

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

Eloisa Fernanda Tessaro

Nanobiorremediação de solo contaminado com
pentaclorofenol

Passo Fundo
2018

Eloisa Fernanda Tessaro

NANOBIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO
COM PENTACLOROFENOL

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Thomé.

Passo Fundo

2018

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado Nanobiorremediação de solo contaminado com pentaclorofenol, elaborada por Eloisa Fernanda Tessaro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data da defesa: 14/03/2018

Comissão Examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Luciane Maria Colla - Universidade de Passo Fundo

Prof. Dr. Márcio Felipe Floss - Universidade de Passo Fundo

Prof.^a. Dr.^a. Maria Claudia Barbosa - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antônio Thomé, Orientador – Universidade de Passo Fundo

Passo Fundo, 2018.

Dedico,
Aos meus pais Silvana e Luiz Fernando, minha
Irmã Vivi e namorado Igor, pelo apoio,
dedicação, paciência, amor constante e
presença em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter se manifestado na energia que me influenciou nesta escolha. Obrigada pela capacidade de raciocinar e evoluir que me fizeram chegar aqui;

Aos meus pais, pelo melhor exemplo que eu poderia ter. Obrigada pelas mãos que nunca soltaram das minhas para dar este, que foi o maior e mais ousado passo da minha vida até hoje;

A minha irmã Maria Vitória, o pedaço de mim mais difícil de ser controlado. Você é meu maior estímulo para ter e ser o melhor;

Ao professor Dr. Antônio Thomé que acompanhou minha vida acadêmica desde a graduação e desde lá vem abrindo portas para o meu crescimento científico. Obrigada pelo empenho e paciência na orientação deste trabalho;

Ao Grupo de Pesquisa em Geotecnia ambiental pelas proveitosas discussões acerca do trabalho, em especial ao eterno patrão Iziquiel Cecchin. Obrigada pelas incontáveis ajudas na bancada, na escrita, na discussão de dados, cálculos, etc., sobretudo pela amizade que construímos nestes longos anos de laboratório juntos;

Aos estagiários do laboratório, Jor, Pietra e Marcão por toda colaboração no laboratório. Obrigada pelas inúmeras análises realizadas e vidrarias lavadas;

Ao meu amor Igor, por estar ao meu lado em todas as horas, sempre paciente e solícito. Obrigada pelas palavras e atitudes que me deram força pra superar todos os inconvenientes;

Aos meus amigos/irmãos Bruna e Alan que estiveram ao meu lado neste período de muitos desafios e aprendizados, sempre me dando força e dividindo comigo as angústias de análises com resultados não satisfatórios e alegrias de degradações bem sucedidas. Esta conquistas não seria tão especial se vocês não fizessem parte dela;

A todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

“Os sonhos podem transformar o rumo da história.”

Maria Gadú

RESUMO

A nanobiorremediação é uma técnica para remediação de solo que incorpora duas tecnologias a fim de degradar contaminantes: a nanorremediação, através de nanopartículas de ferro de valência zero (nFeZ) e a biorremediação, através do metabolismo microbiano. O uso de nFeZ tem se mostrado um método eficiente para degradar compostos organoclorados, que ainda favorece a ação de microrganismos do solo, viabilizando a biorremediação como método de remoção do teor residual do contaminante do solo. Desta forma, a nanorremediação pode ser empregada visando a diminuição das concentrações iniciais de Pentaclorofenol (PCF) a fim de viabilizar a degradação de teores residuais pelas bactérias presentes no solo, de forma mais eficiente, sustentável e rentável. Objetivou-se estudar o processo de nanobiorremediação em solo residual de basalto contaminado com pentaclorofenol. O PCF é um pesticida organoclorado, considerado contaminante de solo e água em função do seu caráter tóxico e carcinogênico. Para isso, determinou-se os teores máximos toleráveis de PCF e nFeZ pela microbiota do solo através do método de respirometria. Para o nFeZ nenhuma das concentrações testadas teve efeito tóxico a microbiota. Contudo, para o PCF, as concentrações de 3, 10, 20, 50 e 150 mg/kg tiveram um valor de acúmulo de CO₂ menor do que o controle, pontuando, ainda que em diferentes níveis, efeitos adversos aos microrganismos. Neste caso, concentrações acima de 20 mg/kg representaram uma queda de mais de 50% na produção total de CO₂ relativa ao controle, gerando ambiente desfavorável para a atividade microbiana. Ainda, estudou-se variáveis que influenciam a recuperação do PCF do solo e sua quantificação, como equipamentos, solventes e método analítico. Constatou-se que o procedimento de agitação da mistura de solo contaminado com metanol e posterior análise em espectrofotômetro com comprimento de onda de 230nm forneceram os melhores valores de eficiência de recuperação. O ensaio de nanorremediação avaliou o teor necessário de nFeZ para degradação do PCF a níveis toleráveis pelos microrganismos para o ensaio final de nanobiorremediação. Tal concentração foi de 40 g/kg e permitiu se chegar a concentração de PCF de 8 mg/kg a partir do teor inicial de 20 mg/kg. No ensaio de nanobiorremediação, avaliou-se a degradação do PCF e a produção de CO₂ de amostras de solo autoclavadas e não autoclavadas, a fim de diferenciar se a degradação foi realizada pelos microrganismos ou pelo nFeZ. Em ambos os casos ocorreu uma degradação de cerca de 40% do PCF nas primeiras 24 horas, e se aproximou de 100% após 60 dias de ensaio. De acordo com o ensaio de respirometria, foi possível notar que ocorreu aumento da atividade microbiana após a degradação do teor inicial do PCF pelo nanoferro, sinalizando potencial para biodegradação do teor restante do contaminante. A análise estatística dos dados demonstrou que no tempo analisado neste estudo não ocorreu a biorremediação do PCF, contudo, houve degradação de cerca de 95% do contaminante, evidenciando que as concentrações e procedimentos utilizados foram satisfatórios para a descontaminação do solo.

