10, 15 e 20 min. na temperatura de 50 °C com objetivo de evitar degradação de enzimas. Os explantes foram então sujeitos a tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.

C- Posteriormente, os explantes foram submetidos a banho de água esterilizada (tríplice lavagem) onde foram testadas condições de vácuo na pressão 0,03 atm. com estudo de variação de tempo de 5, 10, 15 e 20 min.

### **Procedimento 5 de desinfecção**

Devido às características peculiares da matriz utilizada e visando aprimorar o sistema de desinfecção, uma variação do método 3 foi desenvolvida nas seguintes condições:

- A- Tratamento térmico com solução de hipoclorito nas seguintes concentrações: 10, 15, 20, 30 e 40% (v/v). Um estudo para otimizar o tempo de pré-esterilização foi realizado a 5, 10, 15 e 20 min. a temperatura de 50 °C visando evitar degradação de enzimas. Os explantes foram então sujeitos a tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.
- B- As amostras provenientes do item A foram então transferidas para um frasco contendo 20 mL de solução de benomil nas concentrações de 0,1, 1 e 10% sob a pressão negativa de -10, -15 e -20 Hg e de maneira semelhante, procedeu-se a otimização do tempo de esterilização em 5, 10, 15 e 20 min. Em seguida os explantes sofreram tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.
- C- Transferiu-se então os explantes para um frasco contendo 20 mL de solução alécoolica a 70 e 80% (v/v), sendo realizado um estudo em 5, 10 e 15 min. de exposição, e em seguida por tríplice lavagem sob vácuo de 0,03 atm por 5 min.

Todos os estudos desenvolvidos para desinfecção foram então aplicados a todas as 6 espécies dos três gêneros utilizados. Após estes procedimentos as estacas foram levadas a inoculação em câmara estéril como segue:

#### **5.3.1.2.1.1. Inoculação das estacas**

Após a etapa de esterilização, as estacas foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado com adição de 30 g de sacarose e solução orgânica de vitaminas e aminoácidos, descritas no item soluções. A utilização deste meio de cultura aliado ao procedimento experimental teve como objetivo manter a integridade da planta facilitando a detecção de possíveis contaminantes remanescentes, como fungos e bactérias residuais provenientes de desvios não controlados na etapa de desinfecção.

#### **5.3.1.2.2. Procedimentos específicos: avaliação de diferentes antibiogramas**

Devido à possibilidade estatística de contaminação em qualquer amostra desta natureza, foi utilizado um procedimento de controle específico para os contaminantes resistentes aos protocolos primários de desinfecção. Foram então selecionadas diferentes classes de antibióticos a fim de desenvolver um estudo baseado em antibiograma seguindo metodologia preconizada por Kirby-Bauer e por proposta por Stukus, 1997. Discos de papel, 60, de filtro de 1 cm de diâmetro foram previamente auto clavados, sendo em seguida secos em estufa a 50 °C e transferidos para um copo Becker com 30 mL de solução de antibióticos de diferentes classes, visando um amplo espectro de atividade bacteriana agrupados conforme a relação abaixo:

**1-grupo dos betalactamos:** Ampilicilina 10 µg; Carbecilina 10 µg; Cefalosporina 10 µg; Amoxicilina 25 µg.

**2- grupo do aminoglicosídeos:** Estreptomomicina 10 µg; Nomicina 10 µg; Canamicina 30 µg; Gentamicina 10 µg.

**3- grupo dos macrolídeos:** azitromicina 10 µg; eritromicina 10 µg.

**4- grupo das quinolonas:** ciprofloxacina 10 µg e a norfloxacina 10 µg.

**5- grupo das tetraciclina:** foram utilizados os produtos comerciais terramicina 10 µg e a vibramicina 10 µg.

### **5.3.1.3. Etapa 3. Avaliação de diferentes tipos de meio de cultura *in vitro***

#### **5.3.1.3.1. Bambu**

A regeneração das espécies de bambu *in vitro* foi realizada seguindo as escassas recomendações encontradas na literatura e a partir destes textos refazendo protocolos com pequenas modificações.

#### **Protocolo 1**

Inicialmente, utilizou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) por ser de uso comum na área da cultura *in vitro* e por produzir efeitos considerados bons para outras matrizes. Com os resultados preliminares foram introduzidas modificações como adição de 30,0 g de sacarose e solução orgânica de vitaminas e aminoácidos, mio-inositol e Agar na concentração de 7,0 g L<sup>-1</sup>.

Uma alíquota de 25 mL do meio de cultura como descrito acima, foi transferido para frascos de vidro sodado que foram autoclavados por 15 min. a 1,2 atm e 121 °C. Ao final do processo, os frascos foram resfriados por 24 h ainda dentro da autoclave e cada um deles foi assepticamente inoculado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, seguido de luz ultravioleta por pelo menos 15 min. antes do procedimento.

O procedimento de inoculação consistiu em transferir 5 explantes de cada tipo sendo: ramos laterais, primários, secundários, terciários e meristemas de brotos devidamente repicados e previamente esterilizados conforme protocolo anteriormente testado e validado, cujo teor encontra-se com descrição e procedimento judicial em andamento, visando solicitação de patente. Os explantes inoculados foram então submetidos inicialmente a uma etapa de ausência de luz por (48 h) sendo o estudo desenvolvido em fotoperíodos de 10, 12, 14 e 16 h de luz e as demais horas para completar o ciclo diário em ambiente escuro. A temperatura durante todo o estudo foi de 25 °C. Além disso, foram executadas as seguintes modificações no método: diminuição da concentração de micro, macro nutrientes em 25, 50 e 75%, combinados também com a diminuição de sacarose em quantidades de 0,0; 7,0; 5,0; 15,0; e 20,0; g de sacarose por litro.

## **Protocolo 2**

O protocolo 2 baseou-se na utilização do meio de cultivo denominado RM conforme descrito no item preparo de soluções de trabalho. Foram estudadas diferentes padrões de tempo de iluminação diária como 6, 8, 10 e 12 h.

Por se desconhecer as condições ideais de regeneração e o comportamento dos tecidos averiguados quanto à fotoblastia e/ou fotooxidação, foi testado outra condição quanto a iluminação, que consistiu em manter escuro total, por 7 dias dos explantes inoculados e posteriormente, transferi-los para ambiente iluminado de 8 h/dia.

## **Protocolo 3**

Este protocolo foi desenvolvido com o meio de cultura preconizado por Morh e Hoagland & Arnon, 1950, que sofreu modificações pela adição de solução de macro e micro nutrientes em concentrações de 2,5; 5 e 10%.

#### **Protocolo 4**

Utilização dos meios **MS 3**, descrito no item preparo de soluções do presente trabalho. Ao meio foram acrescentados 250 mL. L<sup>-1</sup> de água de coco e diferentes concentrações de macro e micro nutriente (25, 50 e 75%), visando o estudo e encontrar a melhor combinação de concentração destes e o desenvolvimento adequado dos explantes.

#### **Protocolo 5**

Somente as variações nas concentrações de macro e micronutrientes, os tipos de meio e os aditivos orgânicos como vitaminas e diferentes fontes de carboidrato, podem não ser suficientes para promover uma regeneração ou ativação das células meristemáticas de um vegetal. Com o intuito de estudar possíveis estimulantes para re-diferenciação de células totipotentes presentes nos tecidos dos explantes, foram adicionados diferentes relações de concentrações, utilizando dois tipos diferentes de hormônios vegetais das classes auxinas e cinetinas. As tabelas a seguir apresentam os protocolos utilizados para caracterizar os estudos dos balanceamentos realizados.

Utilização de meio MS1 e MS 3 com diferentes quadrados latinos de concentração de auxinas e cinetinas conforme um planejamento experimental (Tabelas 2, 3 e 4).

Testou-se ainda a variação da combinação de outros tipos de auxinas e cinetinas, a fim de se averiguar, possíveis seletividades quanto ao tipo de fonte hormonal nos vegetais estudados. Utilizaram-se os hormônios 2,4 D, como fonte de auxina e giberilina, como fonte de cinetinas. Foram ainda, testadas as seguintes combinações, ANA/giberilina e 2,4 D/ BAP.

Todas estas combinações utilizaram dos mesmos quadrados latinos como descritos nas Tabelas 2, 3 e 4.

### Combinação 1

**Tabela 2** – Quadrado latino de combinações de concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) variando de 0,0 a 10,0 mg, para os hormônios auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudos realizados em triplicata.

<b>AIA→</b>	0,0 mg	2,0 mg	4,0 mg	6,0 mg	8,0 mg	10,0 mg
<b>BAP</b>						
0,0 mg	0,0/0,0	2,0/0,0	4,0/0,0	6,0/0,0	8,0/0,0	10,0/0,0
2,0 mg	0,0/2,0	2,0/2,0	4,0/2,0	6,0/2,0	8,0/2,0	10,0/2,0
4,0 mg	0,0/4,0	2,0/4,0	4,0/4,0	6,0/4,0	8,0/4,0	10,0/4,0
6,0 mg	0,0/6,0	2,0/6,0	4,0/6,0	6,0/6,0	8,0/6,0	10,0/6,0
8,0 mg	0,0/8,0	2,0/8,0	4,0/8,0	6,0/8,0	8,0/8,0	10,0/8,0
10,0 mg	0,0/10,0	2,0/10,0	4,0/10,0	6,0/10,0	8,0/10,0	10,0/10,0

### Combinação 2

**Tabela 3**– Quadrado latino de combinações de concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) variando de 1,2 a 2,0 mg para os hormônios auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudos realizados em triplicata.

<b>AIA →</b>	1,2 mg	1,4 mg	1,6 mg	1,8 mg	2,0 mg
<b>BAP</b>					
1,2 mg	1,2/1,2	1,4/1,2	1,6/1,2	1,8/1,2	2,0/1,2
1,4 mg	1,2/1,4	1,4/1,4	1,6/1,4	1,8/1,4	2,0/1,4
1,6 mg	1,2/1,6	1,4/1,6	1,6/1,6	1,8/1,6	2,0/1,6
1,8 mg	1,2/1,8	1,4/1,8	1,6/1,8	1,8/1,8	2,0/1,8
2,0 mg	1,2/2,0	1,4/2,0	1,6/2,0	1,8/2,0	2,0/2,0

### Combinação 3

**Tabela 4** - Quadrado latino de combinações de concentrações (mg.L<sup>-1</sup>) variando de 3,0 a 10,0 mg para os hormônios auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudos realizados em triplicata.

AIA→	3,0 mg	4,0 mg	5,0 mg	6,0 mg	8,0 mg	9,0 mg	10,0 mg
<b>BAP</b>							
3,0 mg	3,0/3,0	4,0/3,0	5,0/3,0	6,0/3,0	7,0/3,0	8,0/3,0	10,0/3,0
4,0 mg	3,0/4,0	4,0/4,0	5,0/4,0	6,0/4,0	7,0/4,0	8,0/4,0	10,0/4,0
5,0 mg	3,0/5,0	4,0/5,0	5,0/5,0	6,0/5,0	7,0/5,0	8,0/5,0	10,0/5,0
6,0 mg	3,0/6,0	4,0/6,0	5,0/6,0	6,0/6,0	7,0/6,0	8,0/6,0	10,0/6,0
7,0 mg	3,0/7,0	4,0/7,0	5,0/7,0	6,0/7,0	7,0/7,0	8,0/7,0	10,0/7,0
8,0 mg	3,0/8,0	4,0/8,0	5,0/8,0	6,0/8,0	7,0/8,0	8,0/8,0	10,0/8,0
9,0 mg	3,0/9,0	4,0/9,0	5,0/9,0	6,0/9,0	7,0/9,0	8,0/9,0	10,0/9,0
10,0 mg	3,0/10,0	4,0/10,0	5,0/10,0	6,0/10,0	7,0/10,0	8,0/10,0	10,0/10,0

#### 5.3.1.3.2. Para o girassol

Com o objetivo de desenvolver/adaptar o conhecimento adquirido para o bambu e aplicá-lo no cultivo *in vitro* de semente de girassol, inicialmente foi utilizado 1 litro do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) que após algumas adaptações mostrou-se interessante para o cultivo de explantes de bambu por ser de uso comum na área da cultura *in vitro* e por produzir efeitos considerados adequados para outras matrizes. Com os resultados preliminares foram introduzidas as seguintes modificações; adição de 100 mg de mioinositol, 30 g de sacarose, 10 mg de tiamina, 20 mg de glicina, 50 mg de piridoxina e 50 mg de ácido nicotínico.

Com o objetivo de aumentar o grau de entrecruzamento das proteínas no meio de cultura e promover sua polimerização, foram adicionados 2,62 g de Phitagell por litro de meio de cultura e finalmente o pH da solução foi ajustado para 5,72. Todas as soluções foram então auto-clavadas por 15 min. a 121 °C e 1,5 atm.

A este meio foram adicionados a cada três frascos, uma quantidade específica e balanceada entre citocinas e auxinas, filtradas com uso de filtro de membrana milipore<sup>tm</sup> 0,45 µm, nas concentrações citadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Quadrado latino de combinações de concentrações (mg.L<sup>-1</sup>) variando de 0,0 mg a 10,0 mg para os hormônios auxinas (Ácido Indol Acético – AIA) e citocinina (Benzol Amino Purina – BAP). Estudos realizados em triplicata.

AIA→	0,0 mg	2,0 mg	4,0 mg	6,0 mg	8,0 mg	10,0 mg
<b>BAP</b>						
0,0 mg	0,0/0,0	2,0/0,0	4,0/0,0	6,0/0,0	8,0/0,0	10,0/0,0
2,0 mg	0,0/2,0	2,0/2,0	4,0/2,0	6,0/2,0	8,0/2,0	10,0/2,0
4,0 mg	0,0/4,0	2,0/4,0	4,0/4,0	6,0/4,0	8,0/4,0	10,0/4,0
6,0 mg	0,0/6,0	2,0/6,0	4,0/6,0	6,0/6,0	8,0/6,0	10,0/6,0
8,0 mg	0,0/8,0	2,0/8,0	4,0/8,0	6,0/8,0	8,0/8,0	10,0/8,0
10,0 mg	0,0/10,0	2,0/10,0	4,0/10,0	6,0/10,0	8,0/10,0	10,0/10,0

### 5.3.2. Experimento 2

#### 5.3.2.1. Estudo da fitoxidade do material nanoestruturadoTiO<sub>2</sub>

A incorporação de aditivos químicos a culturas *in vitro* pode levar à necrose e ao não desenvolvimento dos vegetais. Existem estudos na literatura que sugerem um atraso significativo no desenvolvimento em plantas submetidas à exposição de material nanoestruturado de carbono (SHEN et. al. 2010).



Com base nesta realidade, o experimento 2 teve como meta estudar o efeito e a compatibilidade das nanoestruturas de TiO<sub>2</sub> com as culturas propostas, sendo descartadas as que geraram insucesso e implementadas as compatíveis que tiveram seus respectivos protocolos padrões estabelecidos no experimento 1.

Neste sentido os protocolos foram repetidos seguindo as especificações de desinfecção e quantidades de nutrientes e hormônios anteriormente estabelecidos para cada uma das culturas.

Para a cultura de bambus da espécie *Bambusa vulgaris var. vitatta*, a única espécie de bambu que obteve sucesso em todas as fases de desenvolvimento dos protocolos foi preparada em meio de cultura MS padrão e ao final foram adicionados 0,05 mg de Hormônio Benzol Amino Purina - BAP e 0,1 mg do hormônio auxina - 2,4 D por litro de solução.

Os explantes escolhidos, ramos laterais de galhos primários foram desinfetados de possíveis microrganismos com solução de 70 % de hipoclorito de cálcio (v/v). Com o intuito de promover a percolação axial da solução devido aos problemas de impermeabilidade radial da matriz em estudo, os explantes foram transferidos para um copo Becker de 50 mL e submetidos a vácuo em uma câmara apropriada por 5 min. a 0,03 atm.; seguido de tríplice lavagem com água destilada auto clavada e adicionados 5,0 mgL<sup>-1</sup> de benomil.

A este meio de cultura foram adicionadas partículas nanoestruturadas de TiO<sub>2</sub> nas concentrações por litro de meio: 0 mg (grupo controle), 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 50,0; 100,0 e 200,0 mg. Foram preparados 15 frascos contendo 30 mL de meio por vidro para cada grupo.

Após adicionar estas quantidades a cada um dos grupos, os explantes previamente desinfetados foram inoculados em ambiente estéril que consistiu de uma capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, seguido de luz ultravioleta por pelo menos 15 min. antes do procedimento. O procedimento de inoculação consistiu em transferir 5 explantes de cada tipo sendo ramos laterais primários. Estes explantes foram mantidos sob as seguintes condições de temperatura e luminosidade: 25 ± 2 °C e 8 h que corresponde a 400 Watt/h, respectivamente.

Transcorridos 30 dias, as mudas remanescentes produzidas em todos os grupos foram retiradas dos frascos e tiveram suas partes aéreas e radiculares avaliadas. Os resultados foram comparados ao grupo controle.

### **5.3.3 Experimento 3. Estudo de fitorremediação de POPs com *Bambusa vulgaris* var. *vitatta* e Girassol *Helianthus annuus* L.**

Neste experimento foram avaliados efeitos fitorremediativos das plantas de bambu (*Bambusa vulgaris* var. *vitatta*) e girassol (*Helianthus annuus* L.) cultivadas *in vitro*. À estes explantes foi aplicado o protocolo de maior eficiência geral encontrado no experimento 1.

Foram preparados 2,5 L de cultura MS padrão, sendo utilizado 1 L para cada grupo vegetal selecionado. A cada um destes foram adicionada a mistura padrão dos 24 POPs na concentração de 2 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram então inoculados os explantes previamente esterilizados e sob fluxo laminar em ambiente estéril conforme protocolo padrão de procedimento desenvolvido. Os frascos foram mantidos nas condições de temperatura e luminosidade do protocolo de estudo para estas amostras.

Transcorridos 30 dias as mudas foram colhidas, separadas em partes aéreas e radiculares e secas a temperatura ambiente em dessecador contendo sílica gel sob vácuo.

Posteriormente, as amostras foram pesadas, trituradas, peneiradas, embaladas em frascos de polietileno e armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento da extração, que não ultrapassou 72 h.

### 5.3.4. Experimento 4 – Estudo do efeito de remediação do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado em água contaminada com POPs

Essa etapa consistiu em avaliar a eficiência do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado na remediação de uma amostra de água contaminada com 24 POPs na concentração de 1 µg.mL<sup>-1</sup>. O material nanoestruturado de TiO<sub>2</sub> comercial P-25 possuía as seguintes características: diâmetro de partícula: 25 nm, BET = 50 m<sup>2</sup>/g, 80% anatase e 20% rutilo, DegussaCo, Alemanha. Este estudo teve a finalidade de avaliar interferências do material nanoestruturado no processo de degradação dos POPs (Tabela 6).

**Tabela 6:** Condições testadas no estudo de degradação de POPs em água utilizando TiO<sub>2</sub>.

Teste	pH	Concentração de TiO <sub>2</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )*	Tempo (min)	λ (nm)
1	7,0	0,50	30,0	290- 400
2	7,0	0,50	60,0	290- 400
3	7,0	0,25	60,0	290 - 400
4	7,0	0,25	30,0	290-400

\*mg de TiO<sub>2</sub> por mL de amostra

### 5.3.5. Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação dos POPs em amostras de plantas e água

#### 5.3.5.1. Lavagem da vidraria

Com o objetivo de eliminar possíveis interferentes, toda a vidraria utilizada foi lavada e tratada de modo sistemático com a seguinte sequência: água corrente, imersão por aproximadamente 12 h em solução aquosa 10% de detergente *Extran*

alcalino, água corrente, água destilada e água purificada em sistema *Milli-Q*. Todo o material foi então enxaguado com pequenas porções de acetona e levado à estufa a 150 °C por 1 h.

Os solventes usados na diluição dos extratos e no preparo das soluções padrão foram adicionados aos frascos e analisados por GC/MS para a avaliação do branco. Este procedimento foi realizado durante toda a execução dos experimentos a fim de manter a qualidade dos resultados e detectar possíveis contaminantes que pudessem de alguma forma interferir nos resultados finais.

#### **5.3.5.2. Equipamentos usados**

- Cromatógrafo à Gás da Agilent Technologies serie 7890A acoplado a um Espectrômetro Massa da Agilent Technologies serie 5975C.
- Sistema Milli-Q Plus (Millipore);
- Bomba de vácuo;
- Rotaevaporador.

### 5.3.5.3. Extração e “clean-up” das amostras de plantas e água

#### a) Plantas

##### -Extração

10,0 g da amostra triturada (préviamente seca em estufa a 60 °C por 2 h) foram transferidos para um copo Becker e submetidos a um processo de extração utilizando 50 mL de uma mistura de n-hexano/tolueno (50/50; v/v) em banho de ultrassom por 5 min.

O extrato resultante foi em seguida filtrado em funil de Buchner utilizando papel de filtro Whatman, n.60 O extrato obtido foi submetido à etapa de concentração em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 50 °C, solubilizado em 2 mL de n-hexano/tolueno (50/50; v/v) e submetido à etapa de “clean-up”.

##### -“Clean-up”

Com o intuito de eliminar interferentes, efeitos de matriz e também otimizar a recuperação dos analitos, utilizou-se colunas de Florisil ativado por 4 h a 240 °C para a etapa de “clean-up” das amostras obtidas no item anterior. Uma bureta foi usada para a montagem da coluna pela inserção de uma pequena porção de lã de vidro silanizada, seguido de 15,0 de Florisil e 2,0 g de sulfato de sódio anidro. A coluna foi condicionada com 20,0 mL de hexano. Em seguida, a amostra foi adicionada ao topo da coluna e a eluição foi realizada com 50 mL de uma solução de acetato de etila/hexano (50:50, v/v). O extrato obtido foi concentrado à secura sob fluxo de nitrogênio 5.0. Imediatamente antes da análise, o volume final do extrato foi ajustado para 1,0 mL com solução de acetato de etila/hexano (50:50, v/v) e submetido a análise por GC/MS (Eichelberger, 1994, Munch, 1995).

## **b) Água**

### **-Extração/“clean-up”**

500 mL da amostra de água foram transferidos para um funil de separação e submetidos ao processo de extração com 3 porções de 100 mL de solução n-hexano/tolueno 50/50; (v/v). Em seguida, os extratos orgânicos foram combinados, concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 50 °C até um volume de aproximadamente 20,0 mL.

O extrato foi então concentrado à secura sob fluxo de nitrogênio 5.0. Imediatamente antes da análise, o volume final do extrato foi ajustado para 1,0 mL com solução acetato de etila/hexano (50:50, v/v) e submetido a análise por GC/MS.

### **5.3.5.5. Validação do método**

As validações dos métodos desenvolvidos foram realizadas com base nos seguintes documentos: DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, AOAC (Association of Analytical Communities) e ISO/IEC 17025 (INMETRO, 2007; AOAC, 1999; ISO/IEC 17025:2005, 2005).

Os parâmetros de desempenho avaliados foram: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

#### **- Linearidade**

No estudo de linearidade avaliou-se a coerência da faixa de trabalho para todos os POPs estudados. Foram preparadas duas curvas de calibração em cinco níveis com injeção em triplicata:

Curva 1: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Curva 2: 0,1; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Cada curva de calibração foi construída através da relação entre concentração do analito/área. Os valores de relação de concentração e área foram usados para obter a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação quadrado ( $r^2$ ) foi utilizado para avaliar a adequação da representação do modelo matemático expresso pela equação de reta. Um valor de  $r^2$  maior que 0,995 foi requerido para considerar o modelo linear (ISO 5725, 1994).

#### **- Limites de detecção e de quantificação (LD e LQ)**

Para a obtenção dos LD e LQ foram injetados os 3 extratos em cada nível de fortificação. O LD foi obtido multiplicando por 3 os desvios-padrão encontrados e para o LQ multiplicando por 10 os desvios-padrão.

#### **- Precisão e Exatidão**

A precisão e a exatidão do método foram investigadas por ensaios de recuperação relativa e coeficientes de variação das replicatas. Os testes de recuperação relativa foram feitos adicionando-se os analitos às amostras testemunha de água e girassol, livres de interferentes. Para as amostras de água, as avaliações foram realizadas em dois níveis de concentração estabelecidos em torno de 2 a 10 vezes o valor do limite de quantificação (0,1 e 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Nos estudos de fortificação para as amostras de girassol (partes radicular e aérea), os ensaios de recuperação foram realizados em três níveis: 0,2; 2,0 e 10,0  $\mu\text{g}^{-1}$ , sendo todos preparados em triplicata.

## - Seletividade

A seletividade nas análises por GC/MS é considerada elevada. A seletividade do método foi garantida pela ausência dos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos em uma amostra “testemunha”.

Em amostras reais a seletividade foi garantida pela relação entre íons de quantificação e qualificação com tolerância de 20%. Próximo do limite de quantificação essa tolerância pode ser aumentada para 30%.

### 5.3.5.6 Análise

As análises das amostras obtidas nos procedimentos descritos foram realizadas num Cromatógrafo a Gás da Agilent Technologies serie 7890A acoplado a um Espectrômetro Massa da Agilent Technologies serie 5975C.

O sistema de aquisição e tratamento de dados foi realizado utilizando o software MSD Productivity ChemStation Data Analysis. As condições cromatográficas encontram-se descritas abaixo:

- Gás de arraste: Hélio.
- Velocidade linear média: 32 cm.s<sup>-1</sup>.
- Fluxo: 1,19 mL/min<sup>-1</sup>.
- Coluna – DB1-dimetilpolisiloxano (50 m x 0,22 mm x 0,2 µm).
- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura inicial: 85°C.
- Tempo de espera em 85°C min<sup>-2</sup>.
- Rampa 1 de temperatura: 3.5°C min<sup>-1</sup>.
- Temperatura 2: 195°C.
- Tempo de espera: 195°C: min<sup>-8</sup>.
- Rampa 2 de temperatura: 5°C/min<sup>-1</sup>.
- Temperatura final: 280°C.
- Tempo de espera: 280°C min<sup>-2</sup>.
- Tempo total de corrida: 60,43min.
- Injeção Splitless: Válvula fechada por 34 s.
- Fluxo de Split: 18 mL.min<sup>-1</sup>.



O procedimento de quantificação foi feito pelo método do padrão externo. Segue abaixo a relação dos poluentes avaliados no presente trabalho na ordem em que foram encontrados nos cromatogramas:

1 - 2,4,5,6 Tetracloro-m-xileno	13- 4,4`-DDE
2 - Delta-HCH	14 - Endrin
3 -Alfa HCH	15 - Endosulfan Beta
4 - Gamma HCH	16 - 4, 4`DDD
5–BetaHCH	17 - Endrin Aldeido
6–Heptacloro	18 - Endosulfan Sulfato
7–Adrin	19 - 4,4`DDT
8 - Heptacloro Epoxido	20 - Endrin Cetona
9 - Trans-Clordano	21 - Hexabromo benzeno
10 - Endosulfan Alfa	22 - Metoxi Cloro
11–Clordano	23 - Mirex
12–Dieldrin	24 - Decacloro Bifenila

### 5.3.5.7. Quantificação

A quantificação dos POPs nas amostras de girassol e água foram calculadas com base na área dos picos integrados obtidos nas análises por GC/MS em comparação com as concentrações conhecidas do padrão analítico, considerando o volume de diluição e massa da amostra.

O resíduo foi determinado pela quantidade do analito presente no volume injetado (obtido a partir da curva de calibração) que foi então multiplicado pelo volume de diluição final para indicar a massa de analito presente neste passo. Para determinar o resíduo em partes por milhão (ppm), a massa presente no volume de diluição (mg) foi, em seguida, dividida pela massa inicial da amostra de água ou girassol (g). Este resíduo foi então, ajustado, de acordo com a taxa de recuperação média obtida para cada método (Equação1):

$$R_{(\mu\text{g}/\text{g})} = \frac{C \cdot V_f \cdot 100}{m \cdot R_{ec}} \quad (14)$$

$C$ = concentração analítica (obtida a partir da curva de calibração);

$V_f$ = volume final de diluição;

$m$ = massa da amostra;

$R_{ec}$ = recuperação média.

## 6. Resultados

### 6.1. Resultados do Experimento 1

#### 6.1.1. Etapa 1. Formação do jardim somaclonal

##### 6.1.1.1. Bambus do gênero *Dendrocalamus ssp*, *Bambusa ssp* e *Guada ssp*.

Todos os gêneros e espécies de bambus testados foram reproduzidos com sucesso em casa de vegetação nas condições experimentais avaliadas. As condições ideais foram idênticas para todos os gêneros testados e os experimentos foram conduzidos de acordo com as seguintes condições: 20 L de substrato florestal (35% de argila, 35% matéria orgânica, 30% de vermiculita de granulação média); temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; umidade relativa de 60%; luminosidade 8 h de luz solar dia, com sombreamento de 80% atingido pelo uso de telado metalizado com malha de retenção luminosa de 20%; irrigação de 500 mL de água por  $\text{m}^3/\text{dia}$ , acrescida de solução nutritiva de NPK na composição de 20-5-20 na proporção de 1 g  $\text{L}^{-1}$  d'água (m/v). O período de surgimento de brotos foi em média de 40 dias após o plantio em potes flexíveis para mudas florestais experimentais.

##### 6.1.1.2. Girassol *Helianthus annuus* L.

As condições experimentais ideais para o cultivo dos girassóis foram: potes flexíveis para mudas florestais de 10 L com substrato para floreira (30% de argila, 40% de substrato orgânico, 30% de vermiculita de granulação média), temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; umidade relativa de 60%; luminosidade 8 h de luz solar dia sem sombreamento; 700 mL de água por  $\text{m}^3/\text{dia}$ , acrescida de solução nutritiva de NPK na composição de 10-10-10 na concentração de 1,0 g  $\text{L}^{-1}$  d'água (m/v); o período de obtenção das mudas até a fase de frutificação quando foi possível a obtenção de sementes aptas ao plantio foi de 60 dias após a inoculação das destas nos potes flexíveis para mudas florestais (Figura 14).



**Figura 14:** Mudanças de girassol *Helianthus annuus* L. mantidas em casa de vegetação.

### 6.1.2 Etapa 2: Esterilização dos explantes

Os melhores resultados, comparando todos os métodos de desinfecção já descritos, foram obtidos com solução 0,1% de cloreto de mercúrio (II) em éter etílico (v/v). Este procedimento experimental foi adotado para reproduzir as condições experimentais preconizadas pela literatura (NADGIR, 1984) como desinfetante padrão (branco de esterilização). Entretanto, esse reagente não foi utilizado no desenvolvimento do trabalho devido a sua toxicidade e sua proibição pela ANVISA a partir de 2008 para práticas em cultura de tecidos vegetais.

Entre todos os protocolos testados, o que apresentou melhor resultado foi o do protocolo de **esterilização número 3**, conduzido em 2 etapas:

- 1- Tratamento térmico:** Os explantes foram imersos em 150 mL de solução de benomil 1% acrescido de 5 gotas de surfactante Tween 80® visando a quebra da tensão superficial. Em seguida, os explantes foram submetidos ao procedimento de pré-esterilização/ativação pelo incremento de temperatura em condições balísticas no intervalo de 45 a 55 °C por 15 min.
  
- 2- Tratamento hipobárico:** A amostra proveniente da etapa anterior foi estabilizada a temperatura ambiente e imediatamente transferida para solução de hipoclorito de cálcio a 30%. Em seguida, a amostra foi submetida ao tratamento hipobárico de -0,02 atm. visando forçar a percolação das soluções de esterilização pelos vasos condutores de xilema e floema dos explantes por 15 min. O vácuo foi então diminuído de maneira lenta (10 min.) até zero e a amostra transferida para 150 mL de uma solução de álcool 70% sob pressão negativa de -0,02 atm. por 5 min., sendo em seguida aplicado novamente o mesmo procedimento para a diminuição do vácuo. Finalmente, a amostra foi transferida para 150 mL de solução de HCl 0,1% sob pressão negativa de -0,02 atm. por 5 min. e após a diminuição lenta do vácuo, os explantes foram retirados em ambiente asséptico na capela de fluxo laminar sofrendo tríplex lavagem com água destilada, auto clavada.

O índice de descontaminação obtido foi de 95 a 98% para a maioria das espécies estudadas. O gênero "*Guada spp*" exibiu baixo índice de descontaminação, ao redor de 40%, provavelmente devido à presença de saliências, reentrâncias, dobras, criptas e espinhos, mesmo com utilização de cloreto de Mercúrio (II).

Após 4 semanas da inoculação, indícios de bactérias foram notados em alguns dos frascos nos gêneros testados. Visando a especificidade antibiótica para os microorganismos resistentes ao protocolo preliminar de desinfecção, um antibiograma foi desenvolvido e aplicado em etapas posteriores.

### 6.1.2.3. Antibiógramas

Dentre as 5 classes de antibióticos testados (betalactamos, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, tetraciclina), o que apresentou melhor resultado frente às bactérias presentes e cultivadas *in vitro*, foi o grupo dos betalactamos, mais especificamente desta classe o antibiótico cefalosporina D. Este em particular mostrou os maiores halos de contenção evidenciando seu poder bactericida mesmo após 6 semanas de teste.

### 6.1.3. Etapa 3: Inoculações

Das espécies estudadas, as que exibiram melhores resultados pertenciam ao gênero *Bambusa*, dentro deste gênero para as espécies *B. Vulgaris* variedade *vitatta*, com a utilização de ramos laterais terciários (98% de brotações) e secundários (92% brotações), nas condições de meio MS sólido e líquido com concentrações de 75% e 100% de macro e micro nutrientes, respectivamente. Foi possível constatar ainda que, só brotaram os explantes que receberam banho térmico de 45 a 55°C e coletados até abril. Após esse período não houve brotação nem mesmo a oxidação e necrose dos tecidos.

Com relação ao gênero *Guadua* foi possível notar o aparecimento de pontos de contaminação bacteriológica mesmo em meios acrescidos de antibióticos e, além disso, supressão de brotações levando a forte oxidação dos tecidos também foi constatada.

## **6.2. Resultados do experimento 2. Estudo de fitotoxicidade de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado**

### **6.2.1. Plantas testadas**

Como nem todas as plantas (*Dendrocalamus giganteus*, *Guada angustifolia*) puderam ter seus protocolos de cultivo *in vitro* estabelecidos no experimento 1, foram testadas as plantas de bambu do gênero *Bambusa vulgaris* variedade *vitatta* e o girassol *Helianthus annuus* L.

### **6.2.2. Testes de fitotoxicidade**

#### **6.2.2.1. *Bambusa vulgaris* var. *vitatta***

No teste de fitotoxicidade os resultados demonstraram que, para o grupo controle houve apenas 13% de necrose com mortalidade para os explantes inoculados. Todavia, todas as concentrações acima de 10 mg (20, 40, 50, 100 e 200 mg) de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> adicionado a cada litro de solução nutritiva (m/v), mostraram-se extremamente tóxicas pois os explantes inoculados não apresentaram brotação. Observou-se ainda o aparecimento de coloração negra nas gemas após 8 dias da adição do material nanoestruturado, o qual consiste de um indicativo de necrose dos tecidos conforme mostra a Figura 15. Foram ainda infrutíferas as tentativas de execução de cortes histológicos destes explantes, por já estarem degradados, impossibilitando a visualização da estrutura anatômica interna, que pudesse ser corada, identificada e analisada.



**Figura 15:** Necrose dos tecidos em cultura *in vitro* na presença de  $\text{TiO}_2$

Para as concentrações de 5,0 e 10,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$  (m/v), a necrose foi menos intensa, abarcando 36% das amostras. Entretanto, transcorridos 30 dias após o experimento notou-se que não havia desenvolvimento vegetativo (radicular ou foliar) nos explantes. Após 50 dias da inoculação todos os explantes já haviam necrosado e atingindo a morte da espécie.

#### **6.2.2.2. Girassol *Helianthus annuus* L.**

Nos testes com girassol, o grupo controle apresentou bons resultados no desenvolvimento a partir das sementes, exibindo taxa de germinação acima de 98% e expressivo desenvolvimento radicular e vegetativo (Figura 16). Para os demais grupos, o único que apresentou início de germinação foi aquele que utilizou 5,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de solução nutritiva, sendo que em todas as demais concentrações não houve germinação.

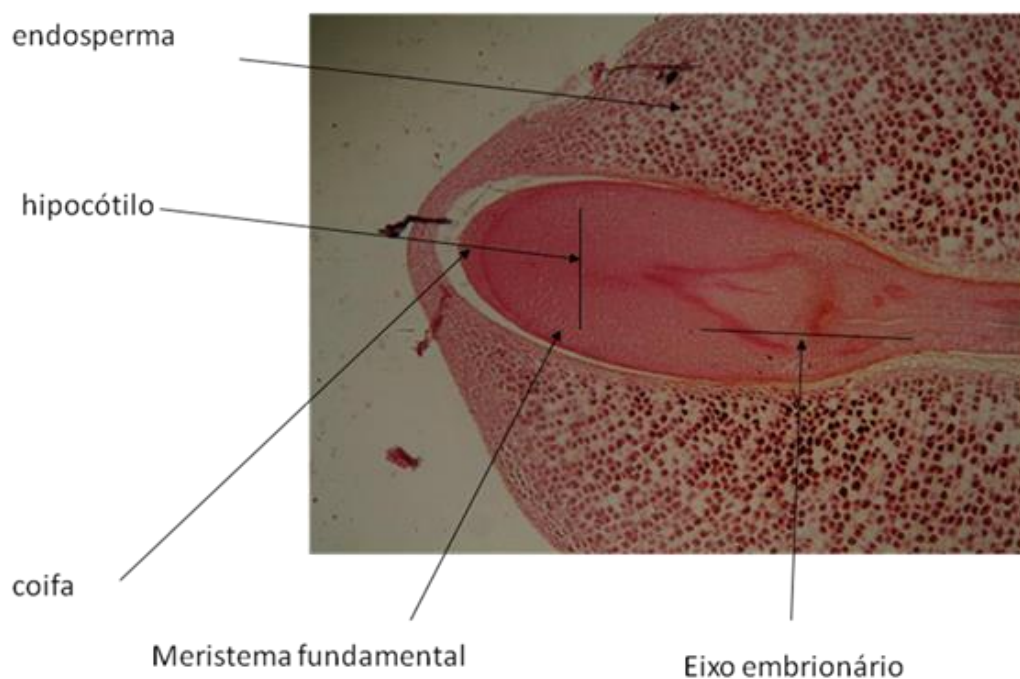
O estudo com material nanoestruturado de  $\text{TiO}_2$  na concentração de 5,0  $\text{mg.L}^{-1}$  apesar de ter apresentado germinação inicial, não houve posterior desenvolvimento de partes radiculares ou vegetativas, como folhas e brotos.





**Figura 16:** Grupo controle do girassol em cultivo *in vitro*

Em cortes histológicos, porém, notou-se a quebra de dormência das sementes, que é um indicativo de estágios iniciais de formação do embrião (Figura 17). No entanto, esse processo não apresentou desenvolvimento por até 45 dias quando foram constatadas a necrose e morte dos tecidos embrionários vegetais.



**Figura 17:** Semente de girassol *Helianthus annuus* L., corte longitudinal do embrião, aumento 40 x, grupo tratado com  $\text{TiO}_2$  na concentração de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (m/v).

### **6.3. Experimento 3: Avaliação das plantas para o processo de fitorremediação**

Dentre os vegetais que obtiveram seus protocolos estabelecidos com sucesso no experimento 1 e que puderam ter avaliadas suas possíveis capacidades fitorremediativas, estão somente o gênero *Bambusa* e a espécie *vulgaris* variedade *vitatta* e a oleaginosa, girassol (*Helianthus annuus L.*).

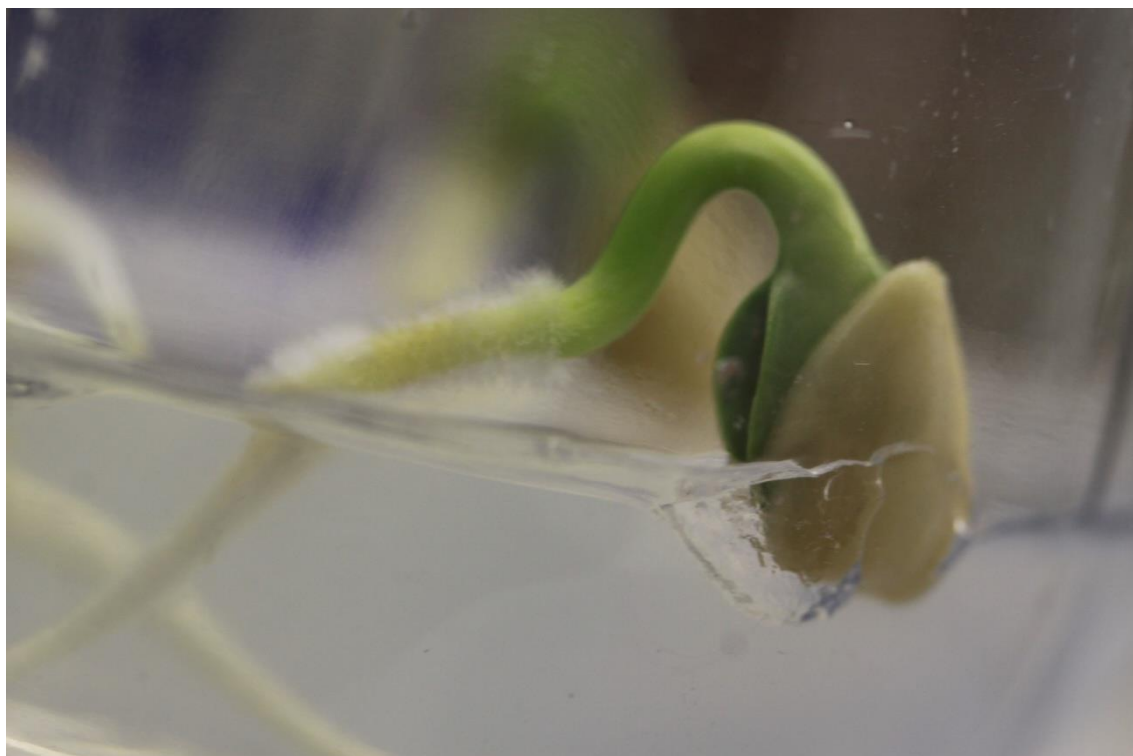
#### **6.3.1. *Bambusa vulgaris* variedade *vitatta*.**

Os resultados demonstraram forte necrose dos tecidos e posterior morte de todos os explantes testados. Apenas o grupo controle, sem adição de nenhum poluente orgânico desenvolveu-se até 60 dias de testes.

Como não foi obtida nenhuma muda ou material para análise deste tipo de vegetal não foi possível dar continuidade às avaliações analíticas para plantas lenhosas de bambus de nenhum gênero ou espécies selecionadas como as mais indicadas pela literatura como fitorremediadores.

#### **6.3.2. Girassol *Helianthus annuus L.***

As plantas de girassol se mostraram aptas em seu desenvolvimento frente aos POPs avaliados. Estas apresentaram um bom desenvolvimento nas concentrações utilizadas para o estudo (Figura 18). Foi possível notar a formação de radículas, raízes, brotos e folhas em todos os frascos de cultura perfazendo um total de 98,5% de plantas sobreviventes.



**Figura 18:** Girassol com 12 dias de desenvolvimento, após germinação.

Após serem coletadas, as plantas de girassol foram secas, homogeneizadas, trituradas obtendo-se um montante de massa seca de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7-**Peso (g) de amostras de girassol provenientes do cultivo *in vitro*

	<b>Parte aérea</b>	<b>Parte radicular</b>	<b>Massa seca total</b>
<b>Peso (g)</b>	127,10	59,30	186,40

### 6.3.3. Validação da metodologia analítica

A validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos [NBR ISO/IEC 17025, 2001] e que permite demonstrar que o método é "adequado ao objetivo" requerido.

Nesse trabalho as características de desempenho investigadas no processo de validação para os métodos desenvolvidos foram: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os limites de detecção (LD) e regressão linear da curva de calibração ( $r^2$ ). Além disso, a Tabela 8 também mostra os limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em dois níveis de fortificação, desvio padrão relativo (DPR) e para a matriz água.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para os limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em dois níveis de fortificação, desvio padrão relativo (DPR) para a matriz girassol (partes aérea e radicular).

## **6.4. Resultados dos processos de remediação**

### **6.4.1. Estudo de fitorremediação utilizando girassol**

Os resultados das avaliações indicaram que dos 24 compostos avaliados, 16 apresentaram resultados de remediação utilizando girassol: partes radicular e aérea (Tabela 10).

### **6.4.2. Experimento 4: Estudo de Remediação de POPs em Água utilizando TiO<sub>2</sub> Nanoestruturado (Degusa P25)**

Esta avaliação foi conduzida com objetivo avaliar a degradação dos POPs em matriz aquosa na presença TiO<sub>2</sub> nanoestruturado. A Tabela 11 apresenta os resultados de remediação para duas concentrações distintas de TiO<sub>2</sub> (0,5 e 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

**Tabela 8:** Resultados obtidos para os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em dois níveis de fortificação, desvio padrão relativo (DPR%) e regressão linear da curva de calibração ( $r^2$ ) para a matriz água.

POPs	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)		Curva de Calibração $r^2$
			0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
1- Tetra-cloro-xileno	0,001	0,006	91,25 (4,7)	88,39 (5,2)	0,99934
2- $\delta$ -HCH	0,001	0,005	98,54 (4,2)	98,80 (3,4)	0,99892
3- $\alpha$ -HCH	0,003	0,007	70,81 (4,3)	87,52 (2,7)	0,99927
4- $\gamma$ -HCH	0,002	0,005	96,38 (3,8)	96,04 (2,9)	0,99853
5- $\beta$ -HCH	0,002	0,006	73,28 (2,9)	90,89 (3,8)	0,99781
6- Heptacloro	0,003	0,008	65,35 (3,2)	87,06 (4,2)	0,99993
7- Aldrin	0,002	0,005	59,95 (3,5)	76,34 (4,5)	0,99905
8- Heptacloro-epoxido	0,001	0,012	79,44 (3,4)	98,12 (3,6)	0,99965
9- trans-chlordano	0,002	0,005	76,45 (4,3)	95,15 (2,6)	0,99753
10- Endosulfan Alfa	0,001	0,005	81,47 (3,0)	98,63 (4,9)	0,99756
11- Chlordano	0,003	0,007	76,58 (4,0)	95,07 (5,0)	0,99926
12- Dieldrin	0,001	0,005	86,06 (4,4)	107,93 (4,7)	0,99557
13- 4,4' DDE	0,002	0,005	85,06 (3,9)	105,41 (4,4)	0,99728
14-Endrin	0,003	0,006	81,44(5,7)	98,36 (4,6)	0,98045
15- Endosulfan Beta	0,002	0,005	89,42 (4,3)	106,78 (2,5)	0,9961
16- <i>p,p'</i> DDD	0,003	0,007	95,48 (4,1)	109,69 (3,1)	0,99126
17- Endrin Aldeido	0,004	0,010	82,20 (4,7)	92,50 (3,6)	0,99741
18- Endosulfan Sufato	0,002	0,006	91,29 (2,9)	108,38 (4,1)	0,99687
19- <i>p,p'</i> DDT	0,002	0,007	94,84 (3,0)	118,35 (3,2)	0,99848
20- Endrin Ketone	0,001	0,006	84,78 (4,1)	97,42 (3,7)	0,99827
21- Hexabromobenzeno	0,006	0,010	81,39 (5,3)	88,07 (5,6)	0,99957
22- Metoxicloro	0,004	0,007	92,36(5,7)	91,68(4,6)	0,99914
23- Mirex	0,004	0,010	81,15 (3,8)	99,86 (2,9)	0,99768
24- Decacloro bifenila	0,003	0,011	85,77 (3,2)	105,39 (4,2)	0,99937

**Tabela 9:** Resultados obtidos para os limites de quantificação (LQ), recuperação média (%) em três níveis de fortificação para a matriz girassol (partes aérea e radicular) e respectivos desvios padrão relativo (DPR%).

POPs	LQ (DPR)		Recuperação (%)				
	$(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$		Parte Radicular			Parte Aérea	
		$0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1- Tetra- cloro-m-xileno	0,04 (4,22)	84,72 (4,9)	90,18 (5,4)	88,06 (3,6)	102,35 (3,9)	100,93 (5,8)	98,70 (4,5)
2- $\delta$ -HCH	0,03 (4,45)	95,21 (5,4)	88,32 (6,1)	81,36 (4,4)	88,41 (3,3)	92,91 (6,3)	88,52 (5,1)
3- $\alpha$ -HCH	0,01 (3,24)	88,17 (6,1)	93,21 (3,9)	90,22 (4,8)	90,15 (6,2)	88,25 (3,8)	91,46 (4,2)
4- $\gamma$ -HCH	0,05 (4,06)	78,34 (4,6)	88,54 (3,3)	95,70 (5,3)	79,05 (5,6)	83,64 (4,7)	88,25 (3,9)
5- $\beta$ -HCH	0,07 (5,32)	93,49 (3,2)	91,03 (3,5)	80,25 (3,7)	92,54 (3,9)	89,05 (5,9)	91,18 (3,4)
6- Heptacloro	0,06 (4,48)	86,90 (3,9)	102,14 (5,3)	94,72 (3,9)	89,47 (4,2)	91,22 (4,6)	96,46 (3,7)
7- Aldrin	0,07 (5,69)	68,17 (3,7)	67,22 (6,2)	66,28 (5,1)	65,21 (3,9)	62,34 (5,7)	60,38 (5,4)
8- Heptacloro-epoxido	0,05 (6,22)	83,91 (5,0)	89,17 (5,5)	90,47 (4,7)	91,65 (4,6)	90,28 (4,3)	93,69 (5,1)
9- trans-chlordano	0,05 (4,13)	91,67 (3,8)	87,31 (4,9)	91,69 (5,3)	87,20 (4,9)	89,18 (4,9)	93,85 (3,8)
10- Endosulfan Alfa	0,03 (6,55)	89,12 (5,3)	92,09 (4,2)	89,18 (4,6)	84,35 (3,9)	94,56 (6,1)	91,22 (4,1)
11- Chlordano	0,04 (3,97)	87,52 (4,7)	103,44 (5,7)	93,22 (5,2)	88,11 (5,1)	94,77 (5,4)	96,30 (3,9)
12- Dieldrin	0,07 (5,20)	90,36 (3,8)	91,07 (3,8)	89,69 (4,8)	94,36 (4,8)	104,61 (4,2)	102,38 (3,7)
13- 4,4' DDE	0,05 (4,84)	92,11 (4,9)	88,28 (3,6)	94,85 (4,5)	91,55 (5,5)	90,39 (5,8)	93,66 (4,8)
14- Endrin	0,07 (6,13)	81,23 (5,3)	91,58 (4,9)	95,67 (3,3)	92,39 (5,3)	94,11 (3,9)	95,89 (5,3)
15- Endosulfan Beta	0,06 (5,51)	78,20 (4,8)	101,34 (6,3)	97,89 (5,5)	87,06 (4,7)	91,23 (4,4)	90,26 (4,7)
16- <i>p,p'</i> DDD	0,04 (6,03)	91,33 (4,5)	92,37 (5,7)	97,26 (4,8)	88,25 (6,2)	93,06 (5,3)	94,11 (5,0)
17- Endrin Aldeído	0,07 (5,22)	81,52 (5,9)	90,19 (3,4)	96,81 (5,2)	83,41 (5,9)	91,55 (4,7)	86,32 (3,9)
18- Endosulfan Sufato	0,01 (6,34)	90,36 (3,7)	105,69 (5,6)	95,63 (4,3)	92,87 (3,8)	98,70 (5,8)	99,17 (4,5)
19- <i>p,p'</i> DDT	0,03 (6,28)	83,44 (4,6)	93,19 (5,3)	92,55 (4,6)	85,31 (5,1)	91,86 (4,9)	90,60 (3,7)
20- Endrin Cetona	0,05 (6,37)	87,60 (4,8)	89,64 (4,4)	87,91 (5,8)	94,25 (4,9)	93,24 (4,8)	101,09 (3,8)
21-Hexabromobenzeno	0,06 (5,42)	81,39 (4,2)	83,69 (5,3)	90,56 (5,4)	88,07 (5,6)	90,64 (5,2)	96,31 (4,4)
22- Metoxicloro	0,05 (6,21)	90,45 (6,3)	93,66 (5,8)	88,77 (4,5)	89,71 (4,8)	92,36 (5,0)	97,25 (4,8)
23- Mirex	0,02 (4,12)	90,07 (5,3)	95,12 (4,9)	90,29 (3,9)	89,14 (4,7)	97,55 (3,6)	90,89 (4,3)
24- Decacloro bifenila	0,03 (5,88)	88,25 (6,2)	89,22 (5,8)	92,67 (4,6)	87,93 (5,9)	90,36 (4,5)	93,43 (4,9)

**Tabela 10:** Resultados obtidos no processo de fitorremediação para o girassol (partes radicular e aérea: folhas, galhos e brotos).

N°	POPs	Radicular		Aérea	
		Concentração	% Remediação	Concentração	% Remediação
1	Tetra- cloro-m-xileno	0,94	9,40	0,84	8,40
2	$\delta$ -HCH	2,46	24,60	1,19	11,90
4	$\gamma$ -HCH	1,52	15,20	2,03	20,30
6	Heptacloro	3,04	30,40	0,64	6,40
7	Aldrin	2,49	24,90	0,83	8,30
8	Heptacloro epoxido	4,70	47,20	<LQ*	<LQ*
9	Trans clordano	2,25	22,50	0,88	8,80
10	Endosulfan Alfa	0,10	1,00	0,17	1,70
11	Clordano	7,59	75,90	1,28	12,80
12	Dieldrin	<LQ*	<LQ*	0,17	1,70
13	4-4 DDE	2,79	27,90	0,17	1,70
16	4,4' DDD	1,93	19,30	0,73	<LQ*
19	4,4 DDT	8,73	87,30	<LQ*	<LQ*
22	Metoxicloro	0,28	2,80	0,20	2,00
23	Mirex	5,08	50,80	0,25	2,50
24	Decacloro bifenila	6,92	69,20	0,31	3,10

\*&lt;LQ (LQ vide Tabela 9).

**Tabela 11:** Resultados de remediação de POP em água obtidos dos experimentos de remediação utilizando TiO<sub>2</sub> comercial Degusa P25.

Composto	% Remediação	
	0,5 µg.mL <sup>-1</sup>	2 µg.mL <sup>-1</sup>
α-HCH	41,6	54,2
γ-HCH	44,9	53,0
β-HCH	43,1	53,0
Heptacloro	0	36,9
Aldrin	<LQ*	52,0
Heptacloro Epoxido	12,9	44,2
Trans-clordano	52,4	50,3
Endosulfan Alfa	31,1	48,2
Clordano	43,1	53,3
Dieldrin	29,1	49,2
4,4`-DDE	33,8	52,9
Endosulfan Beta	32,3	52,1
4,4`-DDD	22,0	45,5
Endrin aldeido	30,7	56,8
Endosulfan Sulfato	32,2	56,0
4,4`-DDT	39,5	59,2
Mirex	41,4	54,7
Decacloro bifenila	21,0	63,5

\*<LQ (LQ vide Tabela 9).



## 7. Discussão

### 7.1. Validação da Metodologia Analítica

A linearidade para as metodologias desenvolvidas no presente trabalho foi determinada utilizando-se o método matemático conhecido como análise de regressão linear. Foram determinados os coeficientes de regressão angular (a) e linear (b), bem como o coeficiente de correlação quadrado ( $r^2$ ). Este último parâmetro permitiu uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. As curvas de calibração para cada um dos 24 analitos apresentaram coeficiente de correlação quadrado maior que 0,995, indicando um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. O valor do coeficiente linear sempre próximo a zero indicou que o sistema estava livre de tendências. O método apresentou-se linear para a faixa de trabalho utilizada e os resíduos da curva de calibração apresentaram distribuição aleatória. O método apresentou-se linear nas faixas de trabalho: 0,1 a 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1,0 a 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as curvas de calibração e respectivas equações encontram-se no Anexo I. A Figura 19 apresenta um cromatograma de uma solução padrão dos 24 POPs estudados na concentração de 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

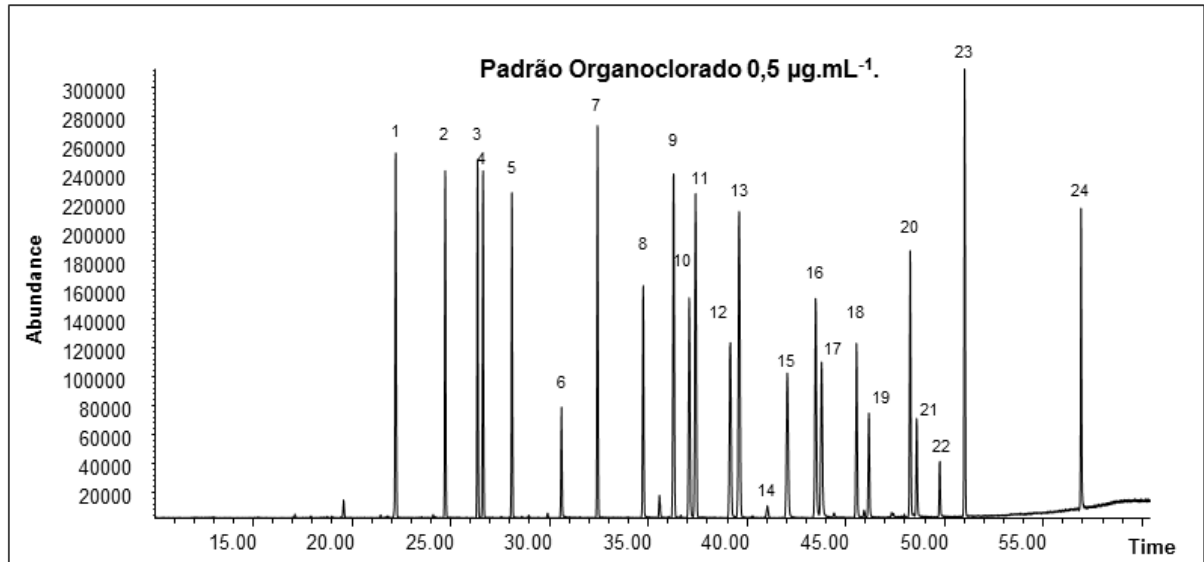
O LD e o LQ foram determinados utilizando o desvio padrão (S) de 10 replicatas de branco com adição de pequena concentração dos analitos (0,1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), de acordo com as equações (15) e (16), respectivamente.

$$LD = 3 \times S \quad (15)$$

$$LQ = 10 \times S \quad (16)$$

Os valores de LD encontrados para todos os POPs estão descritos na Tabela 8. Os valores de LD encontrados estão entre 0,001  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o  $\delta$ -HCH e 0,006  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o hexabromobenzeno.

Os resultados de LQ encontrados para a matriz água estão entre 0,005  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o aldrin e 0,012  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o heptachlor epoxide e para o girassol os valores estão entre 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para o  $\alpha$ -HCH e 0,07  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  para o endrin aldeído.



**Figura 19:** Cromatograma do Íon Total (TIC) obtido por GC/MS de uma solução padrão de 24 POPs na concentração de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2007). A precisão do método foi determinada através de estudos de repetitividade, calculando-se o desvio padrão relativo (% DPR), das amostras analisadas em replicata.

Para o cálculo do desvio padrão relativo, utilizou-se a equação 3, onde  $s$  é o desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado e  $m$  a média dos resultados obtidos.

$$\text{DPR (\%)} = (s/m) * 100 \quad (17)$$

Nas Tabelas 8 e 9 estão descritos os valores mínimos e máximos de DPR (%) encontrados na faixa de trabalho para cada POP. Todos os valores encontrados estão abaixo de 6,00%, sendo considerados aceitáveis para os métodos desenvolvidos.

A exatidão de um método analítico é a concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (ISO/IEC 17025, 2005; INMETRO, 2007).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos, participação em ensaios interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

No presente trabalho, a exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação utilizando amostras testemunha fortificadas em 1 LQ e 10 LQ para a matriz aquosa e 1 LQ, 10 LQ e 50 LQ para o girassol que contemplaram toda a faixa de trabalho para cada analito.

As Tabelas 8e 9 apresentam os valores mínimos e máximos de recuperação (%) obtidos para os analitos estudados em matriz de água e girassol (partes radicular e aérea). Todos os valores encontrados estão entre 70 % e 118 %, exceto para o aldrin em girassol que apresentou resultados ao redor de 65 %. De acordo com a literatura os resultados obtidos podem ser considerados aceitáveis (INMETRO, 2007).

## **7.2 Experimento 1**

Os resultados encontrados na primeira etapa experimental demonstraram sucesso na formação de um banco somaclonal com mudas padronizadas e aptas a fornecer material de propagação como brotos, galhos, ápices de raízes e caule. Além disso, estes materiais apresentaram elevada quantidade de células meristemáticas, o que já era esperado de acordo com a literatura (FILGUEIRAS, 2009, INBAR 2010). O cultivo em condições controladas de luminosidade, temperatura e umidade facilitou o manejo e destacou-se como um fator primordial para a execução desta etapa.

Para o estabelecimento do jardim somaclonal de girassol, as condições em ambiente controlado também se mostraram essenciais no desenvolvimento dessa etapa. Outro fato relevante quanto a este ambiente consistiu na possibilidade de obtenção de plantas de girassol fora do período ideal de cultivo, que não ocorreria em ambiente natural. Outrossim, o controle dessas condições tornou o trabalho exeqüível, possibilitando a aquisição de explantes em qualquer período do ano.

Na segunda etapa do experimento 1, que teve como escopo a desinfecção dos explantes provenientes de bambus, foi utilizada grande diversidade de técnicas estabelecidas na literatura, bem como novas ênfases foram abordadas durante o desenvolvimento e testes metodológicos, os quais podem ser considerados inéditos para as plantas e finalidades estudadas.

A utilização de cloreto de mercúrio II como descrito por Nadgir 1984 e INBAR, mostrou-se como uma das melhores alternativas devido principalmente à sua rápida execução. Porém, devido à elevada toxicidade e seu uso banido em todo o mundo, esse composto não foi utilizado durante os experimentos.

A busca por protocolos aptos à reprodução em grande escala de plantas como bambus vem sendo estudada há anos por diversos laboratórios de cultura de tecido e em muitos casos foram relatados resultados promissores para alguns gêneros e espécies (YEH & CHANG, 1986, b; HUANG, 1988; CHAMBERS et al., 1991; HASAN & DEBERG, 1987).

Além disso, os melhores resultados obtidos são provenientes de países asiáticos, onde se concentra a maioria das espécies de clima temperado como bambu Mossó e outros bambus alastrantes, como os do gênero *Phyllostachy sssp* (INBAR, 2013).

Nas pesquisas mais recentes, há um déficit de dados na literatura com relação a bambus tropicais principalmente estudos relacionados à cultura de tecidos. Os bambus são reconhecidamente plantas recalcitrantes, que se caracterizam pela difícil reprodução *in vitro* (FILGUEIRAS 1988).

Outro fator importante que dificulta o cultivo do bambu *in vitro* é a sua poliploidia, podendo apresentar pentaploides, decaploides ou mais (SOLTIS & SOLTIS, 1995; SODERSTRON, 1981) e terem esses genomas expressos de acordo com as variações ambientais onde se encontram (WRIGHT, 1964; RAO, 2000). Dessa forma, quando se obtém sucesso para um gênero de bambu tropical que foi coletado em um país ou região, cujo clima e condições edáficas são distintas, terão diferentes genes expressos, e, por conseguinte os resultados serão distintos (GUANG-ZHU, 1987a, GUANG-ZHU, 1987b; INBAR, 2013; PEREIRA, 2009).

Outra característica importante que dificulta a cultura *in vitro* dos bambus é a presença de bactérias simbiotes que se desenvolvem nos vasos condutores da planta (FUKATSU, 2000; KLEIN, 2012) e também em suas raízes, onde podem ser encontrados bactérias e fungos micorrizicos que auxiliam na absorção, aumento da área de contato e metabolismo de nutrientes essenciais para a planta (VERMA & ARYA 1998, SILVA et al. 2006). Estes micro-organismos em ambiente natural não se proliferam demasiadamente pelo próprio controle competitivo da microbiota do solo, porém quando inoculados em ambiente de cultura *in vitro* onde muitos sais nutritivos e outros aditivos são disponibilizados, tendem a se multiplicar exponencialmente e causar um descontrole bioquímico do meio que pode ocasionar uma fermentação e consequente perda da cultura vegetal.

Devido a sua presença interna nos tecidos de condução vascular, esses microorganismos são de difícil acesso aos produtos de descontaminação, sendo necessária utilização de produtos de ação sistêmica e/ou tratamento hipobárico. Além de todos os esforços no controle destes organismos dos bambus durante a fase de procedimentos *in vitro*, ainda há a necessidade de sua re-inoculação na fase de aclimatização que precede a fase de plantio em campo, pois sem esta associação poderá ocorrer um déficit nutricional e consequente morte da planta (VERMA & ARYA 1998; MAZIAH, 1991).

Analisando os resultados que apresentaram sucesso na etapa de desinfecção foi possível verificar que um único procedimento não se mostrou suficiente para eliminar com segurança a presença de micro-organismos, o que pode estar relacionado à diversidade da microbiota e localização desses nas plantas de bambu.

Métodos químicos não seletivos de controle como utilização de hipoclorito de cálcio e álcool 70% mostraram grande eficiência quando aliados ao tratamento hipobárico, que notoriamente propiciou o acesso da solução pelos vasos condutores do vegetal. A utilização de banho térmico a 45° Celsius, também auxiliou neste processo uma vez que o simples aumento de temperatura contribui para a desinfecção.