Palavras-chave: biorremediação, nanorremediação, organoclorados.

ABSTRACT

Nanobiorremediation is a technique for soil remediation that incorporates two technologies in order to degrade contaminants: nanoremediation through zero valent nano iron (nZVI) and bioremediation through microbial metabolism. The use of nZVI has been shown like an efficient method to degrade organochlorine compounds, which still favors the action of soil microorganisms, making bioremediation possible as a method to remove the residual content of contaminant. Thus, nanoremediation can be used to reduce the initial concentrations of pentachlorophenol (PCP) in order to allow the degradation of residual contents by the bacteria present in the soil, in a more efficient, sustainable and economic way. This work proposes to investigate the nanobioremediation process in residual basalt soil contaminated with pentachlorophenol. PCP is an organochlorine pesticide, considered a soil and water contaminant due to its toxic and carcinogenic character. For this, the maximum tolerable levels of PCP and nZVI were determined by the soil microbiota through the respirometry method. For nZVI none of the concentrations tested had a toxic effect on microbiota. However, for PCP, the concentrations of 3, 10, 20, 50 and 150 mg/kg had a lower CO₂ accumulation value than the control, even though at different levels, they had an adverse effect on the microorganisms. In this case, concentrations above 20 mg/kg represented a reduction of more than 50% in total CO₂ production relative to the control, generating an unfavorable environment for the microbial activity. Also, we tested variables that influence the soil PCP extraction, such as equipment, solvents and analytical method. It was verified that the procedure of mixing the contaminated soil with methanol and subsequent spectrophotometer analysis with a wavelength of 230nm provided the best values of extraction efficiency. The nanoremediation assay evaluated the required content of nZVI for PCP degradation at levels tolerable by microorganisms for the final nanobioremediation experiment. This concentration was 40 g/kg and allowed to reach a concentration of PCP of 8 mg/kg from the initial content of 20 mg/kg. In the nanobioremediation test, PCP degradation and CO₂ production of autoclaved and non-autoclaved soil samples were evaluated in order to differentiate the degradation performed by microorganisms or nZVI. In both cases a degradation of about 40% of the PCP occurred in the first 24 hours, and approached 100% after 60 days of testing. According to the respirometry test, it was possible to observe that an increase in the microbial activity occurred after the degradation of the initial PCP content by the nano iron, signaling potential for biodegradation of the remaining content of the contaminant. The statistical analysis of the data showed that in the time analyzed in this study there was no bioremediation of the PCP, however, there was degradation of about 95% of the contaminant, evidencing that the concentrations and procedures used were satisfactory for soil decontamination.