Os resultados obtidos pela utilização de antibióticos e particularmente ao sucesso da Cefalosporina D, mostraram os maiores halos de contenção de crescimento bacteriano e conseqüentemente os menores níveis de contaminação dos meios de cultura até as fases de replantio e troca do meio. Esse resultado pode estar relacionado principalmente ao mecanismo de ação específico de inibição das sínteses protéica e também de ergosterol, bem como a ação no anel beta-lactâmico (BOUNAIM et al., 2001) localizado na parede celular (KOTRA, 1998; TRABULSI & ALTERTHUN, 2008). Dessa forma, os antibióticos apresentaram ação bactericida e bacteriostática em bactérias Gram positivas e negativas, encontradas nos explantes.

Quanto aos grupos de bambu em particular, para o gênero *Guada ssp.*, os resultados mostraram elevada resistência a todos os protocolos de desinfecção. Existem relatos na literatura que indicam a dificuldade na penetração nos acúleos caulinares, que possuem muitas criptas, reentrâncias e paredes impermeabilizadas com tecidos esclerificados e lignificados (LIESE, 1998; LEMOS et al. 2006).

A espécie de bambu *Bambusa vulgaris var. vitatta* foi a única que apresentou bons resultados em todas as etapas do protocolo e por conseqüência apta a fase de aclimação em casa de vegetação. O sucesso alcançado quanto ao tipo de explantes utilizados, ou seja, ramos terciários foram contrastados com resultados de estudos *in vivo* realizados em estufa e em campo. Nestes estudos, discutidos pela literatura, os propágulos mais viáveis e de melhor capacidade regenerativa de novos brotos foram: gemas caulinares de colmos, ramos primários, secundários e raramente descritos, os ramos terciários (MEDINA et al., 1962; SALGADO, 1987; PEREIRA & BERALDO, 2006).

A utilização de menores concentrações (75%) de macro e micro nutrientes, bem como não utilização de agente polimerizador (Phytigel) ao meio MS foi compatível a outros tipos de plantas recalcitrantes, de difícil reprodução *in vitro*,

como é o caso de pteridophitas heterosporadas (sambambaias) (LÊ, 1983; KNAUSS, 1976).

Seria relevante a realização de estudos que pudessem explorar limites de concentração máxima e mínima de nutrientes e outros aditivos, compatíveis com particularidades metabólicas aplicados a bambus, devido às suas propriedades físicas, morfológicas e mecanismos bioquímicos de ação.

### 7.3. Experimento 2

Os testes de fitotoxicidade dos vegetais *Bambusa Vulgaris* e girassol *Helianthus annuus L.* apresentaram resultados similares, apesar das regenerações constatadas a partir de diferentes fontes de explantes como células meristemáticas para bambus e sementes para girassol.

No experimento de adição de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado no meio de cultura da espécie de bambu, observou-se a toxicidade letal aos tecidos. No grupo controle o desenvolvimento ocorreu satisfatoriamente, o que pode estar relacionado com a única variável passível de causar a morte dos explantes: a inserção de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado.

Este vegetal possuía boas perspectivas de resistência a materiais nanoestruturados, uma vez que historicamente esta espécie tem resistido a condições de alta concentração de metais, elementos tóxicos, poluentes orgânicos e até mesmo radioatividade (HASENSTEIN, 1987). Entretanto, as análises dos explantes mostraram uma necrose intensa em todos os tecidos após um longo período sem desenvolvimento. Nenhuma contaminação exógena por fungo ou bactéria que pudesse interferir nos resultados negativos foi constatada.

Igualmente, não foram detectados sinais de desidratação ou ressecamento dos explantes, o que poderia indicar morte causada por desidratação, um fato comum em testes efetuados com sais de cloreto, cádmio, entre outros.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura que relaciona a toxicidade e geno-toxicidade de TiO<sub>2</sub> nanoestruturado (GHOSH et al., 2010, MARIANO et al., 2005) em cultura de tecido de vegetais.



GHOSH constatou atraso no desenvolvimento e morte de *Nicotina Tabacum* (GHOSH, 2008) na presença de  $\text{TiO}_2$  nanoestruturado.

Os resultados obtidos para o estudo de girassol (*Helianthus annuus* L.) mostraram grande similaridade aos do bambu. Para os estudos com girassol, o uso de sementes foi extremamente adequado, uma vez que a toxicidade não interferiu na etapa de germinação, isto pode ser constatado na Figura 18 que apresenta desenvolvimento desse vegetal. É possível verificar o surgimento microscópico do cotilédone, indicando que não houve toxicidade sobre o embrião da semente mesmo no processo de quebra de dormência. Estes resultados estão de acordo com as relações de outros elementos que não interferem em processos de germinação como alguns metais, por exemplo, Ferro e Alumínio (MORAIS, 2002) e também em concordância com o efeito positivo de nanotubo de carbono sobre a germinação de sementes (KHODAKOVSKAYA, 2009).

Pelo fato das sementes serem consideradas auto-suficientes, após a quebra de dormência por hidratação em seu desenvolvimento e até o surgimento das primeiras folhas, algumas substâncias e condições, podem interferir nessas etapas. É o caso de alguns herbicidas que atuam na cadeia carreadora de elétrons como Glifosato, os que mimetizam a ação de auxinas como Picloran (HERBICIDE ACTION COURSE, 2003), ou ainda frente à presença de solventes orgânicos apolares que solubilizam a membrana plasmática levando à morte do embrião.

Transcorridos alguns dias foi possível observar um desenvolvimento lento com relação ao grupo controle para a espécie e mesmo após o tempo total previsto para o desenvolvimento completo das mudas, a maioria dos potes de cultura *in vitro* apresentou necrose dos explantes e morte do tecido vegetal. Por se tratar de um material em escala nanométrica e de difícil identificação, pouco se pode propor com relação aos mecanismos de toxicidade dessas nanopartículas, seu isolamento, cinética e mecanismos de ação. Estes dados ainda são pouco conhecidos na literatura e inconsistentes com outros materiais poluidores a exemplo de elementos tóxicos que atuam diretamente em processos energéticos e de hidratação vegetal (ROSSI, 2001).

Uma possível hipótese de toxicidade, pode estar relacionada à própria característica ou mecanismo de fotocatalização do TiO<sub>2</sub>, uma vez que estas nanoestruturas geram radicais (superóxido, e hidroxila) quando em presença de água. Assim sendo, estes atuarão como agentes redutores e oxidantes a diversos compostos como moléculas orgânicas e inorgânicas (VINU & MADRAS, 2010). Novos estudos se fazem necessários com aplicações de tecnologias concomitantes visando elucidar as questões relacionadas à toxicidade, uma vez que o TiO<sub>2</sub>, nanoestruturado até o momento, vem sendo descrito como principal agente nanométrico para aplicações ambientais, por ser considerado totalmente atóxico e altamente benéfico ambientalmente (VINU & MADRAS, 2010). Entretanto, como já verificado por GHOSH et al. (2010) e constatado nesse experimento, o TiO<sub>2</sub> nanoestruturado apresentou resultados que demonstraram considerável toxicidade para as plantas estudadas.

#### **7.4. Experimento 3**

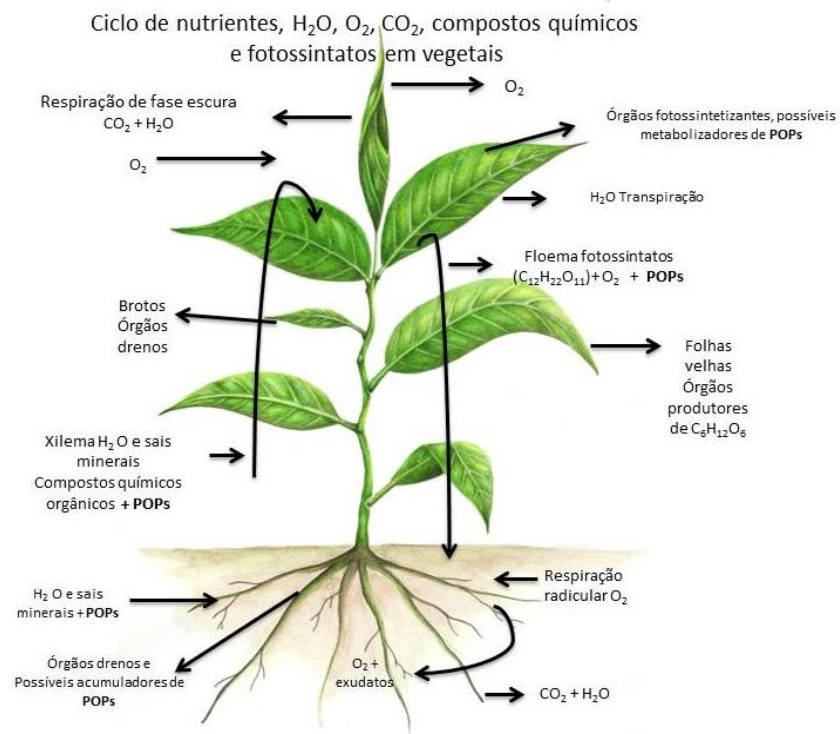
Os resultados dos processos fitorremediativos de POPs utilizando girassol *Helianthus annuus*, L., mostraram maior concentração de contaminantes orgânicos nas raízes em relação à presença destes nas partes aéreas; resultados apresentados na Tabela 10. Estes resultados estão em concordância aos descritos na literatura, que relacionam maiores acúmulos de poluentes nas raízes dos vegetais que se desenvolveram em solos contaminados com POPs. Muitos autores associam esse acúmulo à presença de fungos micorrizicos arbusculares encontrados nas raízes e que por sua vez ampliam a superfície de contato desta com o solo. Autores como VERMA & ARYA (1998) constataram que estes fungos são os reais fitorremediadores e que as plantas hospedeiras são contaminadas por processo de transferência do poluente (SOUZA, 2011).

Outros autores ainda sugerem que, não somente os fungos, mas a rizosfera ao redor da planta auxilia nos processos de fitorremediação (KUIPER, et al., 2004).

Entretanto, no presente estudo, conduzido *in vitro* não foi possível fazer referência a tais interações ou associações com os vegetais, uma vez que, todos os organismos biológicos, exceto os próprios explantes, foram removidos da cultura durante os processos de assepsia.

Os resultados de acúmulo de resíduos dos POPs na raiz do girassol ficou entre 9,4 % para o composto 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno a 87,0 % para o 4,4'-DDT (Tabela 10). Este efeito pode estar relacionado ao fato das raízes, frutos, sementes e brotos serem reconhecidamente órgãos drenos de fotossintatos e então desprovidos de cloroplastos, sendo que nestes casos uma transferência em vasos condutores floemáticos seria evidenciada no processo e resíduos poderiam ser detectados. As hipóteses de acúmulo destes poluentes em raízes relacionando ao contato com os poluentes dos meios de cultura são inconsistentes com a anatomia e morfologia destes tecidos vegetais, pois as raízes são isoladas por uma camada de células esclerificadas “endoderme” que são impermeáveis (LIESE, 1998). A hipótese mais provável é a de transporte de fluxo de massa pelas raízes diretamente ao xilema por via apoplástica e simplástica, sua transferência pelo vegetal e posterior translocação juntamente com os fotossintatos a órgãos drenos como raízes e sementes, analogamente ao que acontece com os nutrientes e a água, Figura 20 (HERBICIDE ACTION COURSE, 2003).

Estudos que focaram a dinâmica poluente/planta na transferência de poluentes e suas respectivas bioconcentrações para tecidos vegetais, descrevem físico-quimicamente a importância do coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), a pressão de vapor dos poluentes orgânicos e a temperatura do ambiente, relacionando-os a mobilidade e solubilidade em água (PATERSON et al., 1994; KATAOKA et al. 2010). Em condições ideais, tais poluentes naturalmente apolares, podem ser solubilizados em água e transportados para as plantas. MATSUMOTO, (2009) propõe que exsudatos eliminados pela raiz de baixo peso molecular como ácido cítrico, proteínas e outros ácidos orgânicos podem contribuir para um aumento da solubilidade de compostos como os POPs e, além disso, cita que poucas famílias vegetais possuem esta capacidade a exemplo da família das curcubitáceas (MATSUMOTO et al. 2009; JOHNGENSON, 2001).



**Figura 20:** Esquema representativo da translocação de fotossintatos,  $H_2O$ , nutrientes, compostos orgânicos, e outros compostos (POPs) em floema e xilema de plantas.

Outros autores descrevem particularmente outros compostos hidrofóbicos encontrados em folhas e frutos (HÜLSTER et al. 1994; INUI et al. 2008), PCBs (WHITE et al. 2006; INUI et al. 2008), DDT e seus metabolitos (WHITE, 2001; WHITE et al. 2003a; LUNNEY et al. 2004), clordano (MATTINA et al. 2000, 2004), HCB (ECKER & HORAK, 1994), heptacloro (LICHTENSTEIN et al. 1965), e heptacloro epoxido (CAMPBELL et al. 2009).

Os poluentes fitorremediados pelo girassol possuem estes valores favoráveis a este tipo de mobilidade estudada. A Tabela 12 apresenta alguns parâmetros físico-químicos dos POPs avaliados no presente trabalho.

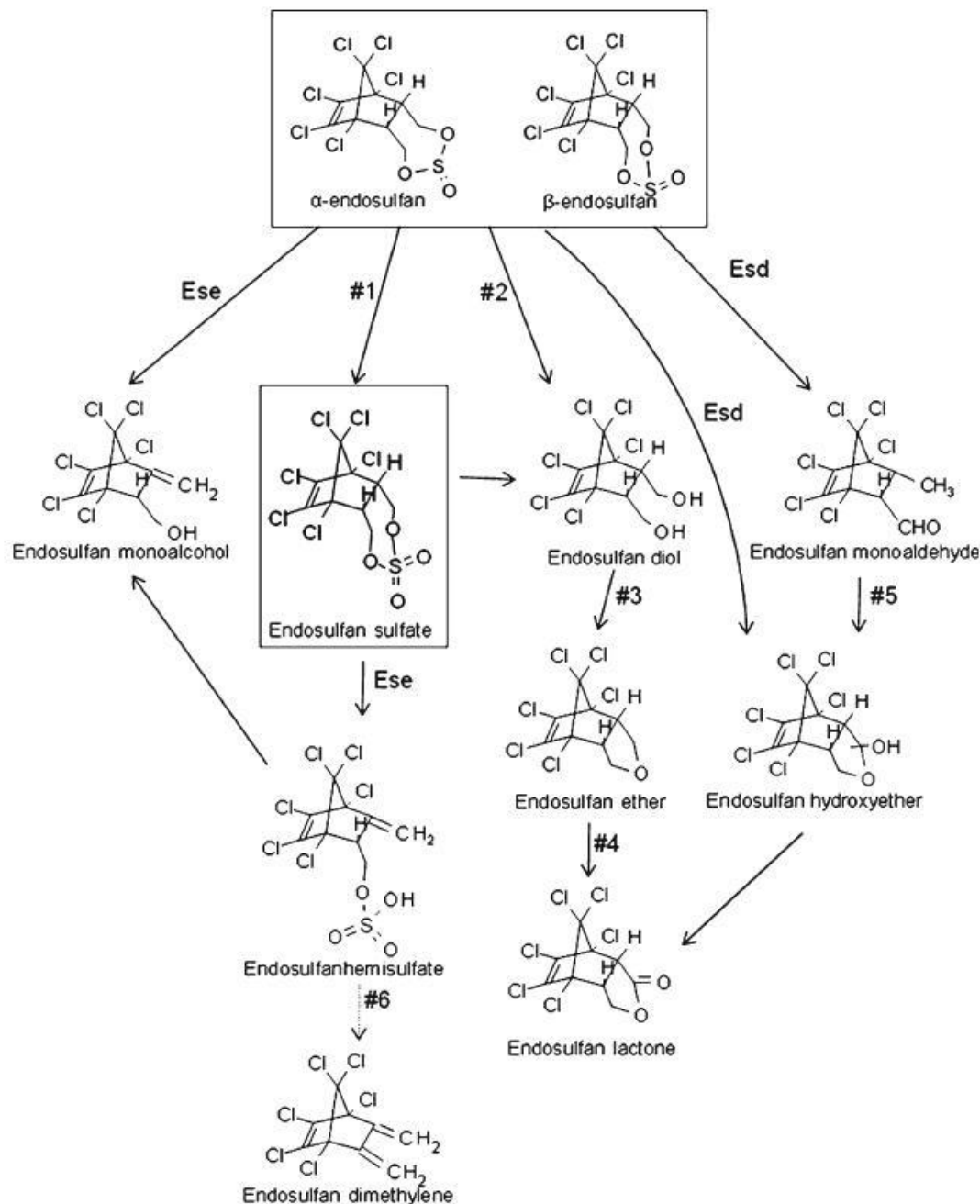
Processos descritos na literatura, porém ainda não estudados para o girassol, como descloração, metabolização de compostos e geração de metabólitos provenientes da degradação da molécula (VERMA et al, 2006; SOLYANIKOVA & GOLOVLEVA, 2011), podem estar relacionados com os resultados obtidos para o Endosulfan alfa.

Os estudos foram conduzidos através de biorremediação de endosulfan com uso de bactérias e fungos e descrevem sua degradação em 3 produtos finais como: endosulfan lactona, endosulfan dimetileno e endosulfan monoálcool (Figura 21), propondo rotas de biotransformação para gerar metabólitos e subprodutos de degradação.

**Tabela 12:** Propriedades físico-químicas dos POPs estudados.

POPs	Pressão de vapor (mm Hg, 20 °C)	Solubilidade em água ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Log $K_{ow}$ *
(2,4,5,6)Tetra- cloro-m-xileno	Não disponível	Não disponível	Não disponível
$\delta$ -HCH	$3,6 \times 10^{-7}$	5	4,14
$\gamma$ – HCH	$4,2 \times 10^{-5}$	7,3	3,61 - 3,72
Heptacloro	$4 \times 10^{-4}$	0,056	6,1
Aldrin	$7,5 \times 10^{-5}$	0,011	6,5
Heptacloro epoxido	$1,95 \times 10^{-5}$	0,0275	5,4
trans-clordano	$2,9 \times 10^{-5}$	0,056	5,54
Endosulfan Alfa	$1,2 \times 10^{-5}$	0,32	4,74
Clordano	$0,1 \times 10^{-5}$	insolúvel	5,54
Dieldrin	$3,1 \times 10^{-6}$	0,110	6,2
4-4- DDE	$6,2 \times 10^{-6}$	0,14	6
Endrin	$2 \times 10^{-7}$	0,2	5,6
4 -4 DDD	$1,6 \times 10^{-7}$	0,025	6,91
4-4-DDT	$1,1 \times 10^{-7}$	0,085	6,79
Metoxicloro	$1,4 \times 10^{-6}$	0,45	4,68-5,08
Mirex	$7,5 \times 10^{-7}$	3,4	5,28
Decacloro bifenila	$4 \times 10^{-4}$	0,42	5,6

\*Coeficientes de distribuição Octanol-água ( $K_{ow}$ ).



**Figura 21:** Proposta de vias de biotransformação descritas por Weir et al. (2006), envolvem “Ese mooxigenase”. A seta (#6) indica uma reação que ocorre na presença do microorganismos *Mycobacterium sp.* A via ESD indica a via descrita por (SUTHERLAND et al. 2002b) e envolve ESD monooxigenase, gerando endosulfan monoaldeído ou endosulfan hidroxietter de β-endosulfan.

Os resultados obtidos para a acumulação radicular dos isômeros HCH apresentaram acumulação de 15,2 % para  $\gamma$ -HCH e 24,6 % para  $\delta$ -HCH.

Os contaminantes orgânicos, como os HCHs, podem acumular nas raízes essencialmente como resultado de dois diferentes processos: (i) absorção e translocação (BURKEN & SCHNOOR, 1998), para compostos com baixa hidrofobicidade ( $\log K_{ow}$  valores entre 0,5 e 3,5, Schnooret al, 1995) e (ii) adsorção em tecidos de raiz (PEREIRA et al., 2007).

Considerando que os isômeros  $\delta$ -HCH e  $\gamma$ -HCH apresentam valores de  $\log K_{ow}$  de 3,60 e 4,14 respectivamente, os 2 processos podem ser considerados possíveis.

Os isômeros HCH podem ter se acumulado nas raízes e sua adsorção sobre a superfície radicular (partição hidrofóbica) pode ser considerada uma importante rota de contaminação por este poluente. Adsorção ocorre através de particionamento reversível e preferencial do contaminante hidrofóbico e as superfícies hidrofóbicas (cutícula ou os compostos hidrófobos das paredes celulares) (PIVETZ, 2001), sendo esse processo afetado tanto pela quantidade de composto disponível como pela fração lipídica presente.

Para prever a captação de poluentes orgânicos por plantas, (BRIGGS et al. 1982) e BURKEN & SCHNOOR (1998) desenvolveram relações experimentais com base em  $\log K_{ow}$ . De acordo com seus modelos, apenas compostos "moderadamente hidrofóbicos" ( $0,5 < \log K_{ow} < 4,5$ ) seriam absorvidos e translocados significativamente dentro de tecidos vegetais.

No presente trabalho, o processo fitorremediativo estudado utilizando girassol apresentou eficiência na absorção dos POPs com  $\log K_{ow}$  no intervalo de 4,50 a 6,79 (heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido, trans-clordano, clordano, dieldrin, DDE, DDT, metoxicloro, mirex e decacloro bifenila). Observou-se ainda que dentre as moléculas citadas acima, as com menores valores de  $\log K_{ow}$  foram encontradas em maiores concentrações na parte aérea da planta, exceto o clordano, aldrin e heptacloro. Estes resultados sugerem que, apesar das previsões com base em  $\log K_{ow}$  serem adequadas ao modelo, a transferência de alguns POPs em plantas ocorre em grande parte por absorção e translocação, devido também a velocidade de deslocamento iônico de solução no xilema.

Além disso, os possíveis metabólitos e suas rotas de degradação não foram estudados no presente trabalho. Porém, vale ressaltar que, em uma avaliação exploratória foram encontrados muitos compostos clorados diferentes dos POPs estudados e que poderiam ser provenientes de reações adversas ou até de degradação na planta avaliada. O fato de monitorar 24 compostos ao mesmo tempo em um processo de remediação pode ser considerado um grande desafio, visto que, são muitas as variáveis e interferências para alcançar um estudo mais detalhado para cada poluente.

#### **7.5. Experimento 4**

O termo fotocatalise (fotoquímica + catálise) pode ser definido como a aceleração de uma fotorreação pela presença de um catalisador. O catalisador pode acelerar a fotorreação por interação como substrato em seu estado fundamental ou excitado e/ou com umdos foto-produtos primários dependendo do mecanismo defotorreação e permanecendo inalterado no final de cada ciclo catalítico.

Com o objetivo de explorar o efeito da concentração do catalisador no processo de degradação de POPs, neste trabalho foi possível avaliar o aumento da concentração de  $\text{TiO}_2$  nanoestruturado de  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na degradação dos POPs estudados (Tabela 9). Os resultados mostraram um aumento da atividade de  $\text{TiO}_2$  de modo não proporcional à degradação de POPs. Este resultado é esperado, pois estudos têm indicado que a degradação fotocatalisada está relacionada à capacidade da nanoestrutura em gerar radicais livres que serão em última análise, os responsáveis por reduzir ou oxidar os poluentes (VINU & MADRAS, 2010), levando-os a subprodutos com menor toxicidade ou em ação conjunta com a biota do meio, por processo de mineralização.

A Tabela 9 em discussão mostra ainda que, o potencial de fotodegradação tende a ser mais eficiente com o aumento da quantidade de sítios ativos presentes, esse fato pode ser observado nos resultados obtidos para a degradação do heptacloro.



Por outro lado em situações de alta concentração de poluentes poderá haver produção de intermediários, que serão adsorvidos na superfície do catalisador diminuindo sua atividade catalítica ou mesmo inativando-o (BAHNEMANN et al., 2007).

## 8. Conclusão

A produção de cultura *in vitro* do bambu *Bambusa vulgaris* var. *vitatta* foi obtida a partir do desenvolvimento de várias etapas metodológicas resultando num processo inédito e economicamente vantajoso quando comparado a produção usual *in vivo*.

A toxicidade do TiO<sub>2</sub> nanoestruturado (P25 da Degussa Co, Alemanha) foi constatada para ambas as espécies estudadas, em diferentes estágios de desenvolvimento dos explantes demonstrando a importância de se conhecerem seus efeitos no meio ambiente e em sistemas biológicos, uma vez que já vem sendo utilizado comercialmente em diferentes ramos da atividade humana.

A espécie, *Bambusa Vulgaris* var. *vitatta*, não apresentou resistência aos poluentes orgânicos avaliados impossibilitando o estudo fitorremediativo.

A espécie de girassol *Helianthus annuus* L. demonstrou excelente capacidade fitorremediativa *in vitro* para a maior parte dos compostos estudados, inclusive isolando os efeitos da ação de fungos micorrízicos arbusculares sobre os de extração, acumulação e remediação de poluentes do meio.

O estudo da fitorremediação fornece informações importantes para duas situações: uma quanto à prevenção de se produzir girassol com finalidade alimentícia em áreas contaminadas pelos POPs, e outra no aproveitamento da planta após o processo de fitorremediação com na produção energética de biomassa e biodiesel.

O processo de remediação dos POPs em meio aquoso realizado com TiO<sub>2</sub> nanoestruturado apontou uma variação na taxa de degradação mínima de 12,9% a uma taxa máxima de 56,8% demonstrando a capacidade para a aplicação tecnológica em diferentes processos para a despoluição de corpos d'água.

Estas propostas, em tese, podem estar à ordem, como diretrizes para procedimentos futuros no estabelecimento de novas tecnologias no campo da biotecnologia industrial, mais especificamente na recuperação de áreas, matrizes e recursos contaminados por POPs tendo em vista que a metodologia de remediação desenvolvida *in vitro*, apresentou vantagens como uso exponencialmente menor de materiais e reagentes, diminuindo custos e resíduos, além de ser ambientalmente adequada.

## 9. Referências Bibliográficas

- AHMED, S.; RASUL, M.G.; BROWN, R.; HASHIB, M.A. Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: a short review. **J. Environ. Manage.** v.92, n.3, p. 311-330, 2011.
- ALEXANDER, M.P. & RAO, T.C.R. *In vitro* culture of bamboo embryos. **Curr. Sci.** Bangalore, v.37, n.14, p.415-19, 1968.
- ANDERSON, R., Sample Pretreatment and Separation, **Analytical Chemistry by Open Learning John Wiley & Sons.** 1987.
- ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for purification and recovery. **Catal. Today**, v. 53, p. 51-59, 1999.
- AOAC. **Guidelines for Single Laboratory Validation of Analytical Methods for Tracelevel Concentrations of Organic Chemicals.** Washington, 1999.
- ARÁNTGUI, J.; PRADO, J.; CHAMARRO, E.; ESPLUGAS, S. J., Kinetics of the UVdegradation of atrazine in aqueous solution in the presence of hydrogen peroxide. **J.Photochem. Photobiol.** v. 88, n1, p. 65-74, 1995.
- ARDREY, R. E.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Huddersfield, 2003.
- ARTIOLA, J.F.; PEPPER, I.L.; BRUSSEAU, M., Environmental monitoring and characterization, **Elselvier Academic Press.** 2004.
- ASSUMPÇÃO, J.C.; Endrin. In Fernícula, N.A.G.G.; Oliveira, S.S., **Cadernos de Referência Ambiental, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs).** Centro de Recursos Ambientais, v. 13, p. 283-304, 2002.
- ATLAS BRASIL, **Abastecimento Urbano de águas**, disponível na internet:<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/Home.aspx>, arquivo capturado em 22 de janeiro de 2013.
- ATTERBY, H.; SMITH, N.; CHAUDHRY, Q.; STEAD, D. **Pest.Outlook.**2002.
- AZZINI, A.; GONDIM-TOMAZ, R.M.A.; ERISMANN, N.M., Desfibramento de Cavacos Laminados de *BAMBUSA VULGARIS* SCHRAD Visando à Extração de Amido. **Bragantia.** v. 57, n. 1, 1998.
- AZZINI, A. & SALGADO, A. L. B. Material Fibroso Em Colmos de Bambu. **O PAPEL.** SAO PAULO, v. 53, n. 1, p. 49-52, 1992.
- BAG, N; CHANDRA, S; PALNI,LM; NANDI, SK; Micropropagation of Dev-ringal **Plant Sci.** v.28, n.156(2), p.125-135, 2000.

BAHNEMANN, W.; MUNEER, M.; HAQUE, M.M. Titanium dioxide-mediated photocatalysed degradation of few selected organic pollutants in aqueous suspensions, **Catal. Today**. v.124, p.133-148, 2007.

BAKER, A. J. M.; McGRATH, S. P.; SODOLI, C. M. D. & REEVES, R. D. (1994) - The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resour. Conserv. Recy.** Amsterdam, v.11, p.41-49, 1994.

BEAR, J. VERRUIJT, A. Modeling groundwater and flow and Pollution, Published by D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1979.

BERTAZZI, A.; PESATORI, A.C.; CONSONNI, D.; TIRONI, A.; LANDI, M.T. & Zocchetti C. Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. **Epidemiol.**v.4, n.5, p.398-406, 1993.

BEZBARUAH, A.N.; THOMPSON, J.M.; CHISHOLM, B.J. **J. Environ. Sci. Health Part B.** v.44, n.518, 2009.

BEZBARUAH, A.N.; THOMPSON, J.M.; CHISHOLM, B.J. **J. Environ. Sci. Health Part B.**v.44, n.518, 2009.

BICKLEY, R. I.; GONZALEZ-CARRENO, T.; LEES, J. S.; PALMISANO, L.; TILLEY,R.J.D. A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. **J. Solid State Chem.** v.92, Ed.1, p.178-190, Maio, 1991.

BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos in vitro de *Ananas lucidus* Miller.**Rev. Bras. Hortic. Ornam.** Campinas, v.9, n. 1, p.37-44, 2006.

BOUNAIM, L.; SMEYERS, N.J.; GONZALEZ -JONTE, RH.; ALVAREZ-IDABOY, JR.; EZZAMARTY, A.; SMEYERS; YG. A study of the nucleophilic attack of the beta - lactamic bond of antibiotics in water solution **Theochem.**v.539, p.233 -43, 2001.

BRIGGS, G. G.; BROMILOW, R. H.; EVANS, A. A. Relationship between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. **Pestic. Sci.**, v.13, p.495–504.1982.

BRITO, J.O.; TOMAZELLO, M.F.; Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. IPEF, n.36, p13-17, 1987.

BROOKS, R. R (1998) - Phytoremediation by volatilisation. In Brooks, R.R [Ed], Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals, **CAB International.** Wallingford, p.289.

BURKEN, J. B. VOCs Fate and Partitioning in Vegetation: Use of Tree Cores in Groundwater Analysis. **Environ. Sci. Technol.** v. 36, n. 21, p.4663 -4668, 2002.

BURKEN, J.G.; SCHNOOR, J.L. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. **Environ. Sci. Technol.**v.32, p.3379-3385, 1998.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G.; PRESTES, O.D.; ZANELLA R. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Quim. Nova**, v. 34, n. 9, p.1604-1617, 2011.

CAMPBELL, S; ARAKAKI, AS.; LI, QL. Phytoremediation of heptachlor and heptachlor epoxide in soil by Cucurbitaceae. **Int J Phytoremediat.**v.11, p.28–38, 2009.

CARNEIRO, M.A.C; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesq. Agropec. Bras.** v.37, n.11,p.1629-1638, 2002.

CENPES, Disponível na internet:<http://www.biodieselbr.com/noticias/mamona/insucesso-mamona-petrobras-aposta-girassol-05-05-08.htm> Arquivo capturado em 23 de janeiro de 2013.

CETESB/GTZ (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental/Deutsche Gesellschaft fur Technische), **Manual de Áreas Contaminadas. Pré-edição p/ avaliação interna.** vols. 1 e 2, São Paulo: Cooperação Técnica Brasil-Alemanha CETESB/GTZ, 1997b

CHAMBERS, S.M.; HEUCH, J.H.; PIRRIE, A. Micropropagation and *in vitro* culture of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. **Plant Cell, Tissue and OrganCult.** Dordrecht, v.27, n.1, p.45-8, 1991.

CHATURVEDI, H.C.; SHARMA, M.; SHARMA A.K. *In vitro* regeneration of Science, *Dendrocalamus strictus* Nees through nodalsegments taken from field-grown culms. **Plant Science.** Limerick, v.91, p.97-101, 1993.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C. S. F. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

COHEN, M. H. Oxydation de faibles concentrations de vapeurs organiques (COV) parphotocatalyse hétérogène. **Mémoire (Maîtrise en génie chimique)**. Université de Montréal. 2004.

Comissão Nacional do Meio Ambiente. Disponível na internet <http://www.mma.gov.br/port/conama/estr1.cfm>. Arquivo capturado em 19 de fevereiro de 2013.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Disponível na internet:[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/areas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/areas.asp). Arquivo capturado em 12 de maio de 2013.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Disponível na internet <http://www.cetesb.sp.gov.br/Institucional/historico.asp>. Arquivo capturado em 10 de março de 2013.

CONNELL, D. W.; MILLER, G. J.; MORTIMER, M. R.; SHAW, G. R.; ANDERSON, S.; **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v.29, p.47, 1999.



CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO, disponível na internet <http://www.environment.gov.au/settlements/chemicals/international/pop.html> Arquivo capturado em 15 Abril de 2013.

CORTÉS, L.F.B. Sistemas de Propagación Y Metodologías para La Producción Masiva de Guadua (Planificación, infraestructura, actividades, rendimientos, resultados y experiencias). **IN: I Congreso Mundial de Bambú/Guadua**. Pereira p.43-46, 1992.

COUTINHO, H.D.; BARBOSA, A.R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização, **Silva Lusitana**.v.15, n.1, p.103-117, Lisboa, 2007.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. **Quím.Nova**. v.25, p.995-1002, 2002.

DAVIS, L.C.; CASTRO-DIAZ, S.; ZHANG, Q.; ERICKSON, L.E.; **Crit. Rev. Plant Sci**. v.21, p.457-491, 2002.

DEL BINO, G.; ACEVEDO, J.; AMANATIDIS, G.; ANGELETTI, G.; BARTH, H.; BUSING, J.; CATIZZONE, M.; NOLAN, C. & VENNEKENS, J., Environmental Change Impacts and Environmental Technologies: Activities and recent results. **EUR 18022**. Brussels: Environment & Climate Programme - DGXII-D1, European Commission, 1997.

DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; DE BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO PELEGRINI, S.R. **Fitorrem**. 2003.

DUBOIS, A.N. Soil contamination; new research. **New Science Publishers**. 2008.

DUROVIC, R.D.; UMILJENDIC, J.S.G.; CUPAC, S.B.; IGNJATOVIC, L.M. Solid phase microextraction as an efficient method for characterization of the interaction of pesticides with different soil types. **J. Braz. Chem. Soc**. v. 21, n.6, p.985-994, 2010.

ECKER, S.; HORAK, O. Pathways of HCB-contamination to oilpumpkin seeds. **Chemosphere**.v.29, p.2135-45, 1994.

EICHELBERGER, J.W.; MUNCH, J.W.; SHOEMAKER J.A. **Method 525.2**. Revision v.1.0, 1994.

EL-HASSAN, A.A. & DEBERGH, P. Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (young) McClure. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult**. v.10, n.1, p.73-7, 1987.

EMBRAPA, disponível na internet:

[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/01\\_Importancia\\_economica.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/01_Importancia_economica.htm), arquivo capturado em 10 de janeiro de 2013.

EPA, 1999, Disponível na

Internet: <http://www.epa.gov/region9/qa/pdfs/8081.pdf> arquivo capturado em 5 de fevereiro de 2013.

EU - EUROPEAN UNION. Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, **Guidelines for the Residue Monitoring in the European Union**. third Edition, 2003.

EURACHEM GUIDE. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. v. 61, 1998.

FARIA, L.C.; RODRIGUEZ, L.C.E. **Rev. Cient. Eletr. Eng. Flor.** Ano VII, n.12, agosto 2008.

FARRELY, D. The book of bamboo. **Sierra Club Books**. p.340, San Francisco, EUA. 1984.

FATTA-KASSINO, D.; VASQUES, M. I.; KUMMERER, K. **Chemosphere**, v. 85, p.693-99, 2011.

FDA - UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, **Review Guidance**, Validation of Chromatographic Methods, 1994. In **fernícula**, N.A.G.G., Oliveira, S.S., 2002. **Cadernos de Referência ambiental**, v. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p. 417-448, 2002.

FERNÍCULA, N.A.G.G.; 2002. Mirex. In **Fernícula**, N.A.G.G., Oliveira, S.S.; **Cadernos de Referência ambiental**. vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p. 417-448, 2002.

FERREIRA, I.V.; DANIEL, L.A. Fotocatálise heterogênea com TiO<sub>2</sub> aplicada ao tratamento de esgoto sanitário secundário. **Eng. Sanit. Amb.** v. 9, n.4, p.335-342, 2004.

FETTER, CW. "Contaminant Hidrogeology" Second Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.

FEINBERG, M.; RAGUÉNÉS, N. **Anal. Chim. Acta**. v.39, p.239, 1999.

FIGUEIREDO, J.G. Avaliação de gramíneas tropicais como bioindicadoras da presença do flúor. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994 .87p.

FILGUEIRAS, T. S. Bambus nativos do Distrito Federal, Brasil (Gramineae: Bambusoideae). **Rev. Bras. Bot.** v.11, p.47-66, 1988.

FIORIO, P.R.; DEMATTE, J.A.M.; SPAROVEK, G. Cronologia e impacto ambiental do uso da terra na Microbacia Hidrográfica do Ceveiro, em Piracicaba, SP. **Pesq. Agropec. Bras.** v.35, n.4, p.671-679, 2000.

FUENTES, M.J.; FONT, R.; GOMEZ-RICO, M.F.; MARTÍN-GULLÓN, I.; Pyrolysis and combustion of waste lubricant oil from diesel cars: Decomposition and pollutants. *Journal of analytical and applied pyrolysis*. **JAAP**, 2007.

- FUKATSU, T.; NIKO, N. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, n.2, p.643-50. 2000.
- GALASSI, S.; VIGANO, L.; SANNA, M.; **Chemosphere.** v. 32, p.1729-39, 1996.
- GALHIANE, M.S.; RISSATO, S.R.; ALMEIDA, M.V. **Chemosphere.** v.65, p.1949-1958, 2006.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. **Exp. Cell. Res.** v.50, p.151-158, 1968.
- GERE, D. R.; KNIPE, C. R; CASTELLI, P. **J. Chromatogr. Sci.**v.31, p.483-494, 1993.
- GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. **Chemosphere.** v.81, n.10, p.1253-62. 2010.
- GIRI, R.R.; OZU, H.; TAKANAMI, R.; TANIGUCHI, S. J.; **Environ. Sci.** v.20, p.1138-1146, 2008.
- GONÇALVES, J. L. M. Características do sistema radicular de absorção do *Eucalyptus grandis* sob diferentes condições edáficas: I Distribuição de raízes nas camadas de solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO. **Anais.** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.876-878, 1995.
- GONÇALVES, M.T.T & PEREIRA, M.A.dos R. Ensaios de resistência mecânica em peças laminadas de bambu. XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – **Conbea**, Fortaleza, 2000.
- GUANG-ZHU, Z. Studies on the chromosome number of some bamboo species with clump rhizomes. **Guangdong Forestry Institute.** p.175-178, 1987a.
- GUANG-ZHU, Z.; CHEN, F. Studies on bamboo hybridization. **Guangdong Forestry Institute.** p.179-184, 1987b.
- GUJARATHI, N.P.; HANEY, B.; PARK, H.J.; WICKRAMASINGHE, R.; LINDEM J.C. **Biotechnology Progr.** v.21 ed.3, p.775-780, 2005.
- HAN, W.Y.; ZHU, W.P.; ZHANG, P.Y.; ZHANG, Y.; LI, L.S. **Catal. Today** v.90, p.319. 2004.
- HAO, S.; JIAO; ZHAO, J.; XING, M.; HUANG, B. **Chromosoma** v.103, p.432-440, 1994.
- HASAN, A.A.; EL DEBERGH, P. **Plant Cell Tissue. Organ. Cult.** v.10, p.73-77, 1987.
- HASENSTEIN K. **Physiol. Plantarum.** v.70, ed.2, p.139–145, 1987.
- HERBICIDE ACTION COURSE: an intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils. **West Lafayette.** p.975, 2003.

HERMANN, J. M. **Catal. Today**. v.53, p.115-129, 1999.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3 ed.**, Wiley, 2007.

HSIUNG, W. Prospects for bamboo development in the world. In: IBC 88, **Prifance**.p.7-9, 1988.

HU, Q.; ZHANG, C.; WANG, Z.; CHEN, Y.; MAO, K.; ZHANG, X.; XIONG, Y.; ZHU, M. J.;**Haz. Mat.** v.154, p.795-806, 2008.

HUANG, L.C. Bamboo callus, cells in liquid suspension, protoplasts and plant regeneration in vitro. In: **Abstr. Intl. Conf. Applied Biol. Biotechnol.** Hongkong: v.4, n.4, 1988.

HUANG, O.; HONG, C.S. **Chemosphere**. 41, 871. 2000.

HUANG, L.C. & MURASHIGE, T. **Bot. Bull. Acad. Sinica**. v.24, n.1, p.31-52, 1983.

HÜLSTER, A.; MULLER, J.F.; MARSCHNER, H. **Environ. Sci. Technol.** v.21, p.1101-1115, 1994.

HYVER, K.J., Sandra, P. (Eds) High Resolution Gas Chromatography, **Avondale Hewllet-Packard**. 1989.

ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, Geneva, Switzerland, May 1997).

INBAR, Priority species of bamboo and rattan.**International network for bamboo and rattan**.IDRC, p.68, New Delhi, India, 1994.

INBAR disponível na internet: <http://inbar.int>Arquivo capturado na Internet dia 15 de janeiro de 2013.

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQCGCRE- 008**, 2007.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos analíticos, **DOQ-CGCRE-008**. Revisão 04, Brasília, 2011.

INUI, H.; WAKAI, T.; GION, K.; KIM, Y.S.; EUN, H. **Chemosphere**.v.73, n.28, p.1602–1607, 2008.

ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of calibration and testing laboratories, International Organization for Standardization, Switzerland, **Geneva**. 2005.

- JACOBSON J.L, JACOBSON S.W. **Neurotoxicol. Teratol.** v.12, p.319-326, 1990.
- JANG, S.J.; KIM, M.S.; KIM, B.W. **Water Res.** v.39, p.2178-88, 2005.
- JANUARY MC, CUTRIGHT TJ, VAN KEULEN H, WEI R. **Chemosphere.** v.70, n.3, p.531-7, 2007.
- JENSEN, W.A. **Botanical Histochemistry: Principles and Praticce.** San Franscico. W. H. Freeman, 1962.
- JESUS, M.G.S.; 2002. DDT. In **Fernícula**, N.A.G.G., Olieveira, S.S. **Cadernos de Referência ambiental.** vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p.159-193, 2002.
- JOHGENSON, JE. **Environ. Health Perspect.** v.109, p.113–139, 2001.
- JOO, S.H.; CHENG, I.F. Nanotechnology for environmental remediation, **Springer Science.** 2006.
- JULLIEN, F. & TRAN THANH VAN, K. **Plant Sci.** v.98, p.199-207, 1994.
- KAMAT, P.; MEISEL, D. **Chimie** v.9, ed.6, p.99, 2003.
- KATAOKA, R.; TAKAGI, K.; KAMEI, I.; KIYOTA, H.; SATO, Y.; **Environ. Sci. Technol.**, v.44, n.6, p.343, 2010.
- KATSUMATA, H.; SADA, M.; NAKAOKA, Y.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K.; **J. Haz. Mat.** p.171- 181, 2009.
- KELLY, A. G.; **Environ. Pollut.** v. 85, p.207-17, 1995.
- KHODAKOVSKAYA, ED.; Carbon Nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACSNano.** 2009.
- KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MC EWEN, C. N.; Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Pratical Guide, **Academic:** London, 1996.
- KLEIN, C.C.; COTTRET, L.; KIELBASSA, J.; CHARLES, H.; GAUTIER, C.; VASCONCELOS, A.T.R.; LACROIX, V.; SAGOT, M.F. Exploration of the core metabolism of symbiotic bacteria **BMC Genomics.** v.13, p.438, 2012.
- KNAUSS J.F .A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, **Tallahassee.** v.89, p.363-365, 1976.
- KOMATSU, Y.H. Estudo da Morfogênese em Calos de *Phyllostachys bambusoides* Sieb. & Zucc. **Tese de Doutoramento**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP. Piracicaba, SP. 1995. p.105.

KOOPMAM-ESSEBOOM, C.; HUISMAN, M.; WEISGLAS-KUPERUS, N.; BOERSMA, E.M.; DE RIDDER, M.A.J.; VAN DER PAAUW, C.G.; TUINSTRA, L.G.M.TH & SAUER P.J.J. **Chemosphere**. v.29, n.9, ed.11, p.2327-2338, 1994.

- KOTRA, LP; MOBASHERY, S. **Inst.Pasteur.** v.96, p.139-150, 1998.
- KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.;BLOEMBERG, G.V.;LUGTENBERG, B.J. **Mol. Plant. Microb. Interact.** v.17, n.1, p.6-15, 2004.
- KYOTO PROTOCOL, disponível na internet:  
[http://unfccc.int/kyoto\\_protocol/items/2830.php](http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php). Arquivo capturado na Internet dia 15 de fevereiro de 2013.
- LANA, R.P. **Revista Bras. Zootec.** v. 38, p. 330-340, 2009.
- LANÇAS, F.M.; BARBIRATO, M.A & GALHIANE, M.S. **Chromatographia.** v.42, p.213-22, 1996a.
- LANÇAS, F.M.; GALHIANE, M. S. & RISSATO, S. R. **Chromatographia.** v.42, p.416-21,1996b.
- LANÇAS, F. M.; DE SÁ, O. R.; GALHIANE, M. S.; RISSATO, S. R.; **Liq. Chrom. & Rel. Technol.** v. 20, p.1945-1957, 1997.
- LARA, W.H.; Bifenilas policloradas. Sua História e seus problemas. **Anais do I Congresso de Toxicologia Tropical.** Manaus, Brasil, p.181-185, 1976.
- LÊ, C.L.**Rev. Suisse Viticult. Arboricut. Horticult.** Lausanne, v.15, n.3 p.189-192, 1983.
- LEANDRO, C.C.; FUSSELL, R.J.; KEELY, B.J. **J. Chromatogr. A.** v.1085, p.207-14, 2005.
- LEGRINI, O.; OLIVEROS E.; BRAUN A. M. **Chem. Rev.**v.93, p. 671-698,1993.
- LEITE, E.M.A., Dieldrin. In Fernícola, N.A.G.G.; Oliveira, S.S., 2002. Cadernos de Referência Ambiental, vol. 13, **Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)**. Centro de recursos Ambientais, p.193-226.
- LEMO, E.P.L.; FONSECA, F.K.P.; FIGUEREDO, J.O.; LEÃO, I.B.; RESENDE, L.P.; SOUZA, C.D. FILGUERAS, T.S.; FERREIRA, M.O., inovações tecnológicas para propagação de espécies de Bambu, **Anais do Seminário nacional do Bambu - Estruturação da Rede de Pesquisa e Desenvolvimento.** v.1, 194.p. Brasília, 2006.
- LIEN, H.L.; ZHANG, W.X. Colloids and Surfaces.**Physicochemical Eng. Asp.**v.191, p.97-104, 2001.
- LIMA, I.V., Heptacloro. In **Fernícula**, N.A.G.G., Oliveira, S.S.; **Cadernos de Referência Ambiental.** vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p.343-84, 2002.
- LITCHFIELD, C.; v. 55, n.3, p.273, 2005.
- LOPES, F. S.; RIBEIRO, H. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.9, n.2, p.215-225, 2006.

- LOZOVEI, A.L. **Iheringia, Sér. Zool.**, n.90, p.3-13, 2001.
- LICHTENSTEIN, EP.; SCHULZ, KR.; SKRENTNY, RF.; STITT, PA. **J. Econ. Entomol.**v.58, p.742–746, 1965.
- LIESE, W., The Anatomy of Bamboo Culms. **INBAR Technical Report N<sup>o</sup>18. International Network for Bamboo and Rattan.**Beijing. 204p., 1998.
- LITTER, M. I. **Applied Catalysis B: Environmental.** v. 23, p. 89-114, 1999.
- MAHLER, C.F.; ANDRADE, J.C.; DA MATTA E.; TAVARES, S.R.L. **Fitorremediação - o Uso de Plantas na Melhoria da Qualidade Ambiental.** Edit. Oficina de texto. São Paulo - BR, 2007.
- MARIANO, E.D.J. **Plant Physiol.** v.17, n.1, p.157-152, 2005.
- MATTINA, M.J.I.; IANNUCCI-BERGER, W.; DYKAS, L. **J Agric Food Chem.**v.48, p.1909–1915, 2000.
- MATSUMOTO, E.; KAWANAKA, Y.; YUN, S.J.; OYAIZU, H. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**v.84, p.205-16, 2009.
- MAZIAH, Z. **RIC Bull.** v.0, n.1, p.6-20, 1991.
- MC CLURE, F.A. **The Bamboos**; edit. Smithsonian Institution Press, London, 1993.
- MCMURRAY, T.A.; DUNLOP, P.S.M.; BYRNE, J.A. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** v.43, p.182, 2006.
- MEDINA, J.C.; CIARAMELLO, D.; CASTRO, G.A.P. Propagação vegetativa do Bambu imperial (*Bambusa vulgaris* Schrad. var. vittata A. et C. Riv.). **Bragantia.** Campinas, v. 21, n. unico, 1962.
- MEHTA, U.I.; RAO, V.R.; RAM, H.Y.M. Somatic embryogenesis in bamboo. In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE. v.5, **Proceedings.** p.109-10, 1982.
- MONTONE, R.C.; TANIGUCHI, S.; BOIAN C.; WEBER. R.R. **Mar. Poll.Bull.** v. 50, p.778-782, 2005.
- MORAES, D.M.; CLAUDETE MIRANDA ABREU, C.M.; MELO, P.T.B.S.; LIMA, A.A.; RODRIGUES, R.R.; DUARTE, G.L. **Rev. Brasil. Sem.** v.24, n, 2, p.38-42, 2002.
- MUNCH J.W. Method 525.2, **Revision 2.0**, 1995.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. **Phys. Plantarum.**v.15, p.475-97, 1962.



MURUNTHAKUMAR, S. & MATHUR, J. **Plant Sci.**v.87, p.109-13, 1992.

NADGIR, A.L.; PHADKE, C.H.; GUPTA, P.K.; PARASHARAMI, V.A.; NAIR, S.; MASCARENHAS, A.F. **Silvae Genet.**, v.33, n.6, p.219-233. 1984.

NETO, J.M.; In **Fernícula**, N.A.G.G., Olieveira, S.S.**Cadernos de Referência ambiental**. vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais. p.19-62, 2002.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. **Science** v.163, p.85-87, 1969.

NOGUEIRA, R.F.P. Fotodestruição de compostos potencialmente tóxicos utilizando TiO<sub>2</sub> e luz solar. **Tese de Doutorado**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995 87p.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W.F. A. **Quim. Nova**, v. 21, p. 69-74, 1998

NYSDOH (New York State Department of Health), 1981. Love Canal: A Special Report to the Govern & Legislature. New York: Office of Public Health, New York State Department of Health. Disponível na Internet [http://ublib.buffalo.edu/libraries/projects/lovecanal/disaster\\_gif/records/healt1.html](http://ublib.buffalo.edu/libraries/projects/lovecanal/disaster_gif/records/healt1.html)  
Arquivo capturado em 01 de fevereiro de 2013.

OLIVEIRA, S.S. Clordano. In **Fernícula**, N.A.G.G., Olieveira, S.S.; **Cadernos de Referência ambiental**, vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p.121-158, 2002.

OLIVEIRA, R. L.; MUNIZ, J. A.; ANDRADE, M. J. B.; REIS, R. L. **Ciência e Agroecol**; v.33, n.1, p.113-119, 2009.

PATERSON, S.; MACKAY, D.; MCFARLANE, C.; **Environ. Sci. Technol.** v.28, p.2259-2266,1994.

PEREIRA, M.A.; BERALDO, A.L.; **Bambu de Corpo e Alma**, Edit. Canal 6; 230 p.; 2007.

PEREIRA, R.C.; MONTERROSO, C.; MACÍAS, F.; CAMPS-ARBESTAIN, M. **Environ Pollut.** v.155, ed.2, p.350-8, 2008.

PIRES, L.S.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; LEITE, F.P.; BRITO, L.F. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.41, n.4, p.687-695, 2006.

PIVETZ, B.E., Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. **EPA/540/S-01/500**. United States Environmental Protection Agency, Washington 2001.

PRIEGO-CAPOTE; F.; YELEI S. S., SHANSI-S. A.; STAFFAN, N. **Anal. Chem.** v.80, n.8, p.2881-2887, 2008.

PRUTPONGESE, P. & GAVINLERTVATANA, P. **Hortscience** v.27, n.5, 453-4, 1992.

QUAN, X.; ZHAO, X.; CHEN, S.; ZHAO, H.; CHEN, J.; ZHAO, Y. **Chemosphere** v.60 n.2, p.266-73, 2005.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.; Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Application, Hemisphere Publishing Co: Washington, 1985.

RAO, I.U.; RAO, I.V.R.; NARANG, V. **Plant Cell Rep.**v.4, n.4, p.191-4, 1985.

RAO, A. N. Genetic diversity of woody bamboos - Their conservation and improvement 2000. Disponível na internet [http://w.w.w.ipgri.egiar.org/Publications/HTML Publications](http://w.w.w.ipgri.egiar.org/Publications/HTML%20Publications). Acesso em: Out. 2012.

RAJÃO, H. & CERQUEIRA, R. **Rev. Bras. Zool.** v.23, n.3, p.597-607, 2006.

RELATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO HUMANO (2013), disponível na internet <http://www.un.cv/files/HDR2013%20Report%20Portuguese.pdf> Arquivado em 12 de janeiro de 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; SOUZA, A.G.; APON, B.M. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p.1038-1047, 2005a.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; GERENUTTI, M. **Rev. Inf. Tecnol. (CIT)** v.16, n.16, 2005b.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; ALMEIDA, M.V.; GERENUTTI, M.; APON, B.M. **Food Chem.** v.101, p.1719-1726, 2007.

RIOS, H.C. Técnicas para La Reproducción Y Propagación de *Guadua Angustifolia* Em Colombia. IN: **I Congresso Mundial de Bambú/Guadua**. Pereira p.47-51, 1992.

RODRIGUES, C.P.; ZIOLLI, R.L.; GUIMARÃES, J.R. **J. Braz. Chem. Soc.** v.18, n.1, p.126-134, 2007.

ROMBKE, J.; HEIMBACH, F.; HOY, S.; KULA, C.; SCOTT-FORDSMAND, J.; SOUSA, P.; STEPHENSON, G.; WEEKS, J. (Eds.) 2003. **Effects of Plant Protection Products on Functional Endpoints in Soil (EPFES)**. Lisbon, 24, SETAC Press, Pensacola, USA, 109p., 2002.

ROSSI, C.; LIMA G.P.P. **Sci. Agric.** v.58, n.1, p.197-99, 2001.

SALGADO, A. L. B. Propagação vegetativa de bambu. **Instituto Agrônomo**, Campinas, v. 39, n. 3, p. 17, 1987.

SALGADO, P.E.T.; bifenilas Policloradas. In **Fernícula**, N.A.G.G., Oliveira, S.S.; **Cadernos de Referência Ambiental**, v.13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, 63-120p., 2002.

SALEME, H.; VIRUEL, S.C. de. Estructuras de bambu en la arquitectura moderna. In: Memorias, **XXVII Jornadas Sudamericanas de Ingeniería Estructural**. Tucuman - Argentina. 18-22p. de Septiembre de 1995.

SANTOS, E.A.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, L.R.; COSTA, M.D. & SILVA, A.A. **Planta Daninha**, v.25, p.259-265, 2007.

SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; PIRES, F.R.; SILVA, A.A. & SANTOS, E.A. (*Canavalia ensiformis* (1). dc.). **Ciênc. Agro tecnol.**, v.30, p.444-449, 2006a.

SCHNOOR, J.L.; LICHT, L.A.; MCCUTCHEON, S.C.; WOLFE, N.L. & CARREIRA, L.H. **Environ. Sci. Technol.** v.29, p.318-323, 1995.

SEMENTES DO BRASIL. Girassol: **Manual do produtor**. São Paulo, 30p., 2001.

SHEN, C.; ZHANG, Q.; FANG-CHENG BI, J.; YAO, N. **Am. J. Bot.** v.97, n.10, 1602-9, 2010.

SILVA, M.A.; SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MELO, N.F.; MAIA, L.C. **Acta Bot. Bras.** v.20, n.2, p.249-256, 2006.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. **Quim. Nova**, v.34, n.4, p.665-676, 2011.

SODERSTROM, T. R. Some Evolutionary Trends in the Bambusoideae (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 68, n.1, p.15-47, 1981.

SOLYANIKOVA I, GOLOVLEVA, L. **Mikrobiol.** v.80, n.5, p.579-94, 2011.

SOUZA, L.A.; ANDRADE, S.A.L.; SOUZA, S.C.R.; SCHIAVINATO, M.A. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. v.35, n.4, p.1441-1451, 2011.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. New York, v. 92, p.8089-8091, 1995.

STEVENS, J. L.; NOTHCOTT, G. L.; STERN, G. A.; TOMY, G. T.; JONES, K. C.; **Environ. Sci. Technol.** v.37, p.462-7, 2003.

SURESH, B.; RAVISHANKAR, G.A. **Crit.Rev.Biotechnol.** v.24, n.2-3, 97-124, 2004.

SUTHERLAND, T.D.; HORNE, I.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. **Appl Environ Microbiol** v.68, p.6237-6245, 2002b.

STUKUS, P.E. Antimicrobial testing. The Kirby-Bauer method (filter-paper disk method). In: STUKUS, P.E. (Ed.). **Investigating Microbiology: a laboratory manual for general microbiology**. Orlando: Harcourt Brace & Company, cap.44, 243-247p. 1997.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; MCCUTCHEON, S.C. **Ecol. Eng.**, v.18, p.647-658, 2002.

TANABE, S. **Environ. Pollution** v. 50, n.1-2, p.5-28, 1988.

TERRY, N.; BANUELOS, G.S. **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. CRC Press, 2000.

TOLEDO, H.H.B.; Hexaclorobenzeno. In **Fernícula**, N.A.G.G., Oliveira, S.S.; **Cadernos de Referência ambiental**, vol. 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos ambientais, p.385-416, 2002.

TRABULSI, LR.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, São Paulo: Atheneu, 2008.

TSAY, H.S.; YEH, C.C.; HSU, J.Y. **Plant Cell Reports** v.9, n.7, p.349-51, 1990.

UNEP – Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Disponível na internet: <http://www.pops.int>. Arquivo capturado na Internet dia 12 de Dezembro de 2012a.

UNEP – Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Fifth meeting of the Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC5). Disponível na internet <http://chm.pops.int/>. Arquivo capturado em 12 de maio de 2013.

USEPA (UNITED States Environmental Protection Agency) – PCB ID – Toxicity Equivalent Factors (TEFs). Disponível na internet: <http://www.epa.gov/toxteam/pcb/tefs.html>. Arquivo capturado em 23 de abril de 2013.

VANDENBERG, M.; BIRNBAUM, L.S.; DENISON, M., DEVITO, M.; FARLAND, W. FEELEY, M.; FIEDLER, H.; HAKANSSON, H.; HANBERG, A.; HAWS, L.; ROSE, M.; SAFE, S.; SCHERENK, D.; TOHYAMA, C.; TRITSCHER, A.; TUOMISTO, J.; TYSKLIND, M.; WALKER, N.; PETERSON, R.E.; The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxins- like compounds. **Toxicological Sciences**.v.93, n.2, p.223-41. 2006.

VANNUCHI, M.T.; OLIVEIRA; A.L.A.; FORTIV; P.; PIMENTA, M.H. Resíduos de pesticidas organoclorados em leite materno no município de Londrina, PR / Organochlorine pesticides residues in human milk from Londrina PR. **Semina**. v.13, n.2, p.52-7, jun. 1992.

VÉKEY, K.; **J. Chromatogr., A** p.921-227, 2001.

VERMA, R.K.; ARYA, I.D. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and on spore production in their rhizosphere. **Mycorrhiza**.v.8, p.113-116, 1998.

VERMA K, AGRAWAL N, FAROOQ M, MISRA RB, HANS RK. Endosulfan degradation by a *Rhodococcus* strain isolated from earthworm gut. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.64, n.3, p.377-81, 2006.

VILLEGAS, M. Bamboo in the Laboratory. IN: **Tropical Bamboo**. Rizzoli International Publications of America, Inc. p.35-40, 1990.

VINU, R.; MADRAS G. Environmental remediation by photocatalysis. **J. Indian Inst. Sci.** v.90, n.2, 2010.

WALKER, C.H. Organic Pollutants An Ecotoxicological Perspective, **Published by Taylor & Francis e-Library**. London, 2002.

WEBER, R. **Chemosphere**.v.67, n.109, p. 658-64, 2007.

WEBER, R.R., MONTONE, R.C.; Distribution of organochlorines in the atmosphere of the South Atlantic and Antarctic oceans. In Kurtz D.A. (Ed.). **Long Range Transport of Pesticides**. Lewis publishers, Chelsea, Michigan, USA, p.185 -197, 1990.

WEIR, K.M.; SUTHERLAND, T.D.; HORNE, I.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. A single monooxygenase, *ese*, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfate in an *Arthrobacter* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** v.72, p.3524–3530, 2006.

WELLS, M.J.M., MICHAELS, J.L., **J. Chromatogr. Sci.** v.25, p.345, 1987.

WHITE, JC. Plant-facilitated mobilization and translocation of weathered 2, 2-bis (p-chlorophenyl)-1, 1-dichloroethylene (p, p'-DDE) from an agricultural soil. **Environ Toxicol Chem.**v.20, p.2047–2052, 2001.

WHITE, JC.; WANG, X.; GENT, M.P.; N.; IANNUCCI-BERGER, W.; EITZER, B.D.; SCHULTES, N.P.; ARIENZO, M.; MATTINA, M.I. Subspecies-level variation in the phytoextraction of weathered p, p'-DDE by *Cucurbita pepo*. **Environ Sci Technol.** v.37, p.4367–4373, 2003.

WHITE JC, MATTINA, M.I.; LEE, W.Y.; EITZER, B.D.; IANNUCCI-BERGER, W. Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered p, p'-DDE by *Cucurbita pepo*. **Environ Pollut.** v.124, n.71, p.80, 2003b.

WHITE, JC.; PARRISH, Z.D.; ISLEYEN, M.; GENT, M.P.N.; IANNUCCI-BERGER, W.; EITZER, B.D.; KELSEY, J.W.; MATTINA, M.I. Influence of citric acid amendments on the availability of weathered PCBs to plant and earthworm species. **International Journal of Phytoremediation.** v.8, n.63, p.79, 2006.

WILES, R.; COHEN, B.; CAMPBELL, C.; ELDERKIN, S.; Tap Water Blues: Herbicides in Drinking Water, **Environment Working Group**. Washington, 1994.

WORLDWATERFORUM6, disponível na internet:  
<http://www.worldwaterforum6.org/en/> arquivo capturado em 30 de março de 2012.

WRIGHT, J. W. Mejoramiento genético de los árboles forestales. **Roma. FAO**. 436p. 1964.

WU, C.H.; CHANG-CHIEN, G.P.; LEE, W.S. J. **Hazard.Mater. B.**, v.114, p.191, 2004.

WWF. Environmental stories and features from WWF. Disponível na internet:  
[www.panda.org/news/features/story.cfm?id=2056](http://www.panda.org/news/features/story.cfm?id=2056). Arquivo capturado na Internet em 15 de março de 2013.

YEH, M.L. & CHANG, W.C. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhami* Munro). **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v.73, n.2, p.161-3, 1986a.

YEH, M.L. & CHANG, W.C. Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescence callus of *Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*. **Plant Cell Reports**. Heidelberg, v.5, n.6, p.409-11, 1986b.

YOGUI, G.T., 2002. Ocorrências de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e ilha Rei George (Antártica). **Dissertação de Mestrado**. IOUSP. 2002. 34-45p.

ZERTAL, A.; MOLNÁR-GÁBOR, D.; MALOUKI, M.A.; SEHILI, T.; BOULE, P. APPL. CATAL. B.; **Environ**. v.49, n.83, 2004.

ZHANG, X. Z. Study on chromosomenumbers of clustered bamboo. **Guangdong Linye Keji**. v.4, p.16-21, 1985.