Keywords: Nanoremediation, bioremediation, organochlorines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do PCF.	20
Figura 2 - Perda de reatividade do nFeZ com o passar do tempo.....	29
Figura 3 - Mecanismo de Toxicidade do nanoferro.....	31
Figura 4 - Curva Granulométrica do solo em estudo.....	37
Figura 5 - Fluxograma da metodologia.	38
Figura 6 - Respirômetros para análise da toxicidade do nFeZ.	40
Figura 7 - Experimento de toxicidade do PCF.	41
Figura 8 - Ultrassom utilizado nos experimentos.	43
Figura 9 - Agitador de solo utilizado.	43
Figura 10 - Detalhe das gavetas do agitador de solo.	43
Figura 11- Metodologia utilizada para recuperação do PCF do solo.	44
Figura 12 - Realização do experimento utilizando Etanol/Água.....	45
Figura 13 - Realização do experimento utilizando Metanol.....	45
Figura 14 - Espectrofotômetro utilizado.....	47
Figura 15 - Metodologia para o teste de recuperação e detecção em espectrofotômetro.	47
Figura 16 - Teste de influência de umidade na absorbância.....	48
Figura 17 - Fluxograma do ensaio para remediação do PCP utilizando nFeZ.	49
Figura 18 - Ensaio de nanorremediação.	50
Figura 19 - Ensaio de nanobiorremediação.	51
Figura 20 - Ensaio de biodegradação do PCF.	52
Figura 21 - Solo para análise de degradação.	52
Figura 22 - Acúmulo de CO ₂ para diferentes concentrações de nanoferro.	53
Figura 23 - Acúmulo total de CO ₂ para as amostras.	54
Figura 24 - Acúmulo de CO ₂ para diferentes concentrações no teste de toxicidade do PCF.....	56
Figura 25 - Total acumulado de CO ₂ para as amostras testadas.....	57
Figura 26 - Influência das concentrações de PCF em relação ao Controle H.	58
Figura 27 – Eficiência de recuperação do PCF do solo utilizando Agitador e Ultrassom.	59
Figura 28 - PCF recuperado utilizando 5 gramas de solo contaminado.....	60
Figura 29 - PCF recuperado do solo utilizando 1 grama de solo contaminado.....	61

Figura 30 - Curva de calibração do PCF (λ 230 nm).	63
Figura 31 - Curva de calibração do PCF (λ 250 nm).	63
Figura 32 - Curva de calibração do PCF (λ 270 nm).	64
Figura 33 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando λ 230.	65
Figura 34 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando λ 250.	66
Figura 35 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando λ 270.	67
Figura 36 - Degradação de PCF por nFeZ.....	69
Figura 37 - Acúmulo de CO ₂ de diferentes condições experimentais para a nanobiorremediação.....	70
Figura 38 - Degradação do PCF ao longo do tempo.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades do PCF.	20
Tabela 2 - Características do solo.	36
Tabela 3 - Composição do nanoferro em pó.	37
Tabela 4 - Concentrações de nanoferro a serem avaliadas.	40
Tabela 5 - Concentrações de PCF a serem testadas.	40
Tabela 6 – Planejamento fatorial.	42
Tabela 7 - Solubilidade do PCF nos solventes utilizados.	44
Tabela 8 - Planejamento fatorial testado.	45
Tabela 9 - Planejamento fatorial do experimento.	48
Tabela 10 – Condições testadas no ensaio de nanobiorremediação.	50
Tabela 11 - Valores de concentração de PCF recuperados utilizando $\lambda 230$	65
Tabela 12 - Valores de concentração de PCF utilizando $\lambda 250$	66
Tabela 13 - Valores de concentração de PCF utilizando $\lambda 270$	67
Tabela 14 - Influência da umidade na absorvância.	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ÁREAS CONTAMINADAS	16
2.2	ORGANOCLORADOS: HISTÓRICO E PROPRIEDADES	17
2.3	PENTACLOROFENOL	20
2.4	CONTAMINAÇÃO DE SOLO COM PCF	21
2.5	REAÇÕES PCF NO SOLO	22
2.5.1	Análise do PCF do solo	24
2.6	REMEDIAÇÃO DE SOLO	28
2.6.1	Nanorremediação	28
2.6.2	Biorremediação de clorofenóis	31
2.6.3	Técnicas sequenciais de remediação: nanobiorremediação	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	SOLO	35
3.2	REAGENTES	37
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.3.1	Contaminação do solo com PCF	39
3.3.2	Teores limite de toxicidade para os microrganismos do solo	39
3.3.2.1	Toxicidade do nFeZ	39
3.3.2.2	Toxicidade do PCF	40
3.3.3	Processo de recuperação do PCF do solo	42
3.3.3.1	Equipamentos	42
3.3.3.2	Solventes	44
3.3.3.3	Método Analítico	46
3.3.4	Nanorremediação utilizando nFeZ	48

3.3.5	Nanobiorremediação.....	50
3.3.6	Análise estatística	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1	TEORES LIMITE DE TOXICIDADE PARA OS MICRORGANISMOS DO SOLO	53
4.1.1	Toxicidade do nfez	53
4.1.2	Toxicidade do PCF	55
4.2	PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DO PCF DO SOLO	59
4.2.1	Equipamentos	59
4.2.2	Solventes.....	60
4.2.3	Método Analítico	62
4.2.3.1	Cromatografia	62
4.2.3.2	Espectrofotometria.....	62
4.3	NANOREMEDIÇÃO UTILIZANDO NFEZ.....	68
4.4	NANOBIORREMEDIAÇÃO.....	70
5	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O pentaclorofenol (PCF) é um organoclorado persistente que foi amplamente utilizado como pesticida, herbicida e preservante de madeira. Devido à sua toxicidade aguda e cancerígena para a saúde humana, foi classificado como um poluente prioritário na água pela USEPA (1998).