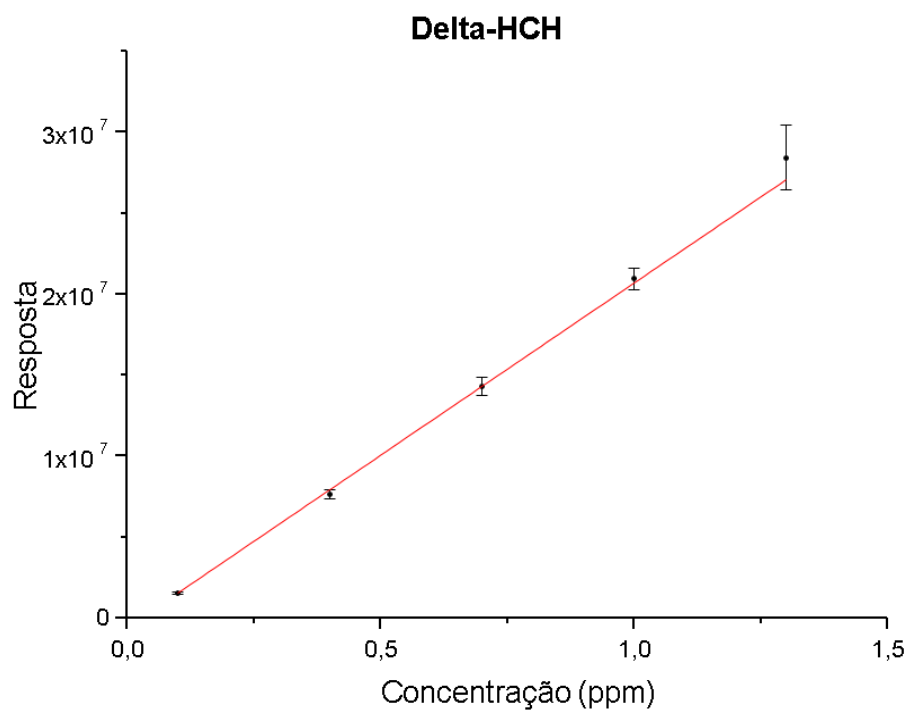
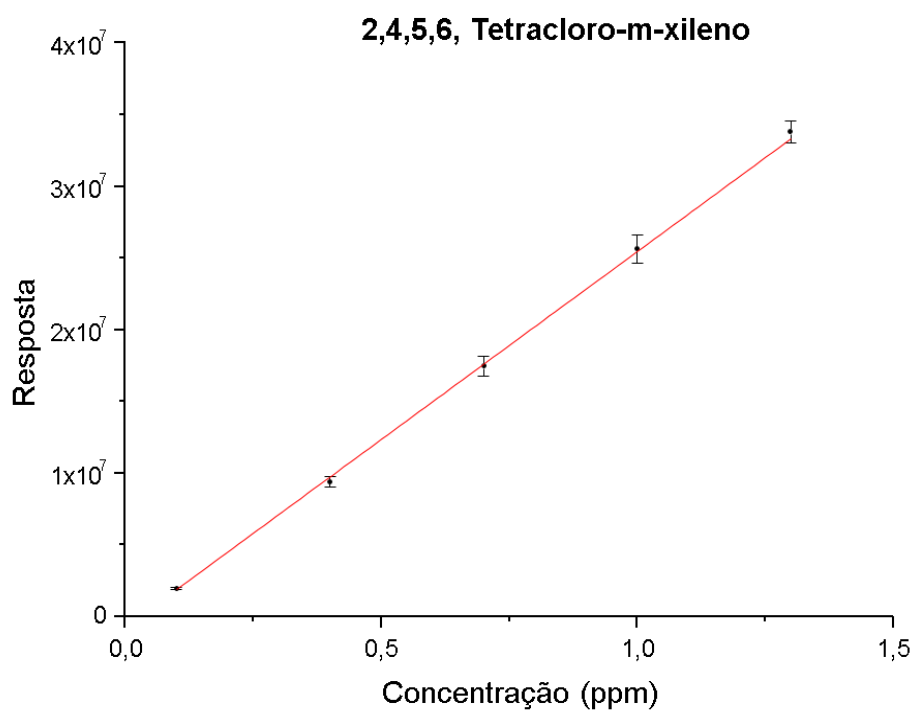
ZHAO, X.; QUAN, X.; ZHAO, H.M.; CHEN, S.; CHEN, J.W.; ZHAO, Y.Z. J.; **Photochem. Photobiol**. p.167- 177, 2004.

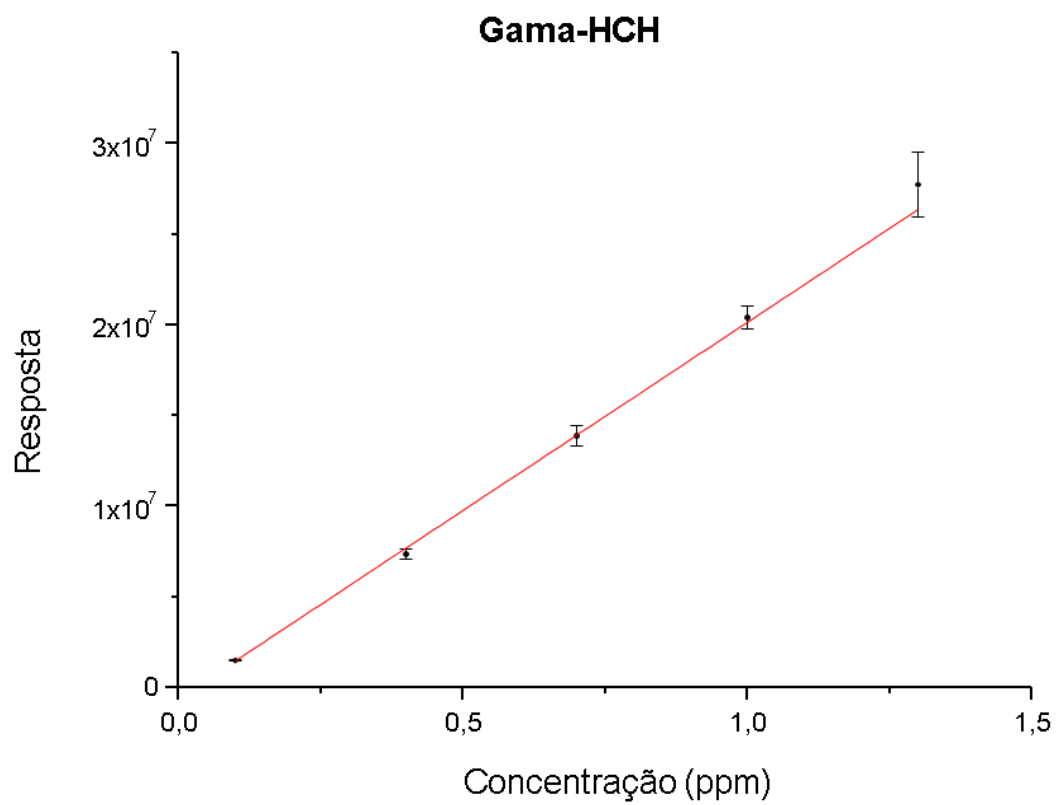
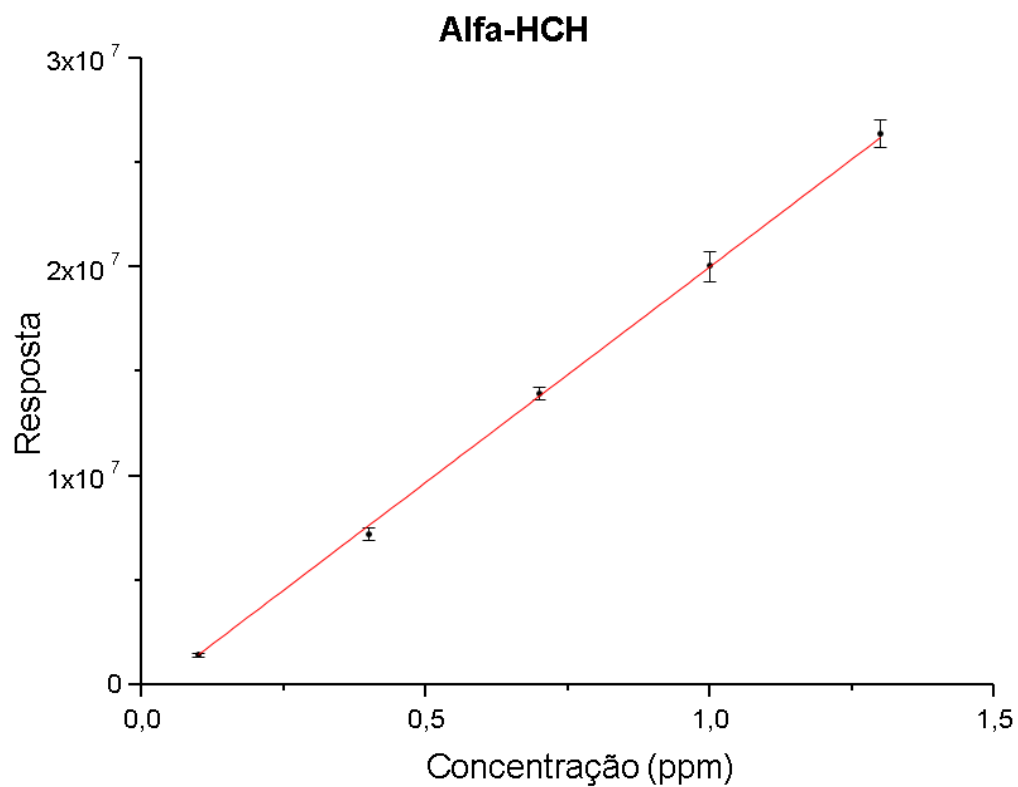
ZIMMER, K.J. & M.L. ISLER. Family Thamnophilidae (Typical Antbirds), p. 448-681. In: J. DEL HOYO; A. ELLIOTT & D.A. CHRISTIE (Eds). **Handbook of the Birds of the World**. Barcelona, Lynx Edicions, v. 8, 845p, 2003.

ZIOLLI, R.L.; JARDIM, W.F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO<sub>2</sub>. **Quim. Nova**. v.21, n.3, p.319-25, 1998.

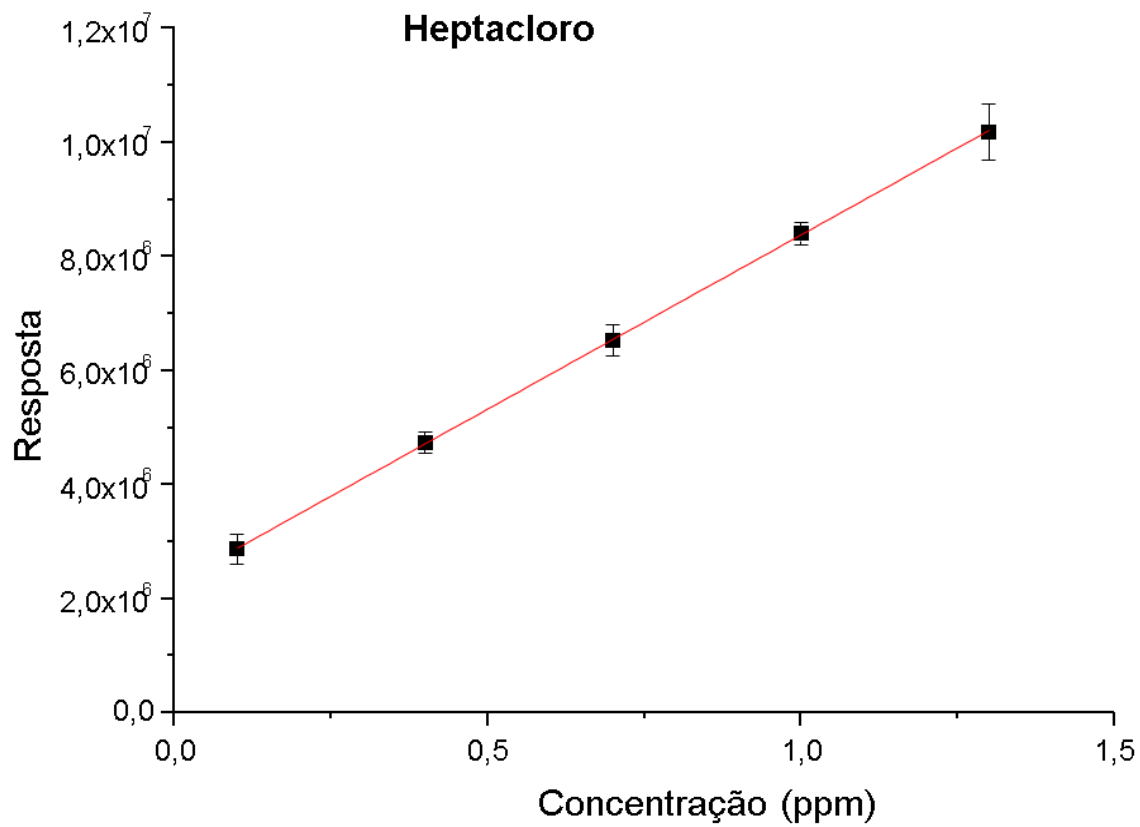
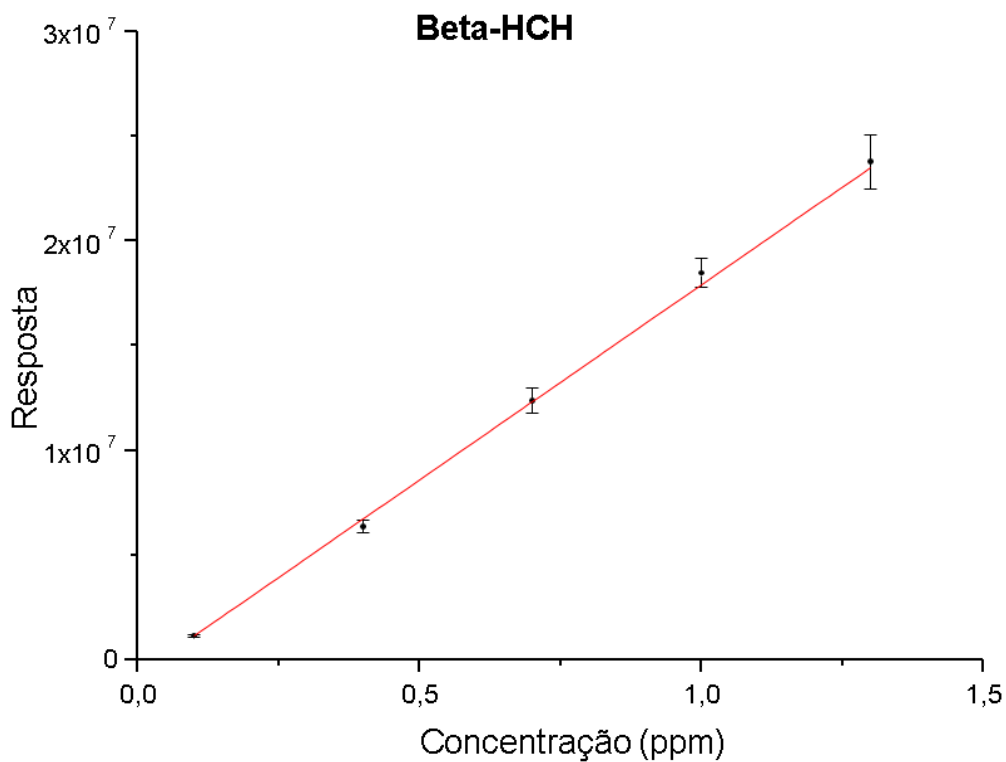
## 10- Anexos

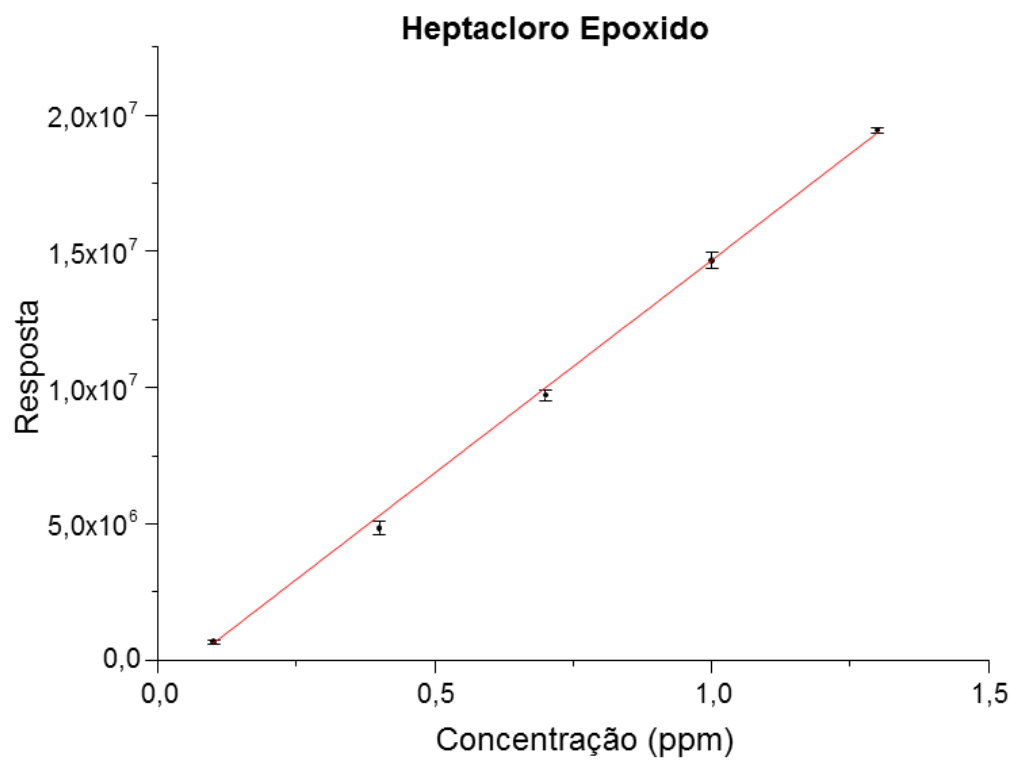
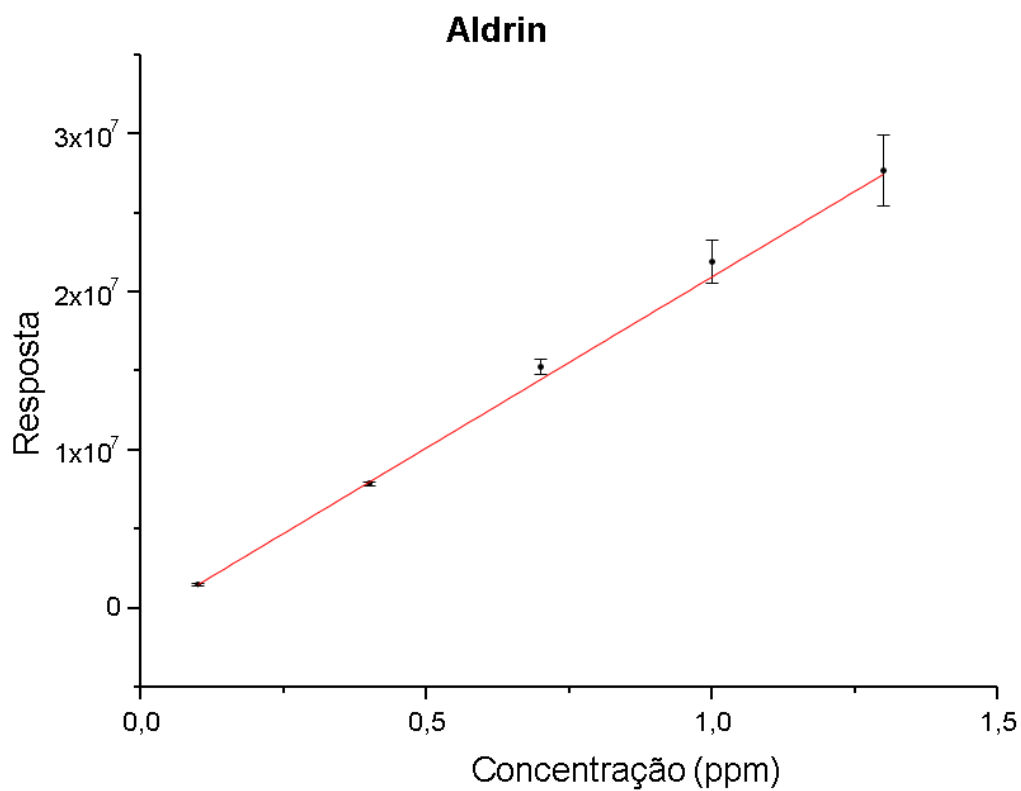
### Curvas de calibração para os 24 compostos

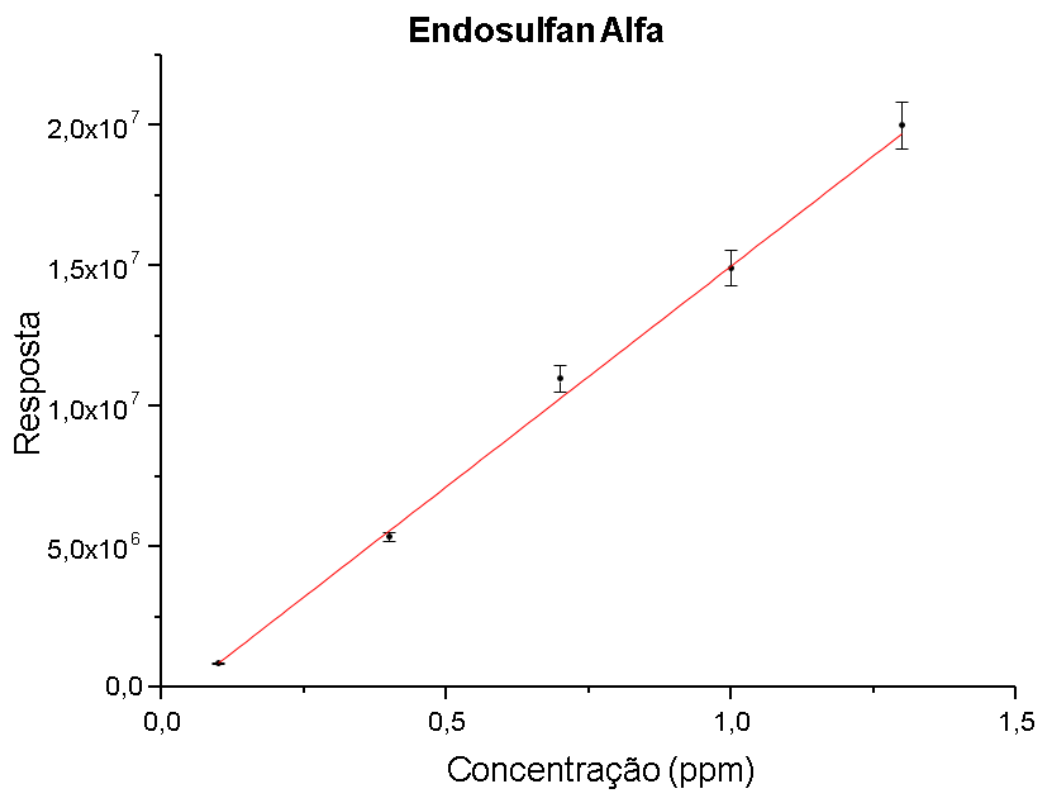
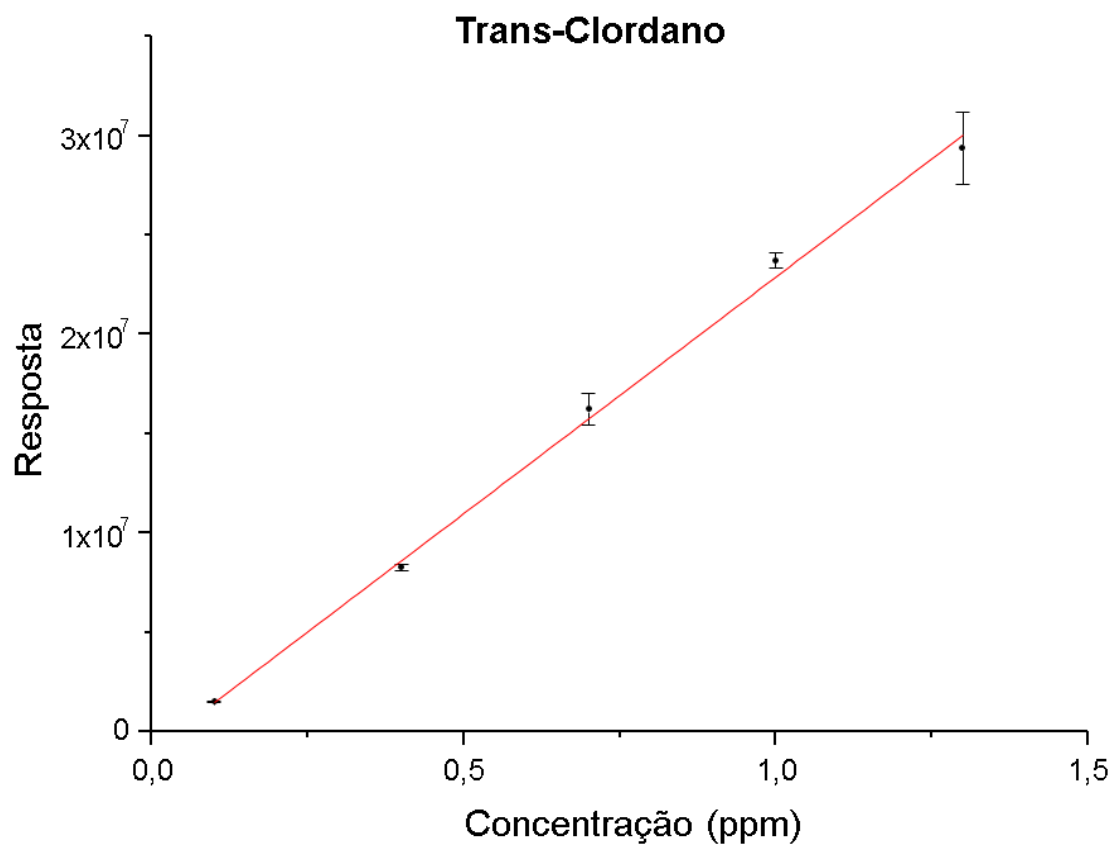


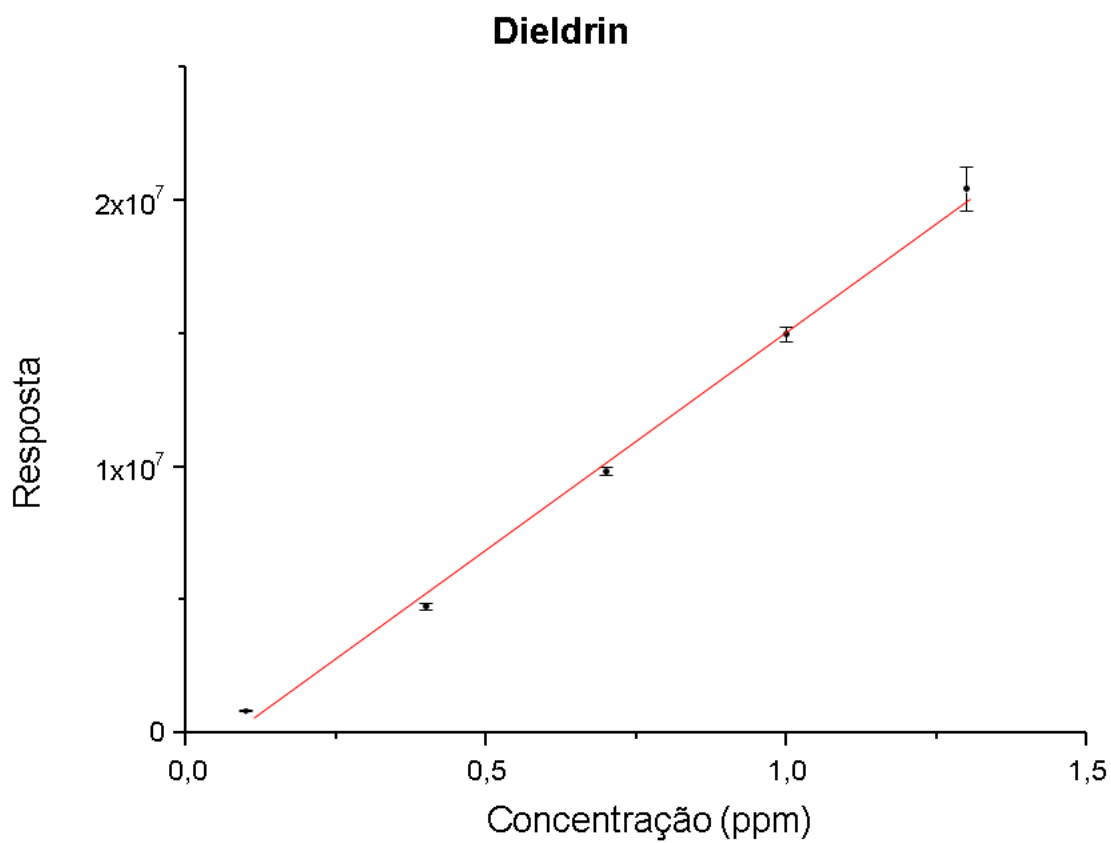
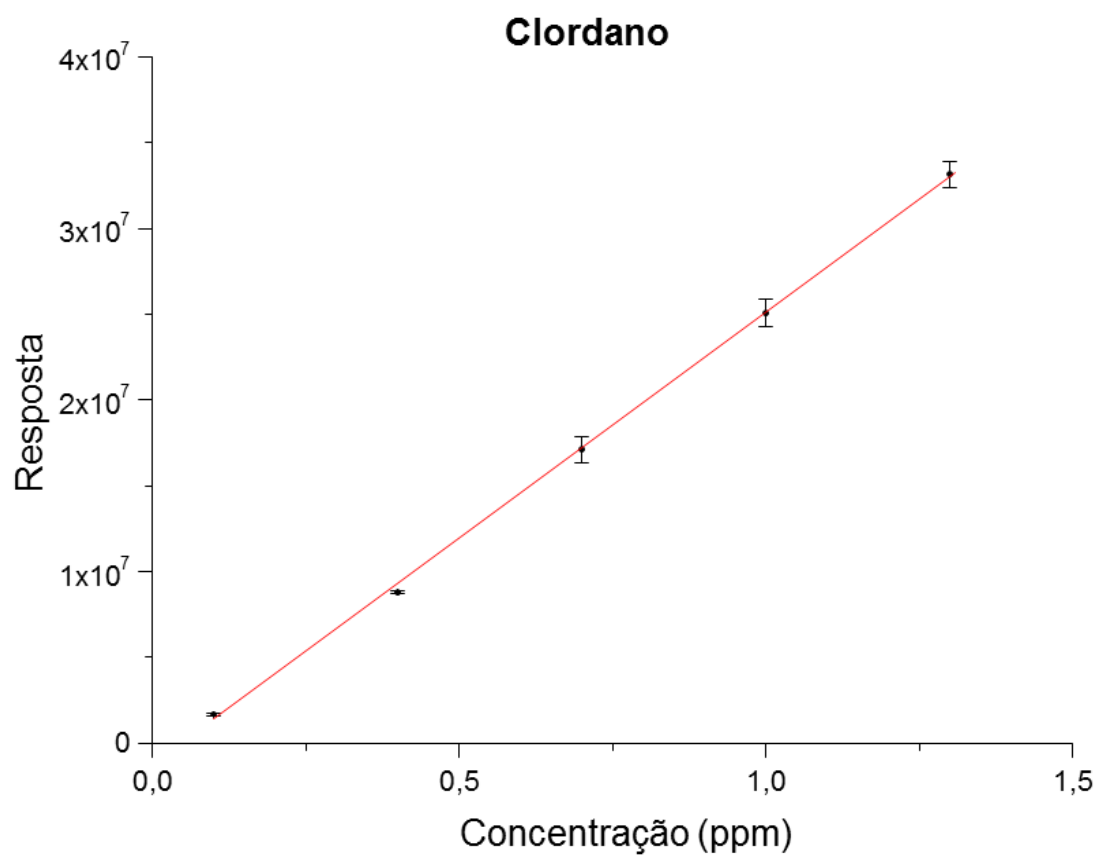


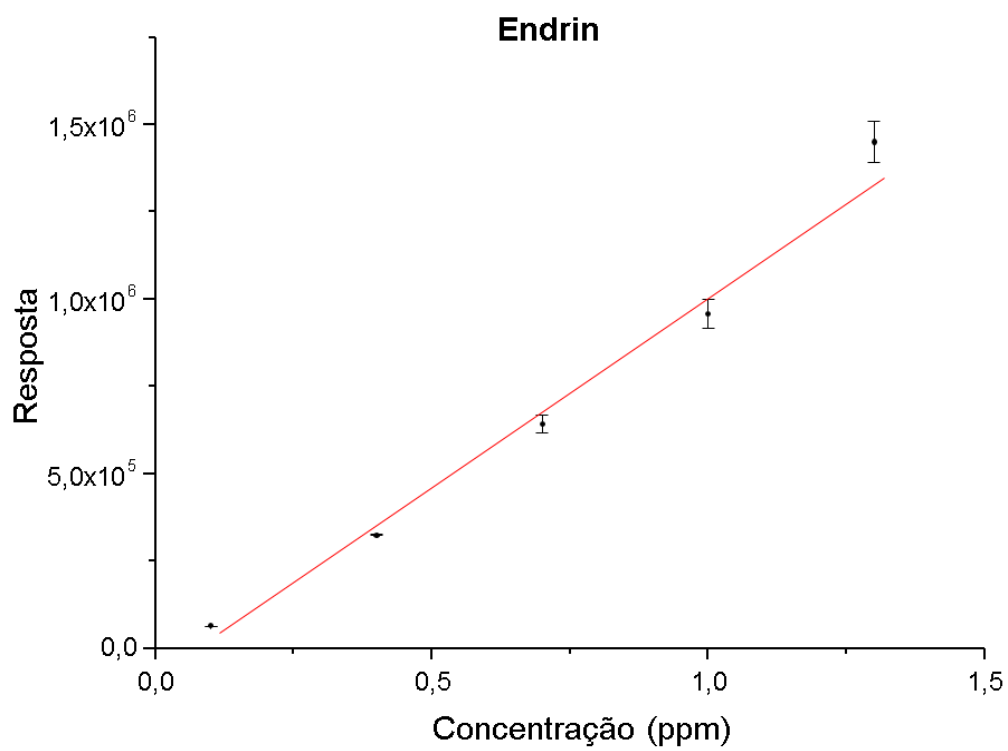
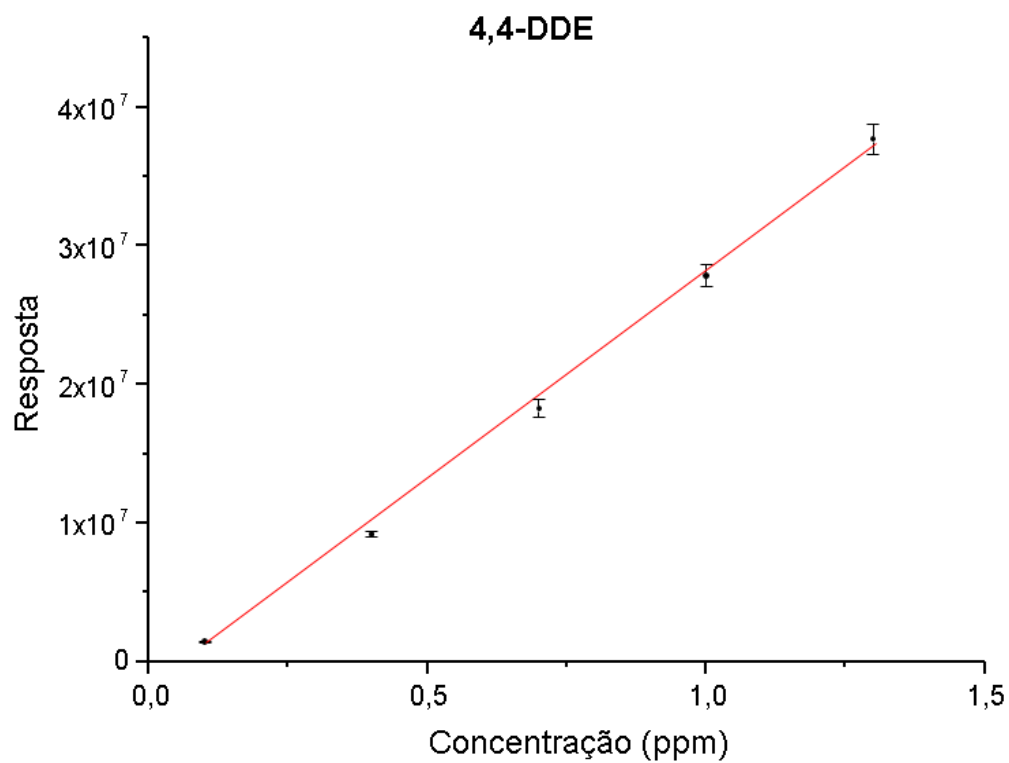


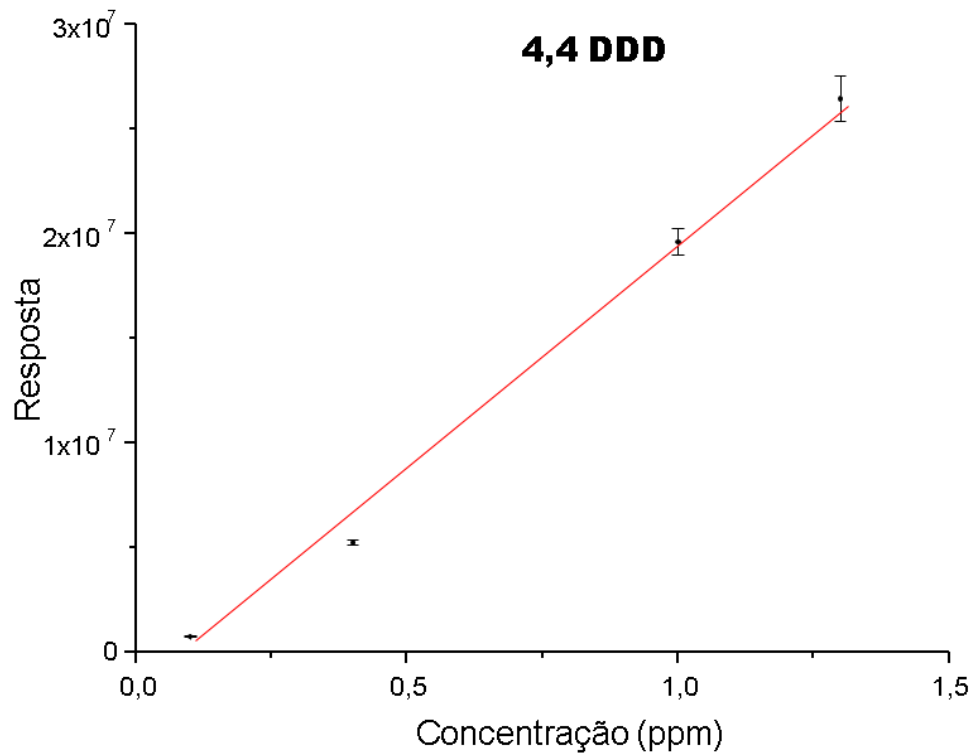
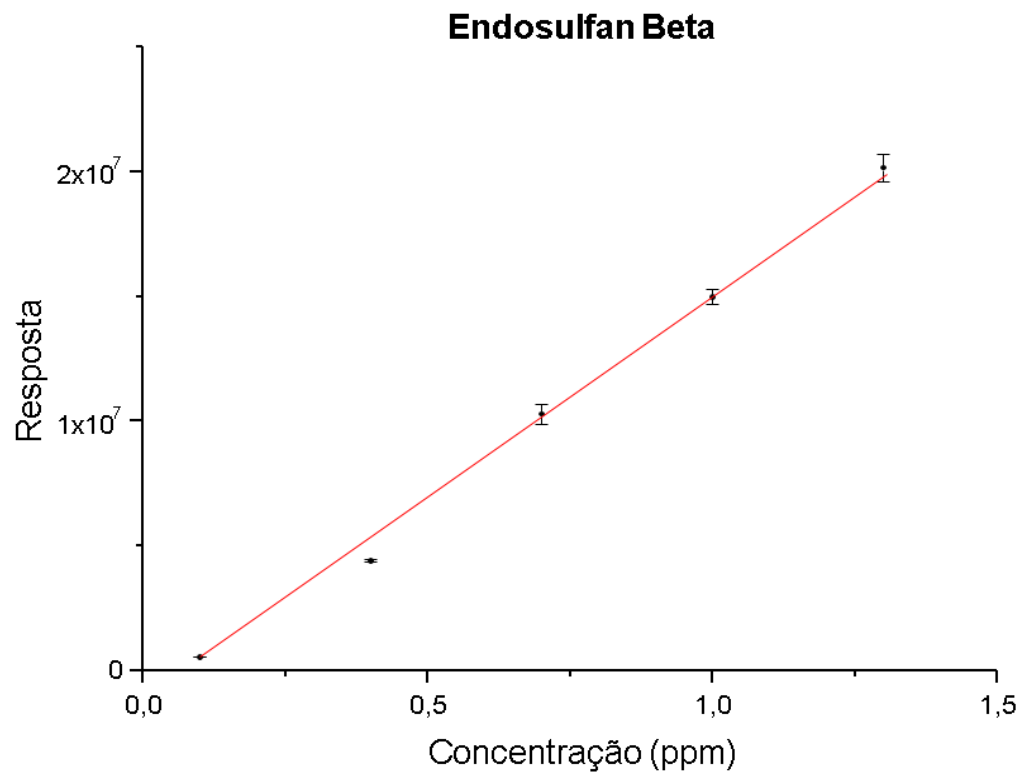


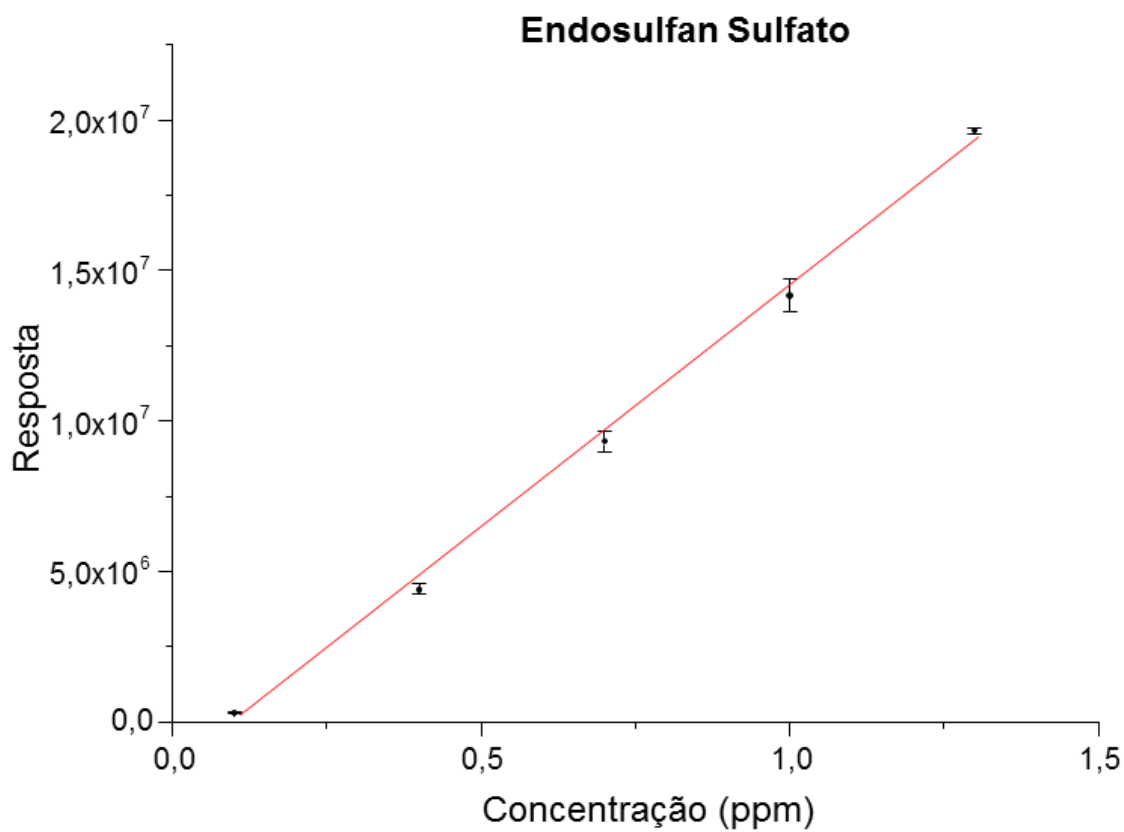
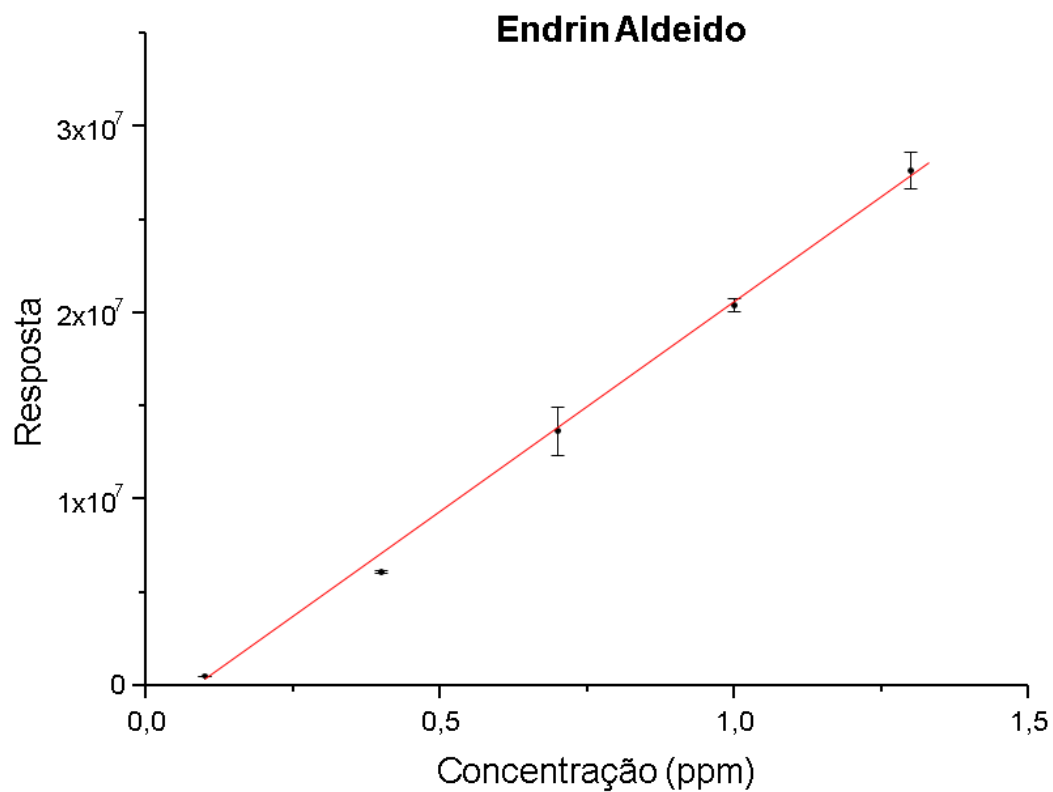


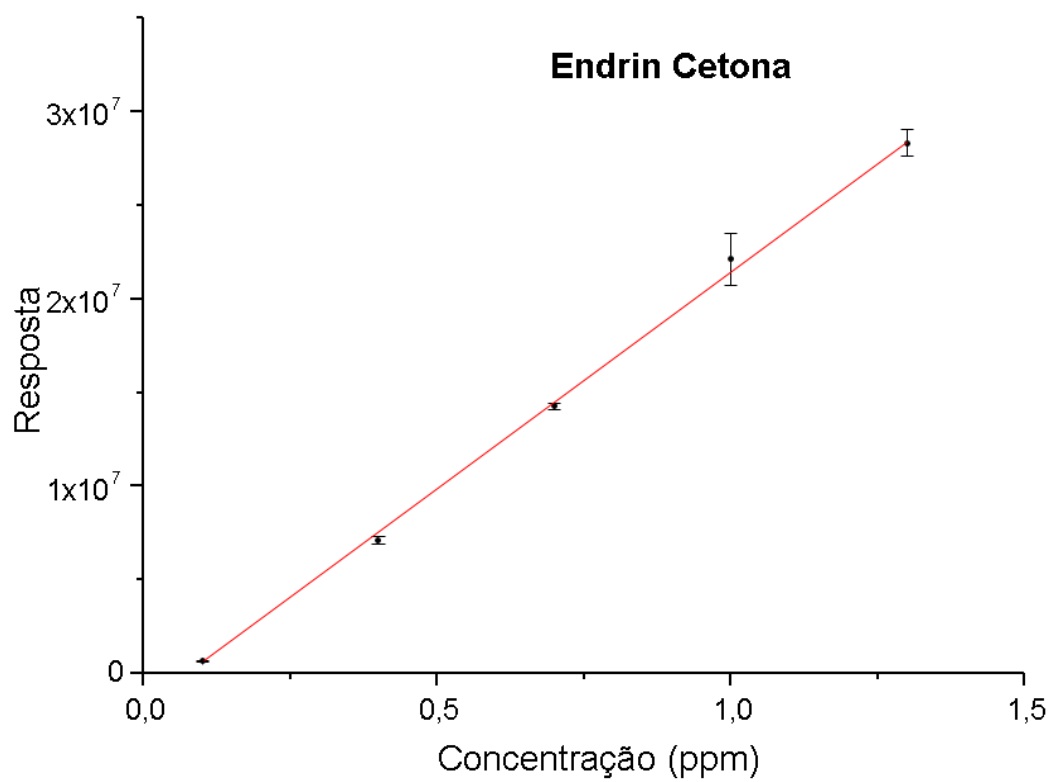
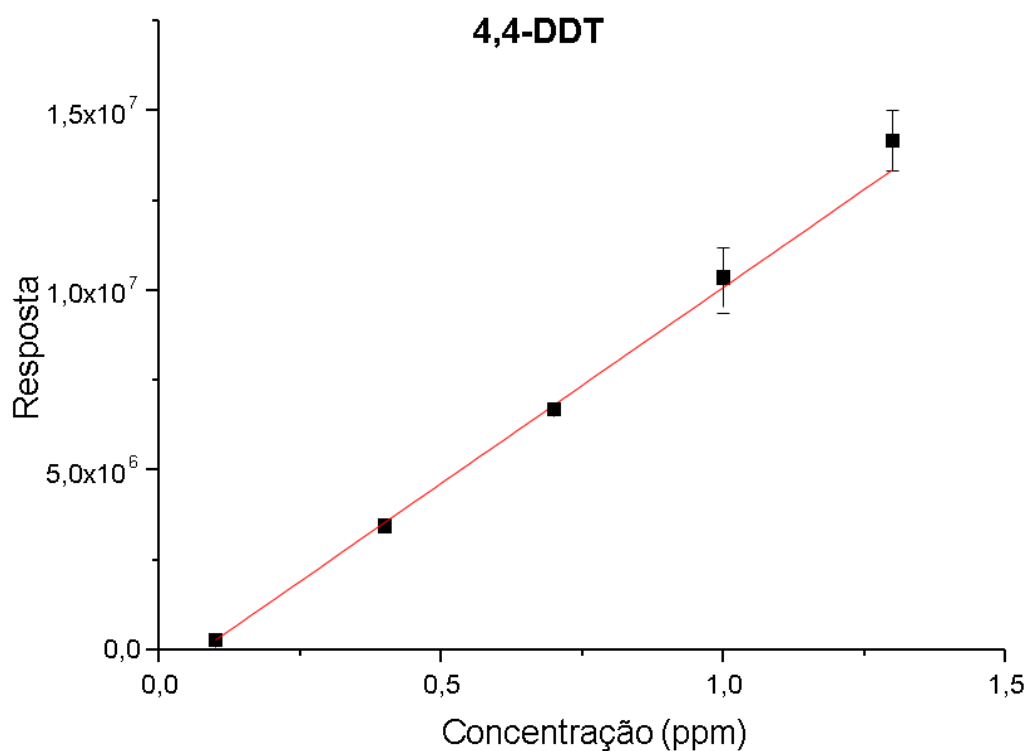




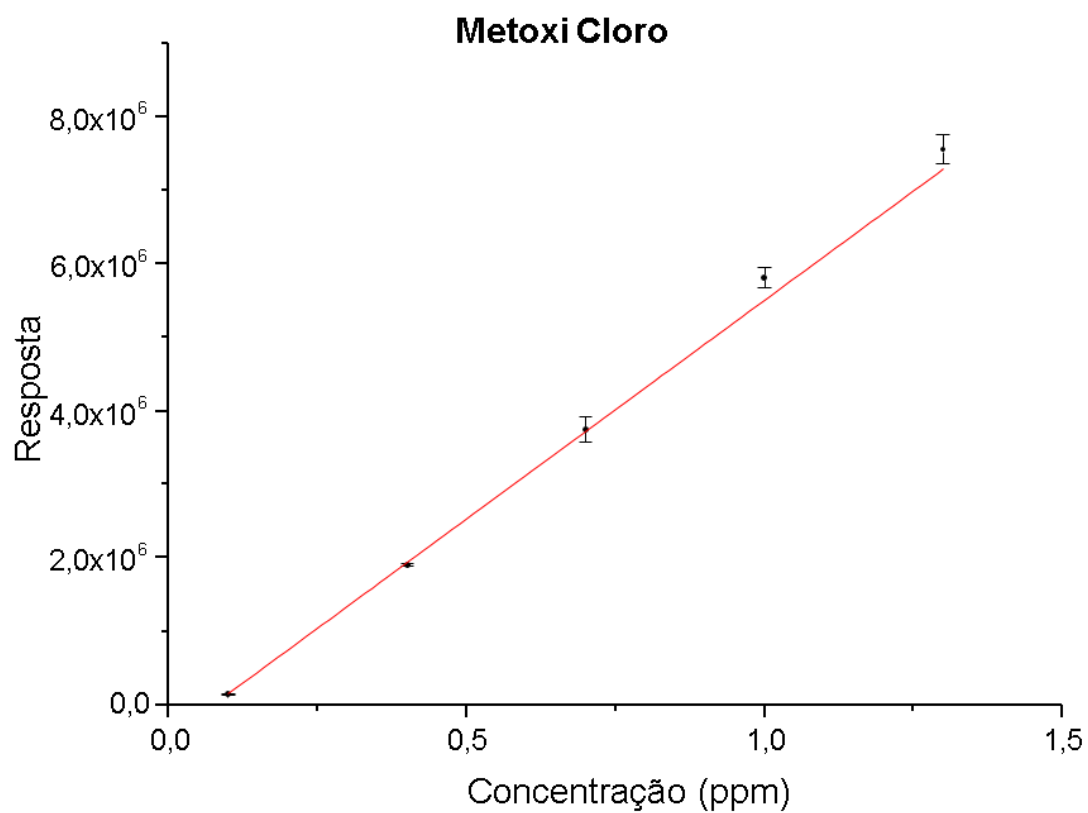
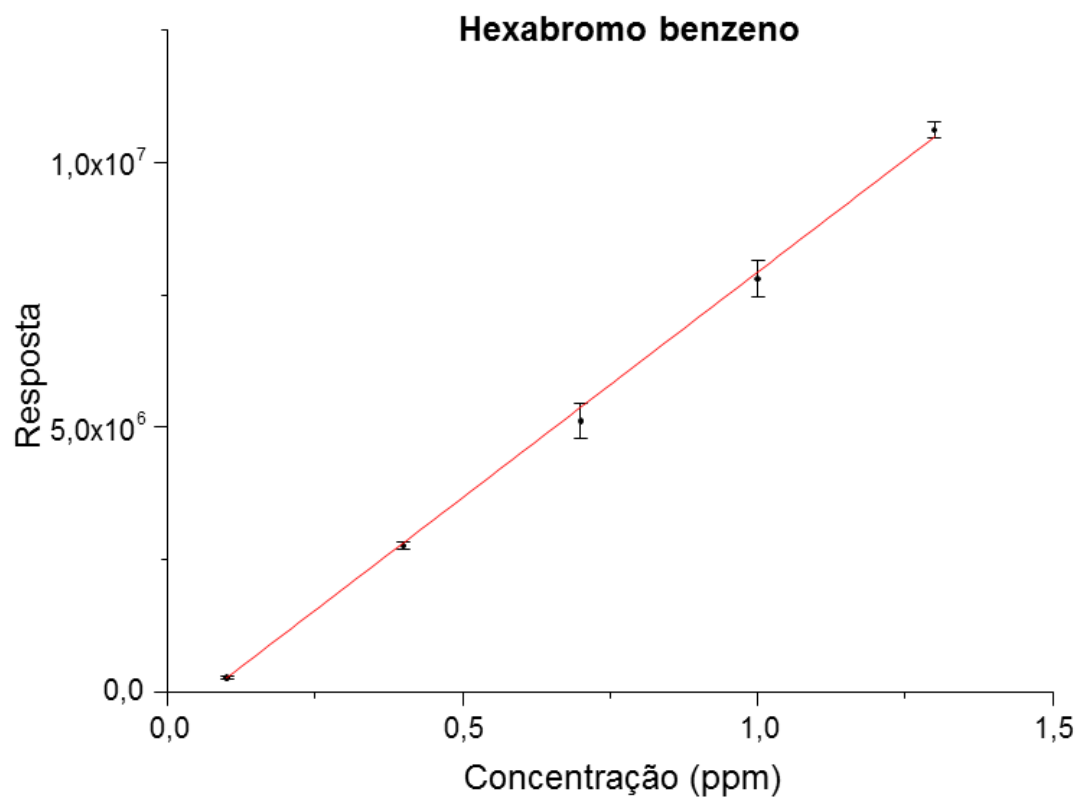


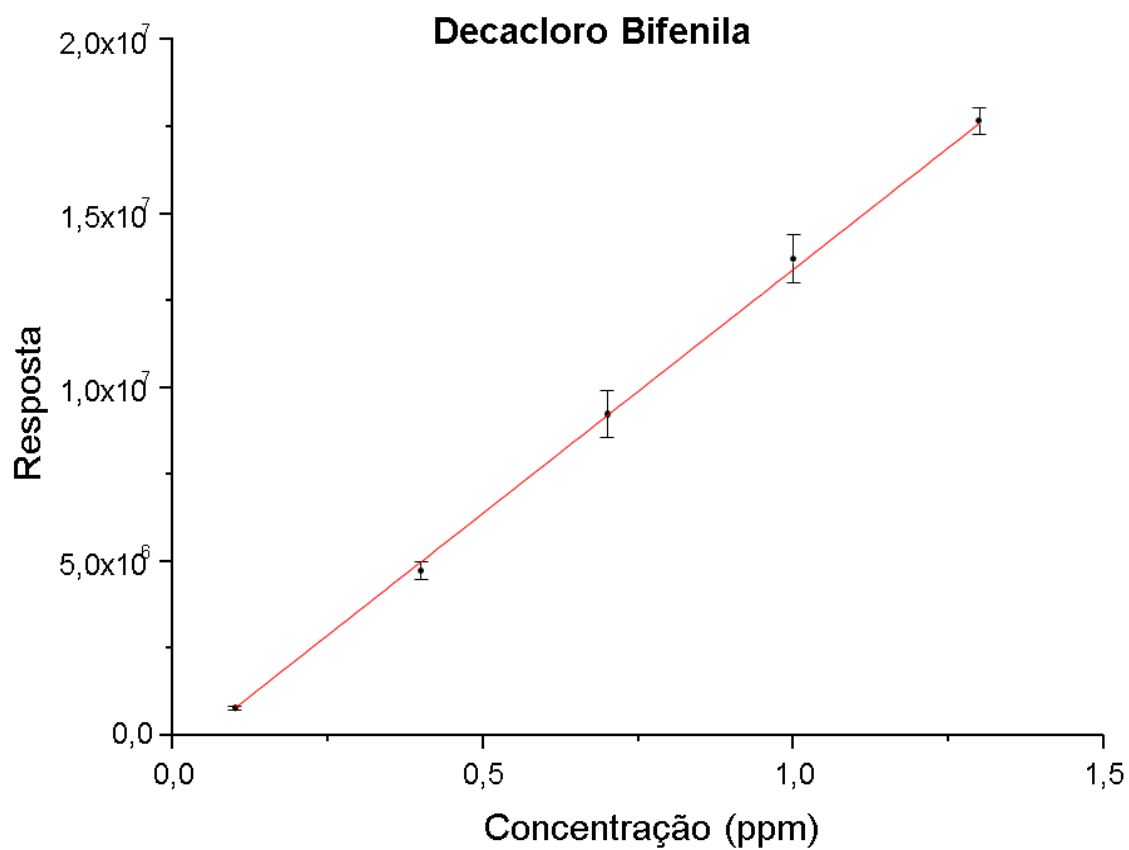
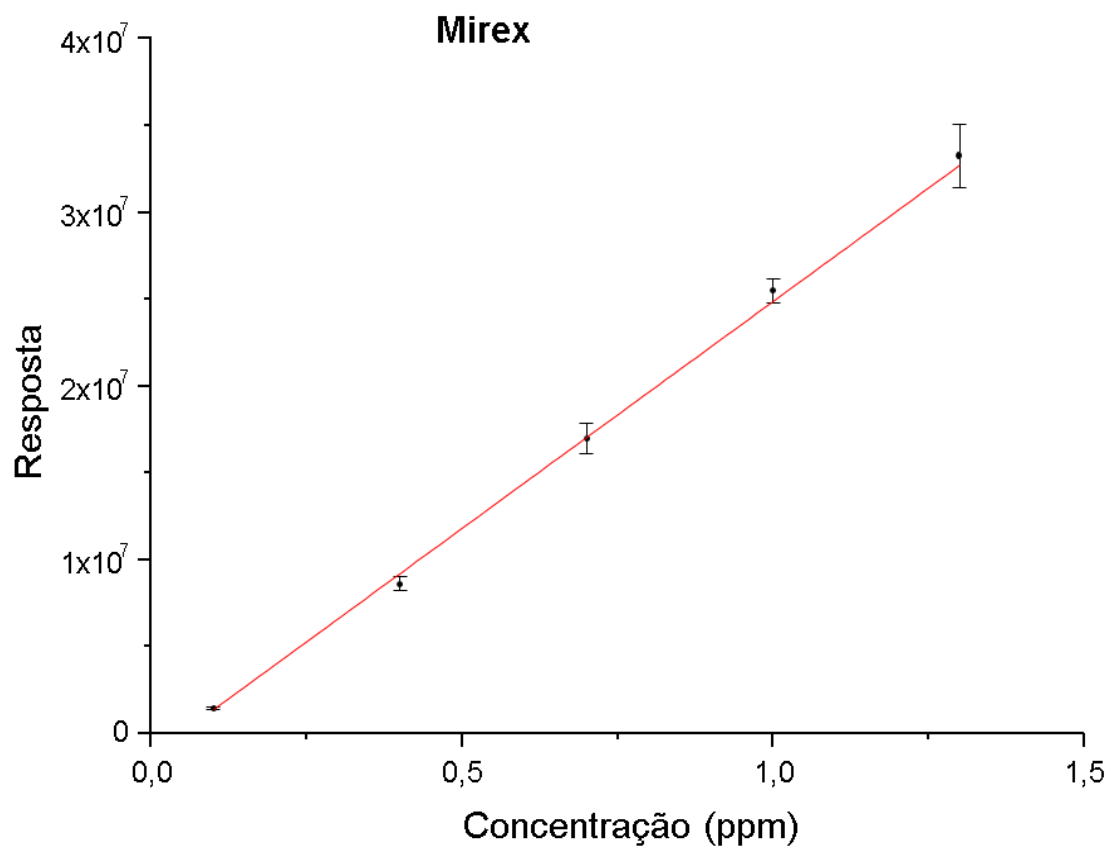






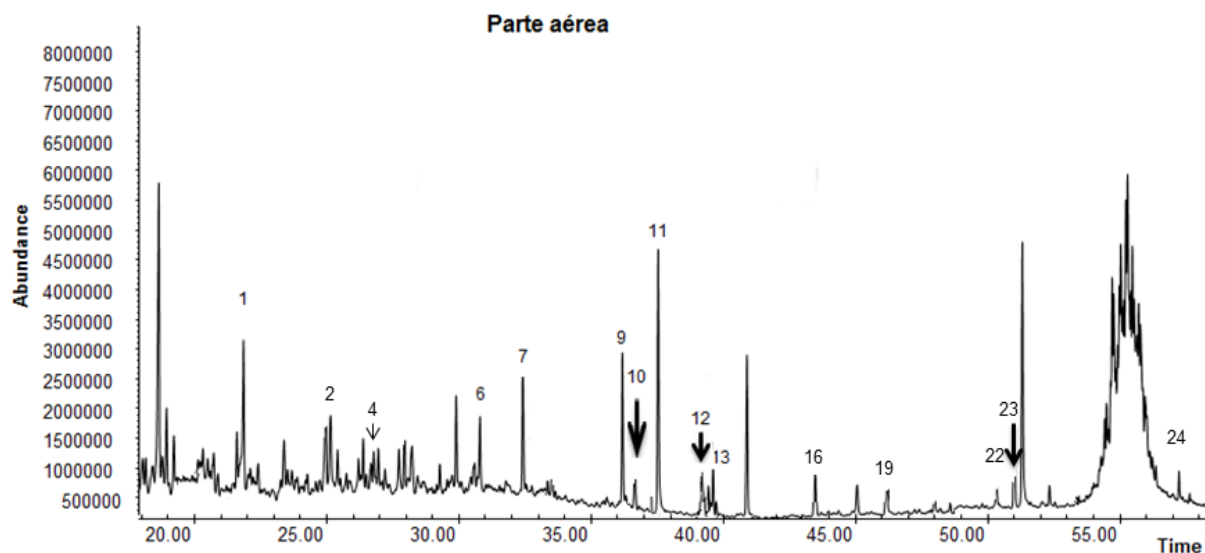






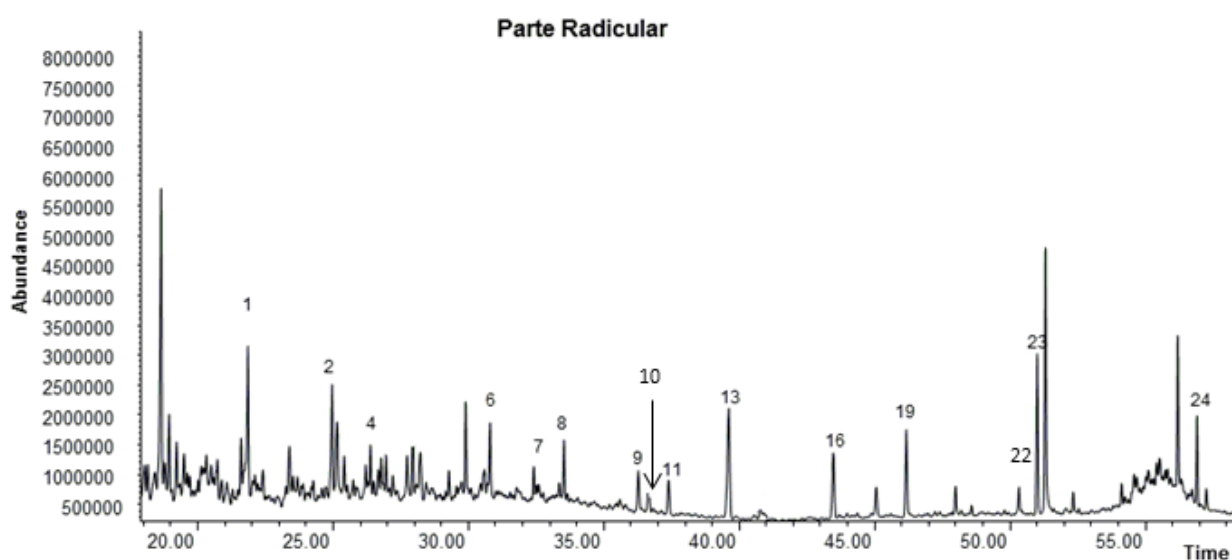
## Cromatogramas

### Cromatograma da parte aérea



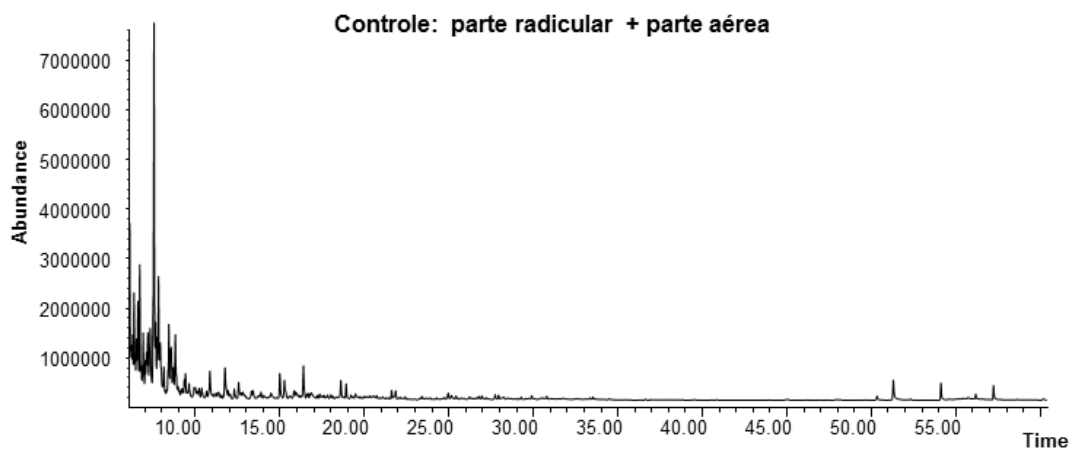
Cromatograma do Íon Total (TIC) obtido por GC/MS de uma amostra de girassol (parte aérea) após o processo de fitorremediação. Os números identificam os POPs detectados (vide Tabela 8).

### Cromatograma da parte radicular



Cromatograma do Íon Total (TIC) obtido por GC/MS de uma amostra de girassol (parte radicular) após o processo de fitorremediação. Os números identificam os POPs detectados (vide Tabela 8).

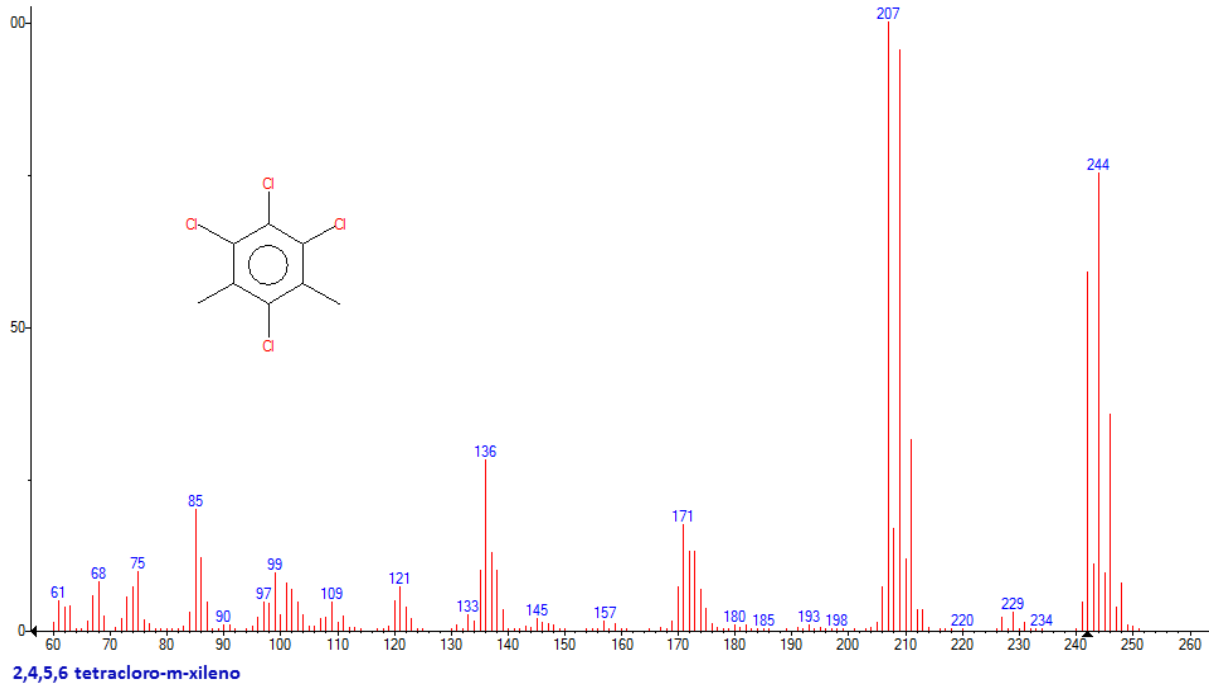
## Cromatograma do grupo controle Parte radicular e parte aérea juntos



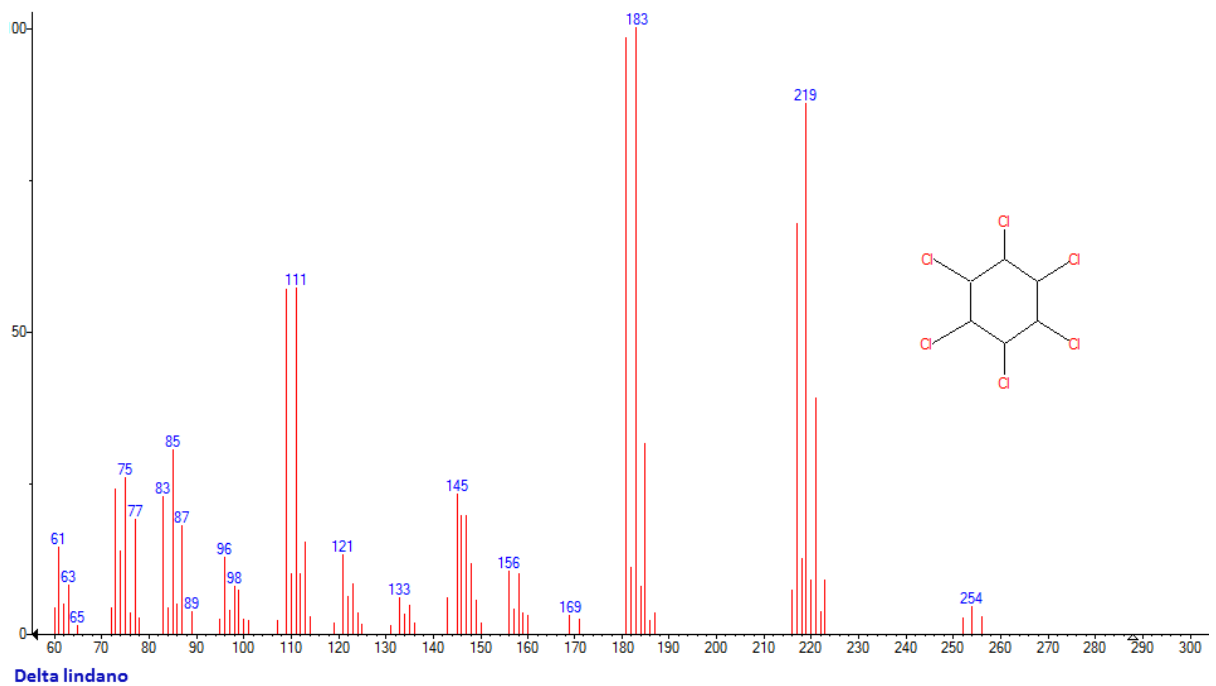
Cromatograma do Íon Total (TIC) obtido por GC/MS de uma amostra controle de girassol (parte radicular e aérea) após o processo de fitorremediação na ausência dos POPs. Não existem picos nos tempos de retenção dos compostos estudados.

## Espectros de massas dos 24 POPs

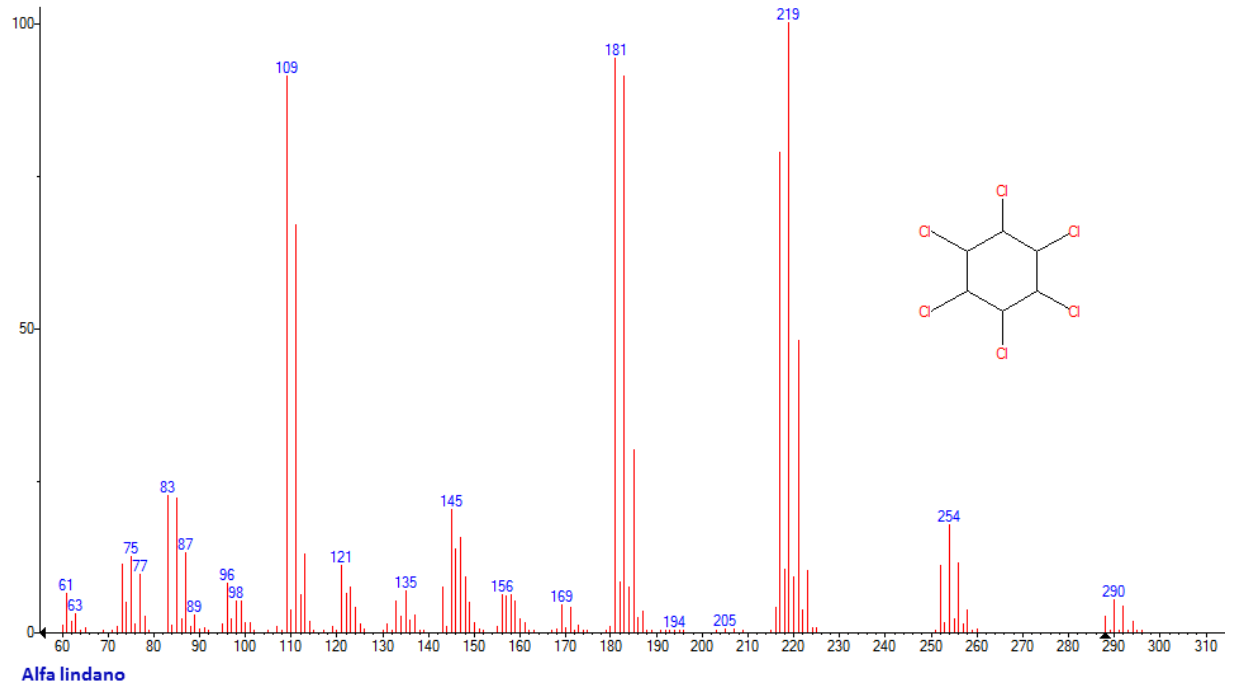
### 1- (2,4,5,6 tetracloro-m-xileno)



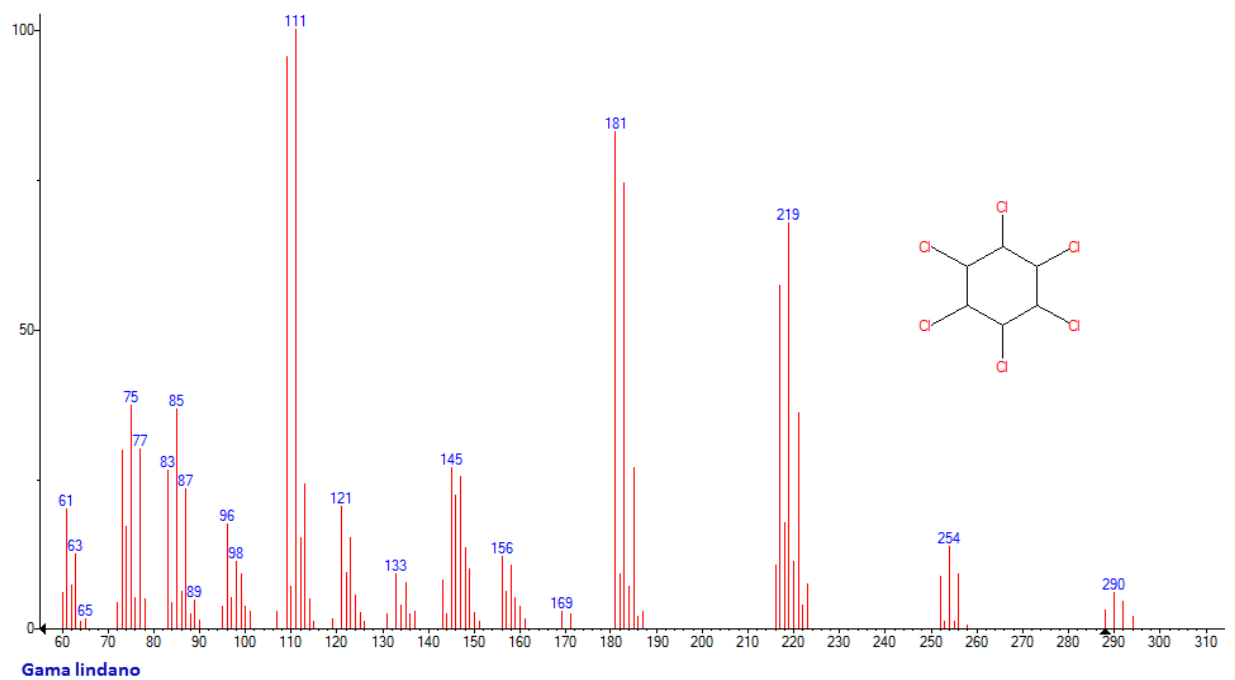
### 2 -Delta- HCH



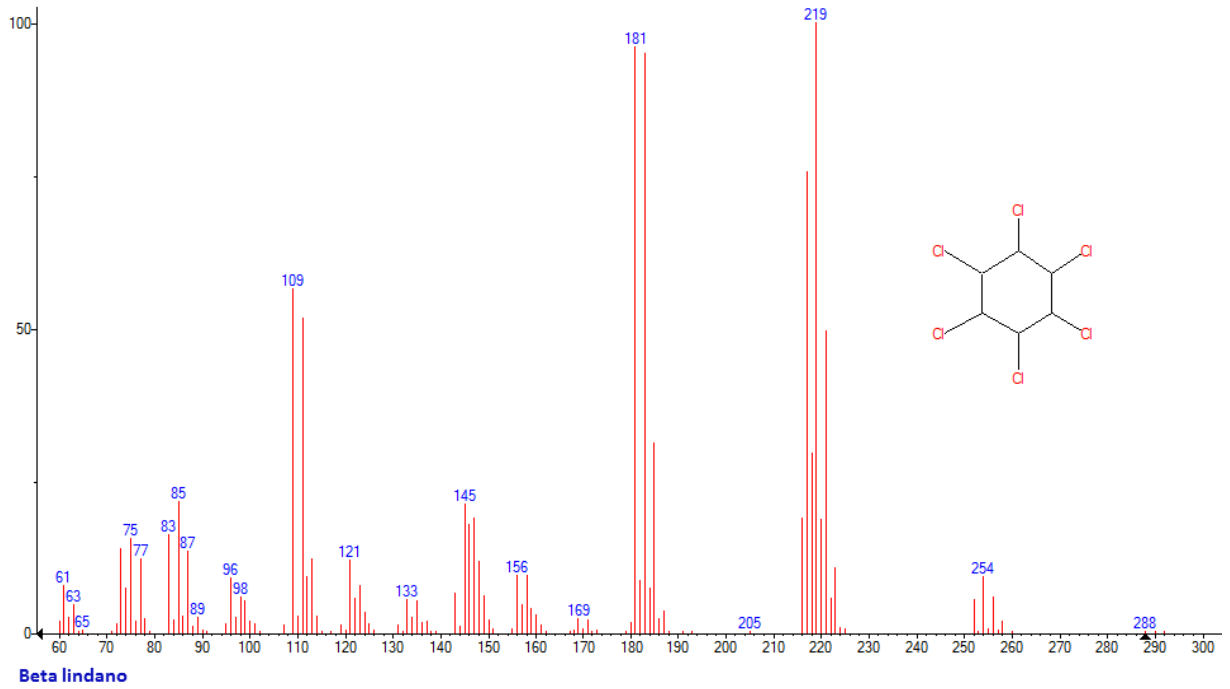
### 3-Alfa- HCH



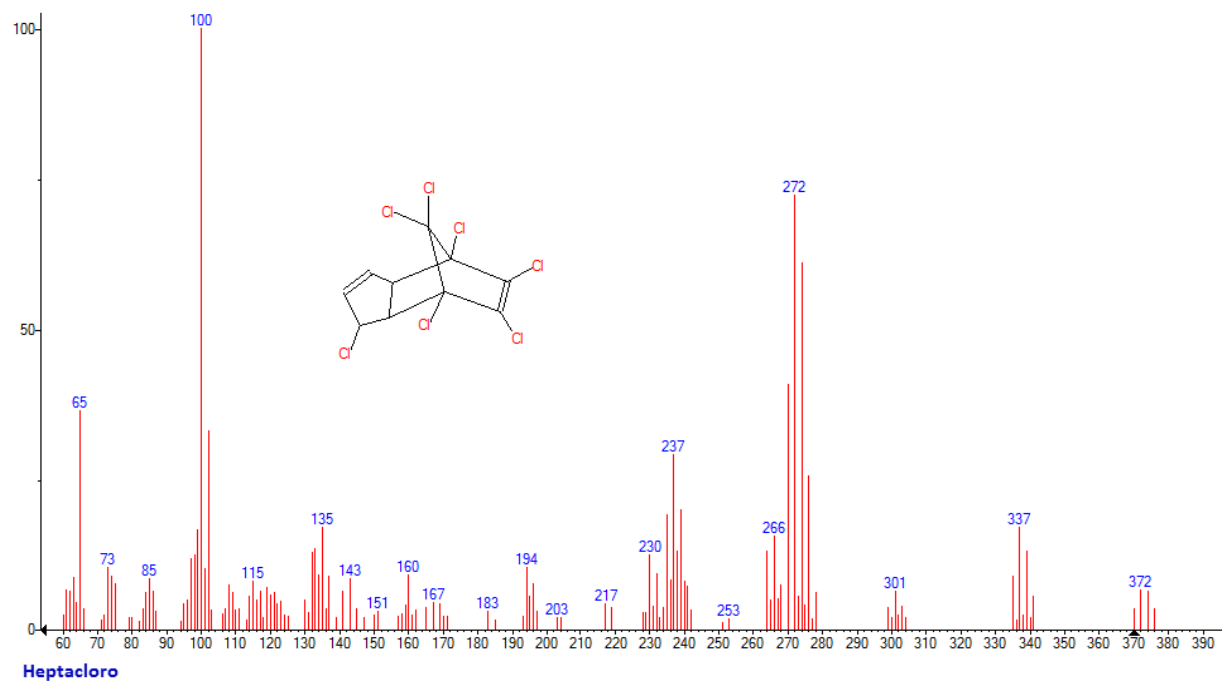
### 4 – Gamma HCH



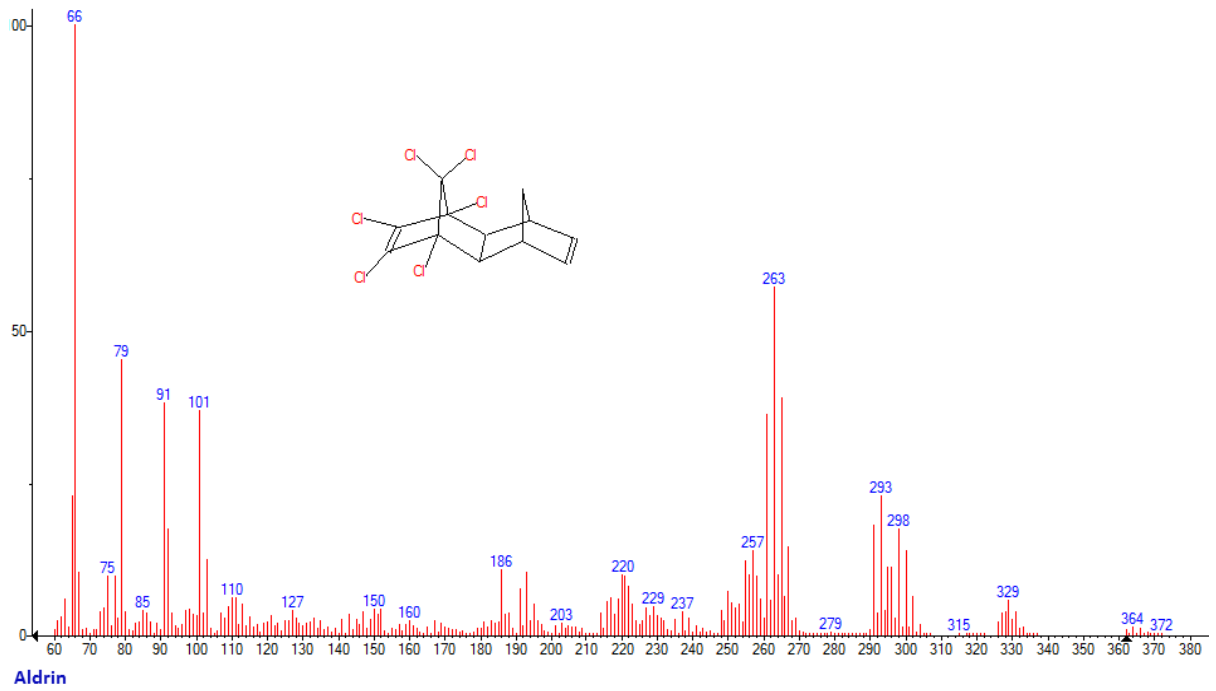
## 5 – Beta HCH



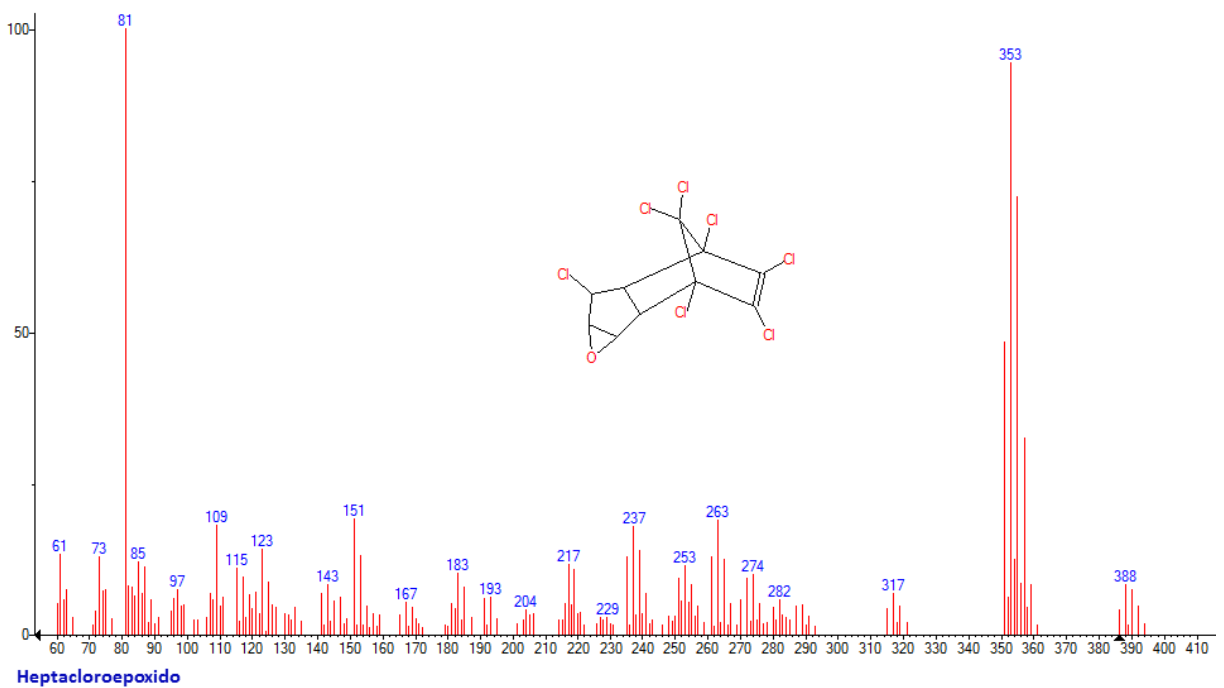
## 6- Heptacloro



## 7- Aldrin

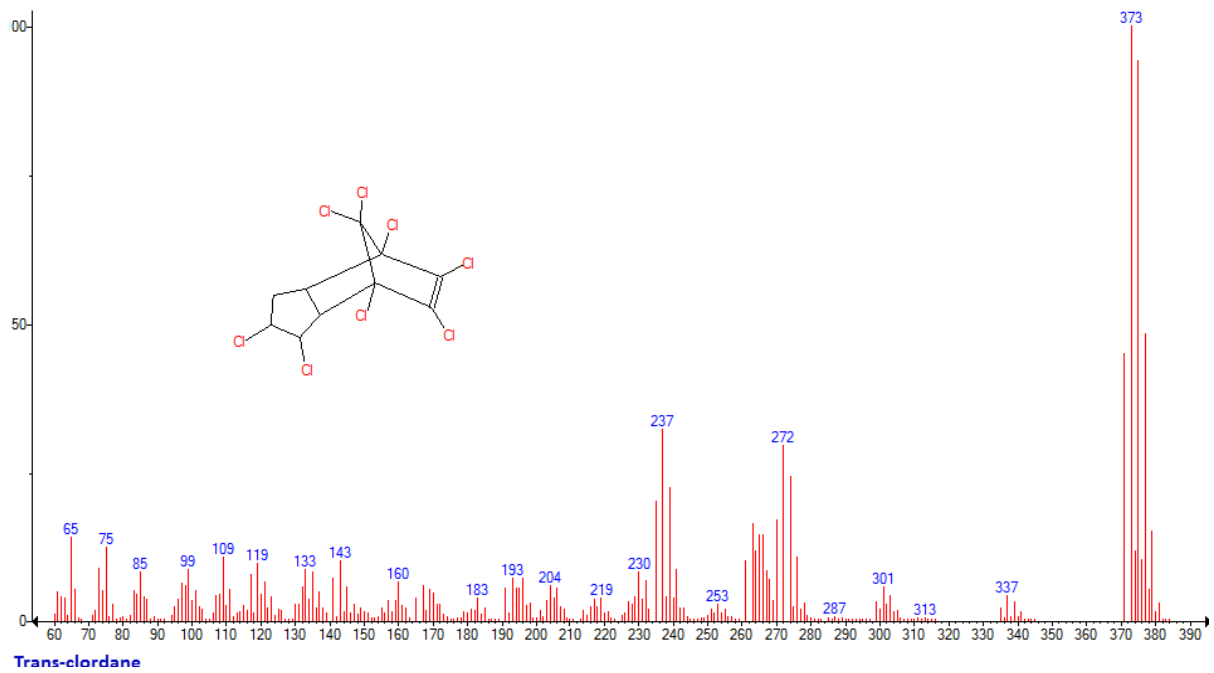


## 8- Heptacloro Epoxido

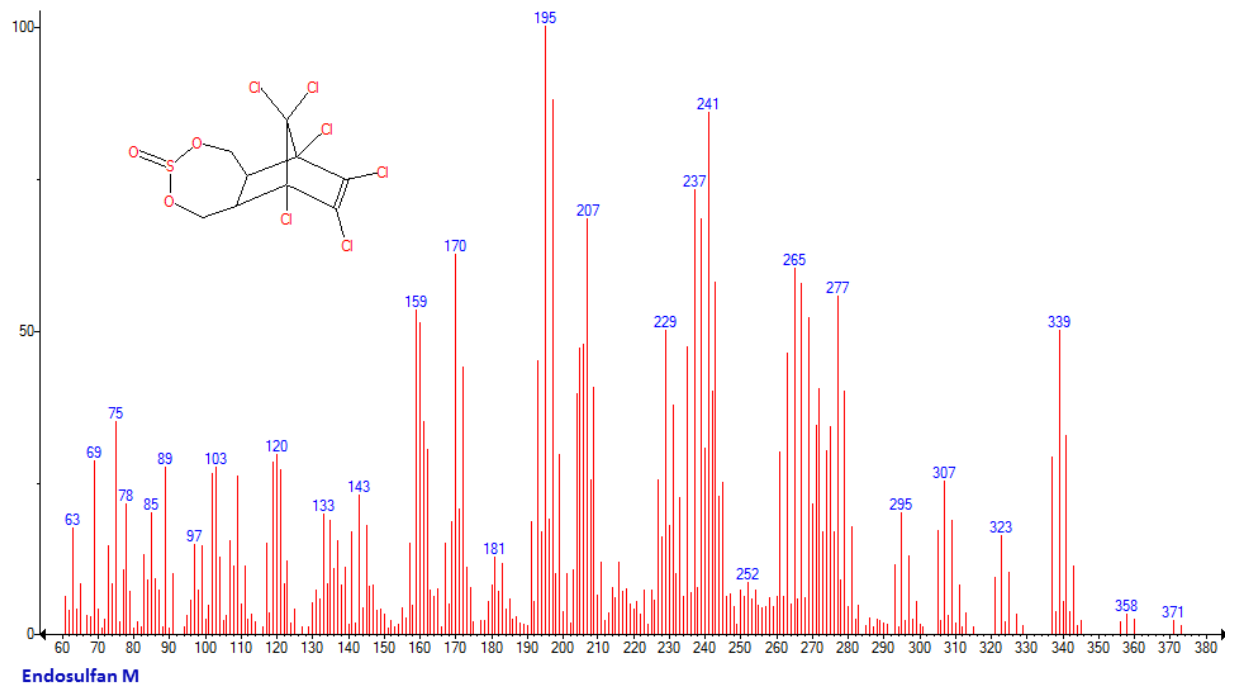




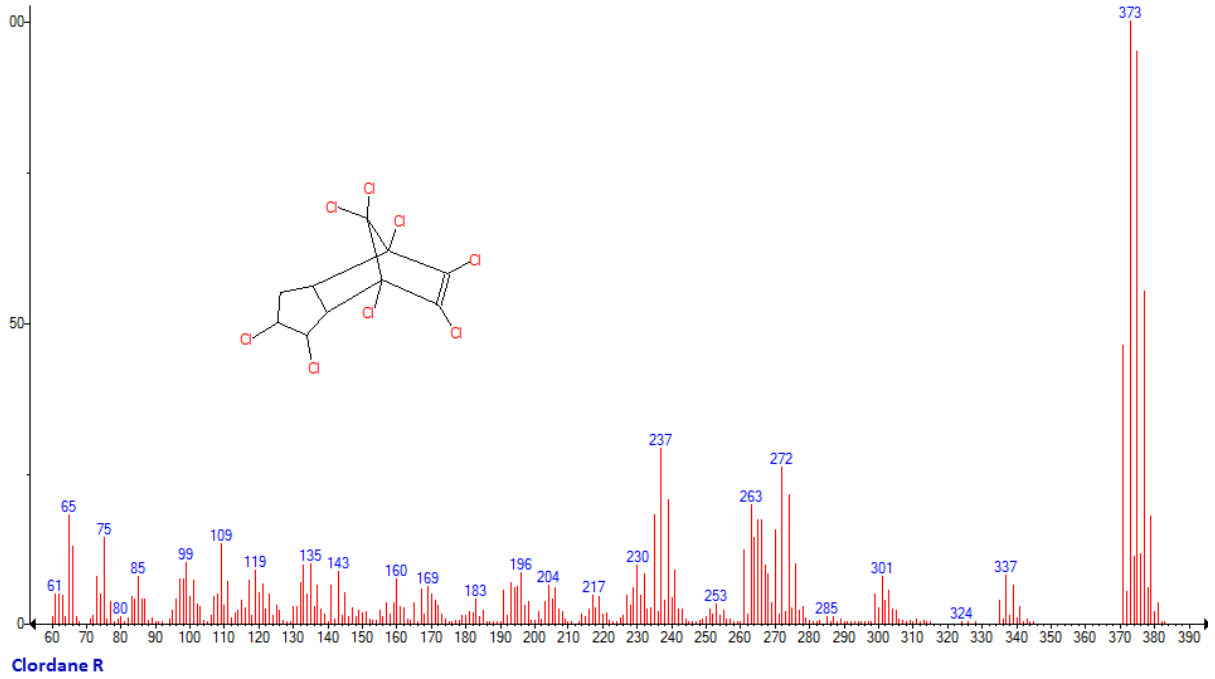
## 9 – Trans clordano



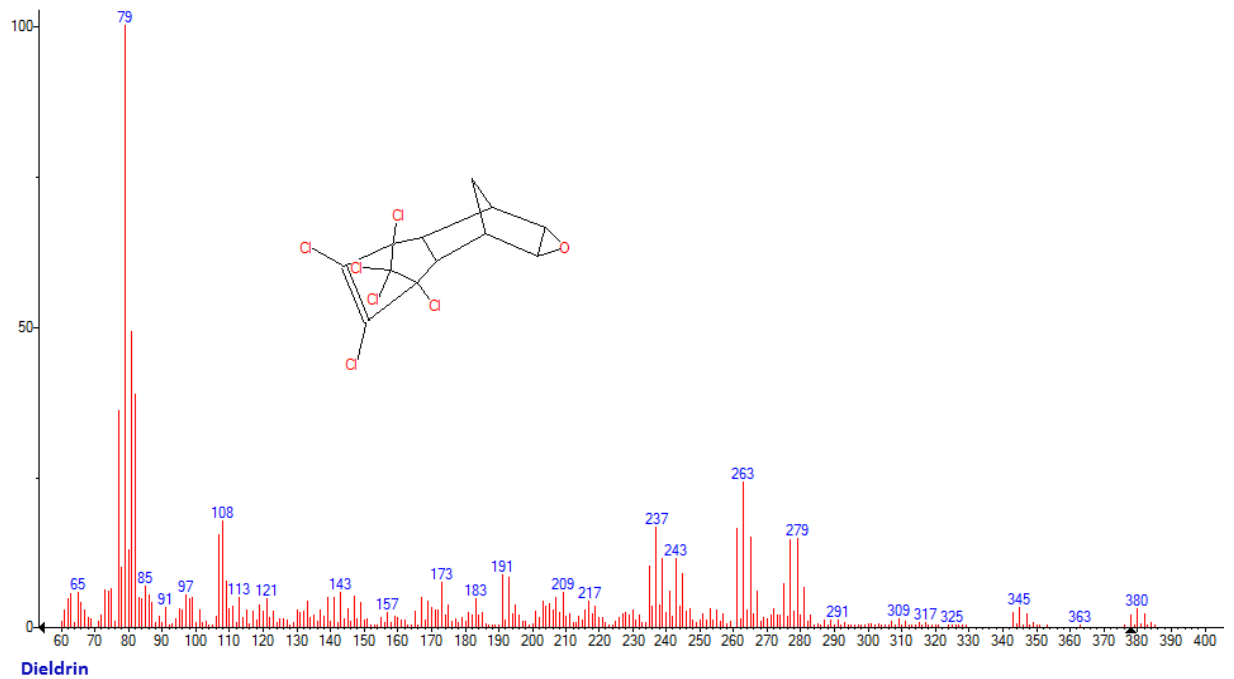
## 10 – Endosulfan Alfa



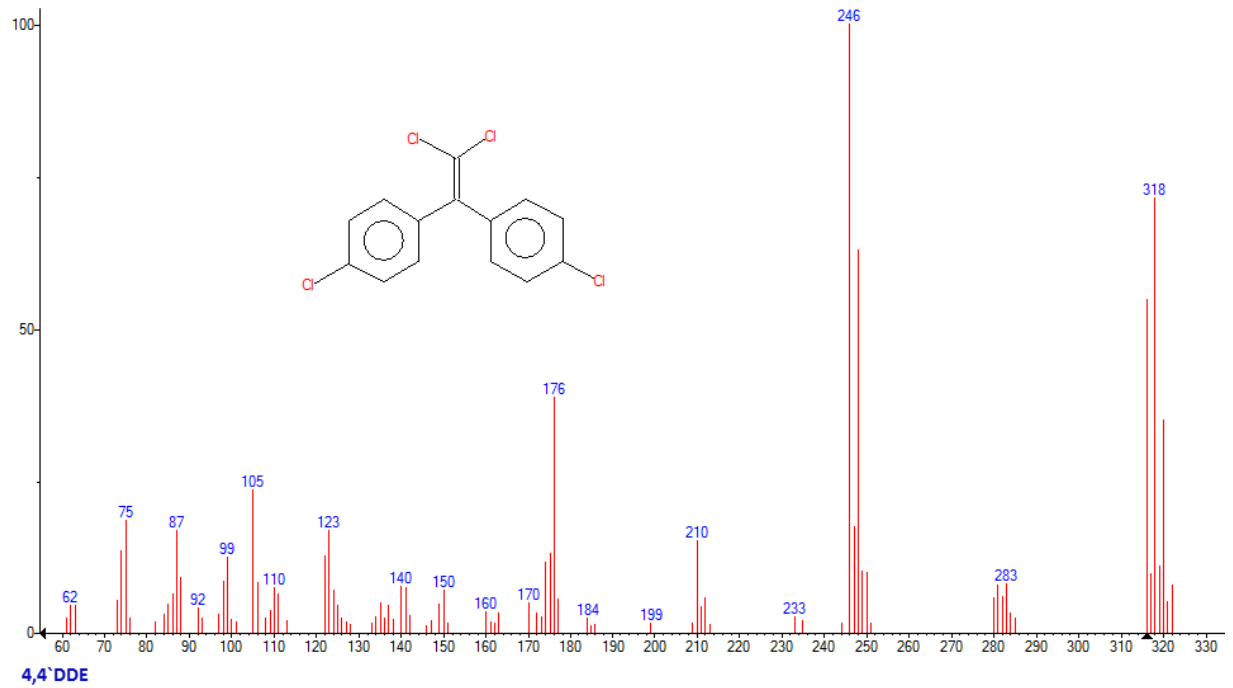
### 11- Clordano



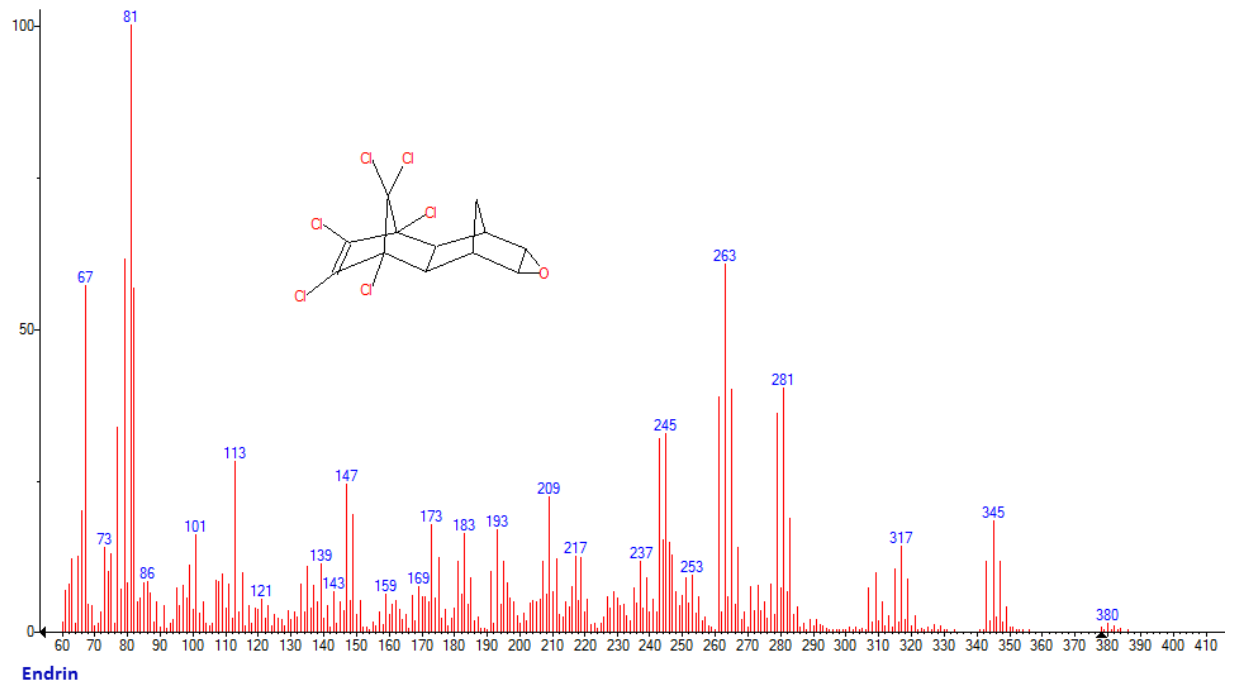
### 12- Dieldrin



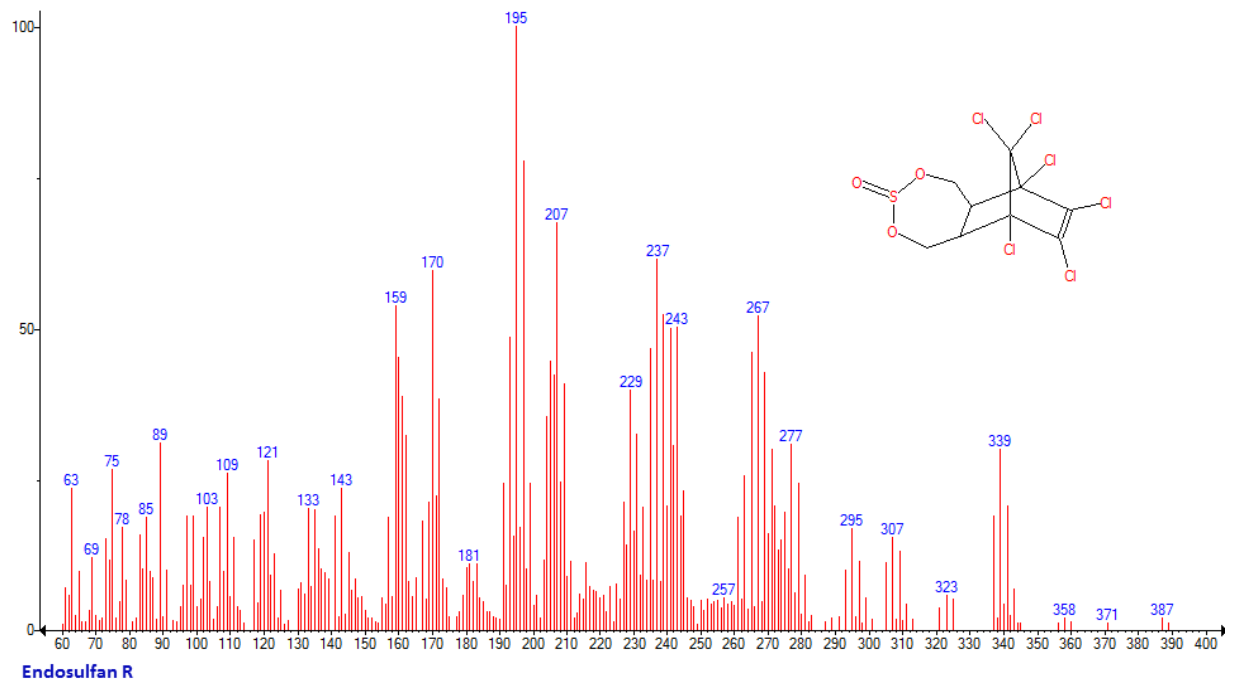
### 13 – 4,4 DDE



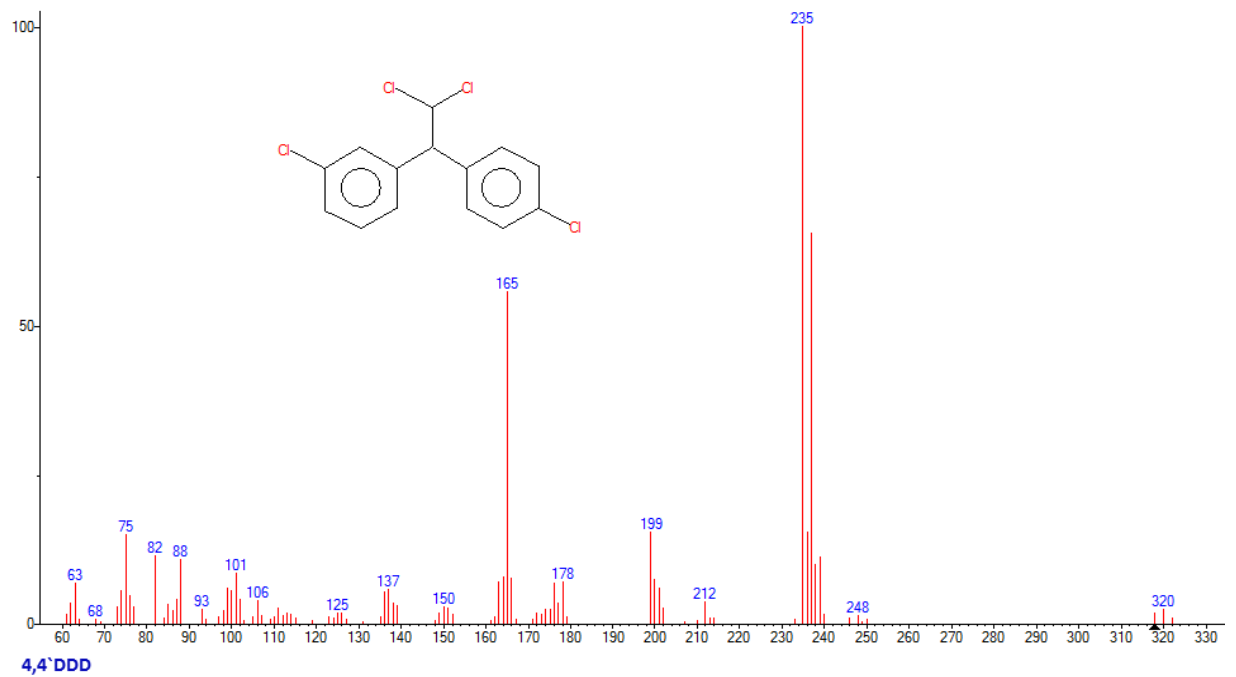
## 14 – Endrin



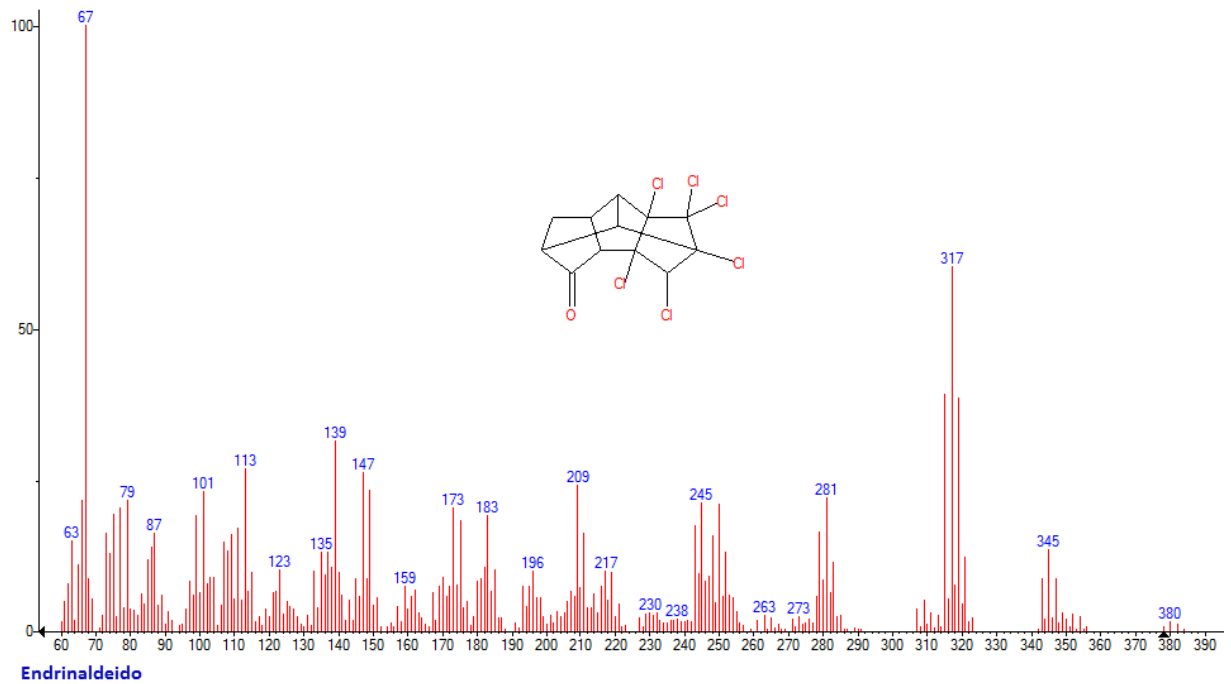
## 15- Endosulfan Beta



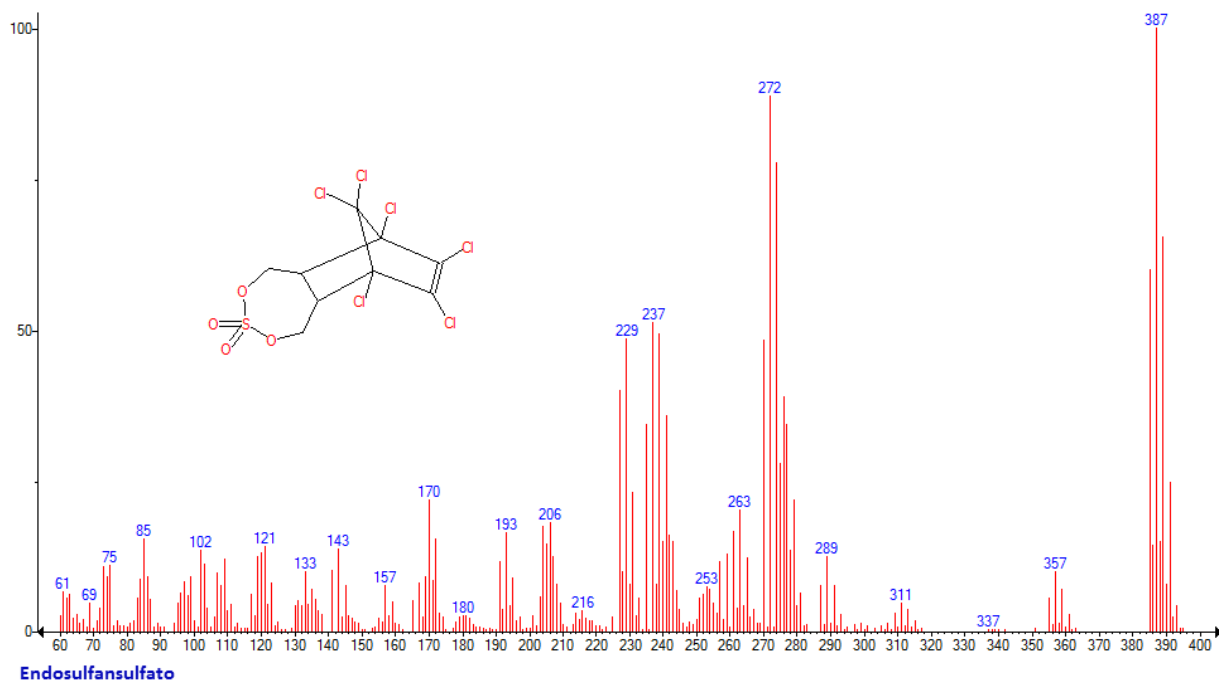
### 16- 4,4'- DDT



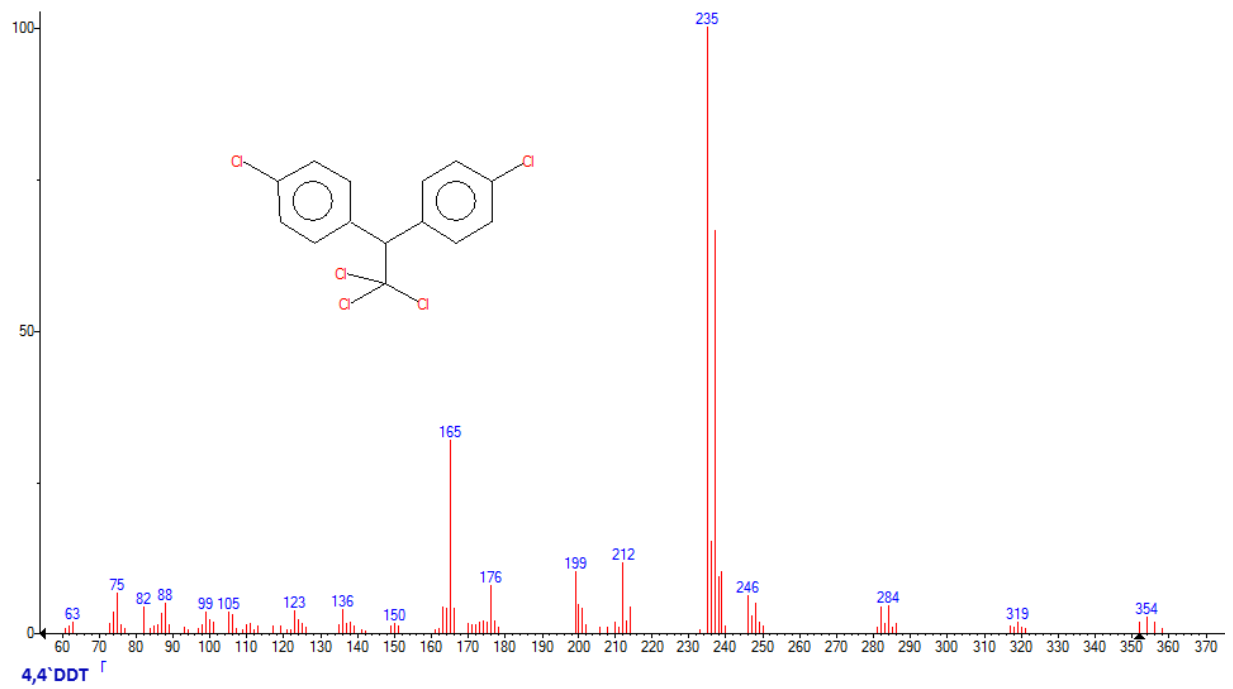
### 17- Endrinaldeido



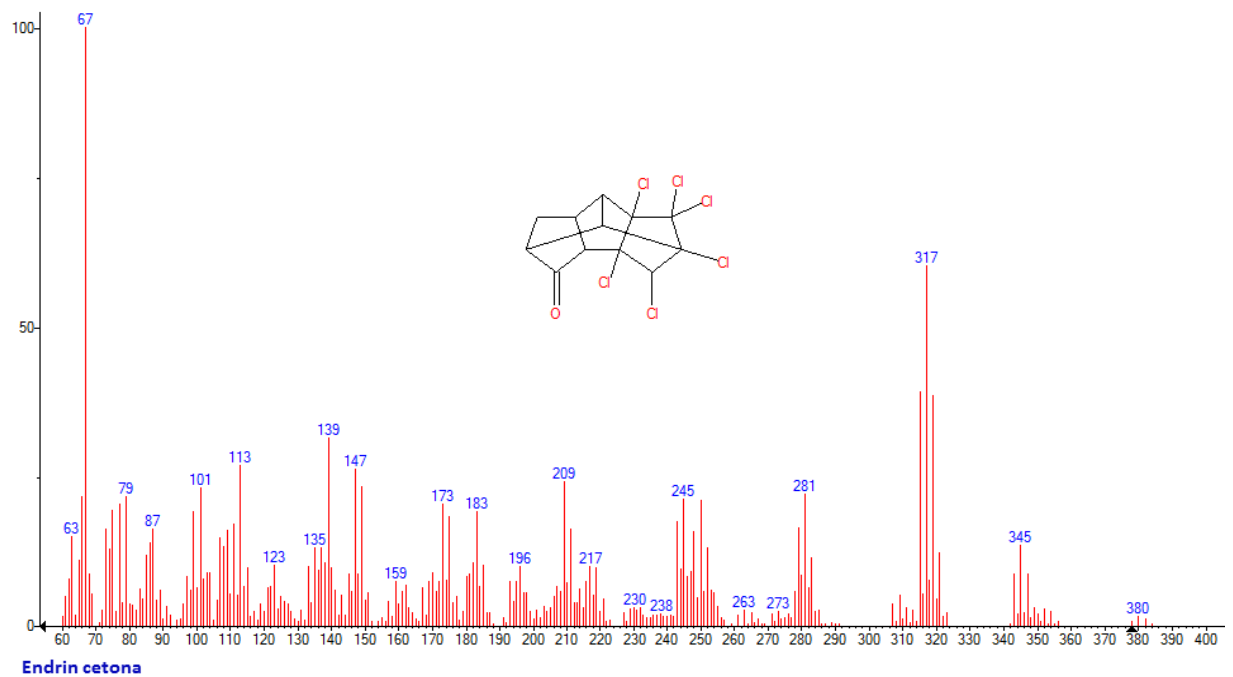
## 18- Endosulfansulfato



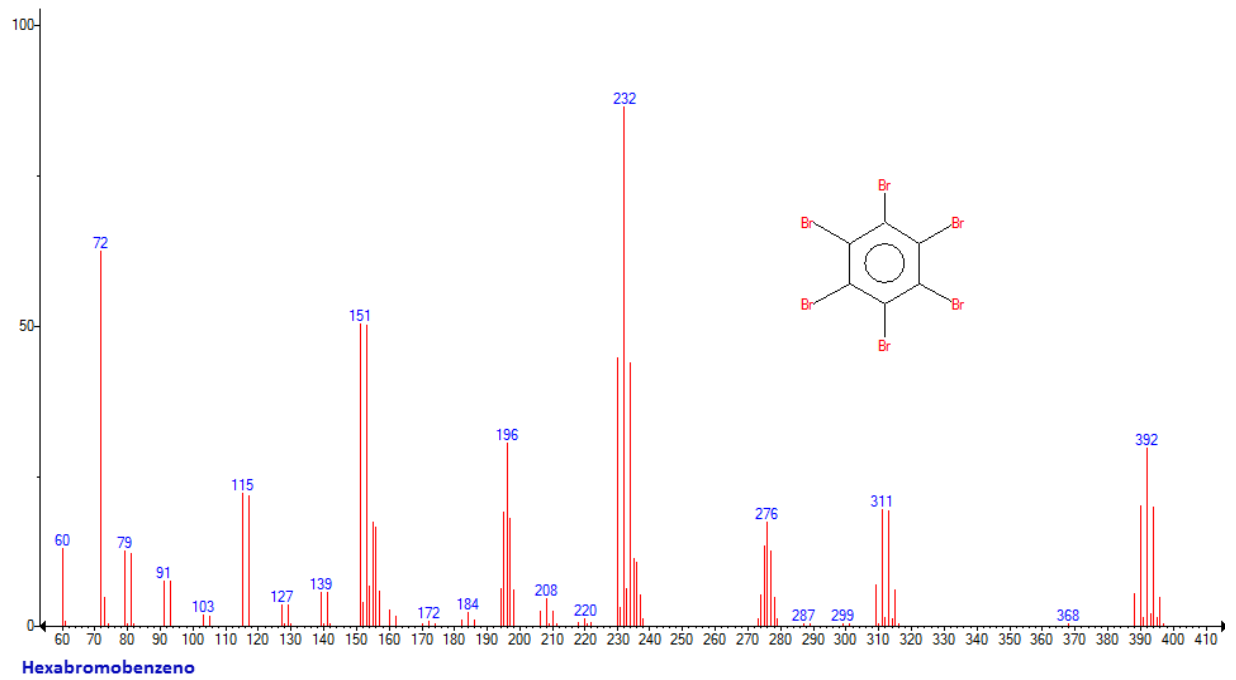
## 19- 4,4' DDT



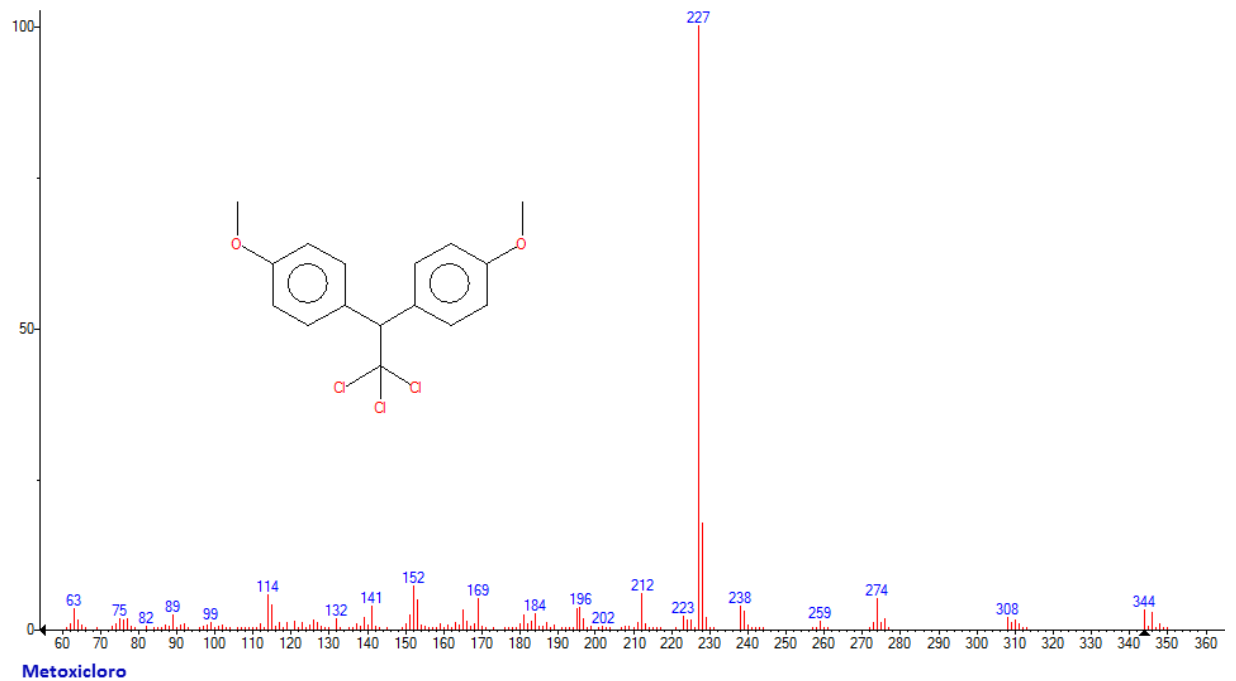
## 20- Endrincetona



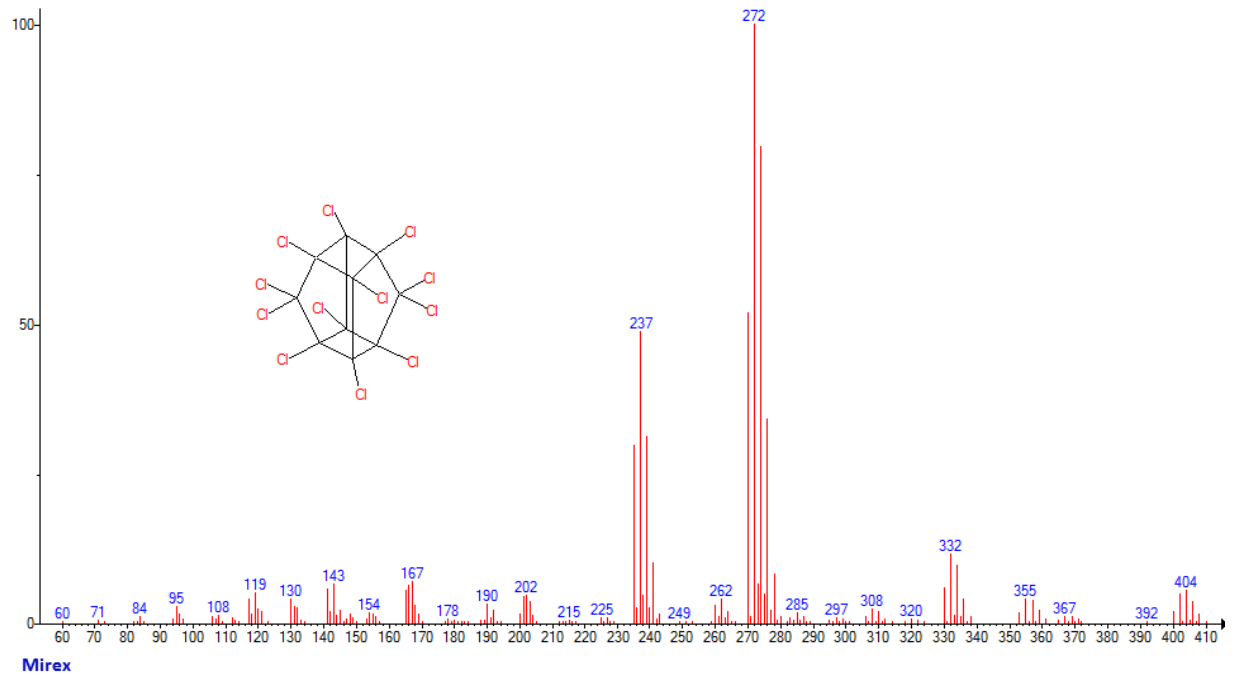
## 21- Hexabromobenzeno



## 22- Metoxicloro



## 23- Mirex



## 24- Decaclorobifenila