O uso desenfreado do PCF por um longo período de tempo faz com que ainda possa ser detectado em água, sedimentos, solo e alimentos. De acordo com o Superfundo NPL (Superfund National Priority List) dos Estados Unidos, mais da metade das 1328 áreas identificadas, estão contaminadas com organoclorados (USEPA, 2016). Park e Bielefeldt (2005) mencionam que somente a atividade de preservação de madeira utilizando PCF causou a contaminação de aproximadamente 700 áreas nos EUA. Além disso, a estabilidade da molécula deste composto, que resulta na sua permanência no solo, fundamenta o desenvolvimento de processos que visam sua retirada do ambiente e coíbam o contato com os seres vivos.

A biodegradação é o principal processo para a transformação de poluentes orgânicos, no qual os microrganismos do solo são os responsáveis pela degradação dessas substâncias (MCALLISTER; LEE; TREVORS, 1996, BARBEAU et al., 1997). Segundo Mohn e Tiedje (1992), sob condições anaeróbias, as bactérias promovem a desalogenação redutiva do PCF, de modo que os átomos de cloro são sequencialmente substituídos por hidrogênio até a transformação completa em compostos menos tóxicos.

No entanto a toxicidade do PCF pode afetar negativamente a biorremediação, deixando o processo lento e pouco eficiente. A utilização de nanopartículas de ferro de valência zero como um processo primário à biorremediação, tem se mostrado uma estratégia promissora para a remediação de organoclorados como o PCF (WANG et al., 2016). O nFeZ, assim como as bactérias desalogenadoras, é capaz de remover o cloro da molécula através da desalogenação redutiva, funcionando como um complemento ao processo e por isso tem sido extensivamente estudado para aplicação na remediação *in situ*.

O nFeZ possui uma elevada área superficial em função de seu tamanho em pequena escala. Isto gera um incremento nas reações superficiais de troca de elétrons, tornando-o um forte agente redutor de organoclorados e demonstrando taxas melhoradas pra reações de desalogenação, contudo, sua aplicação pode ter um elevado custo dependendo das concentrações necessárias e condições locais. Assim, o seu uso em concentrações menores a fim de reduzir parte do teor do contaminante diminui os investimentos necessários e favorece sua aplicação. No entanto, por se tratar de uma tecnologia nova, pouco se sabe a respeito de seu

comportamento no solo em longo prazo. De acordo com Peralta-Videa et al. (2011), as características que tornam o nFeZ conveniente à remediação de solo, como pequeno tamanho e alta capacidade de oxi-redução, também fazem dele um potencial contaminante do meio ambiente. Alguns estudos mostraram que as nanopartículas com estabilizantes possuem efeito tóxico menor se comparadas as nanopartículas sem o revestimento orgânico, mas ainda são necessários novos estudos que avaliem sua eco-toxicidade (KIRSCHLING et al. 2010, KIM et al. 2009).

A associação de técnicas para a descontaminação de ambientes está sendo investigada e muitos estudos têm apontado uma importante relação entre as técnicas de nanorremediação e biorremediação, pois o nanoferro como processo primário na degradação de PCF, além de diminuir as concentrações iniciais a níveis toleráveis pelos microrganismos, através da transferência direta de elétrons, ainda gera H_2 que é empregado pela desalogenação biótica por alguns tipos de bactérias. Neste caso, o H_2 funciona como um doador de elétrons que auxilia no metabolismo dos microrganismos (LOFFLER; EDWARDS, 2006).

Por se tratar de uma nova solução ambiental, realizou-se uma pesquisa bibliométrica através da plataforma Scopus (2018) a fim de investigar o estado atual da arte sobre o tema. Para o termo nanobiorremediação (nanobioremediation) encontrou-se somente 5 artigos, sendo 1 publicado em 2016 e 4 em 2017. Já para o termo nanobiorremediação de organoclorados (organochlorine nanobioremediation) nenhum resultado foi apresentado.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo geral investigar o processo de nanobiorremediação em solo residual de basalto contaminado com pentaclorofenol.

Os objetivos específicos foram:

- a) Definir o teor limite de toxicidade de PCF para os microrganismos do solo;
- b) Definir o teor limite de toxicidade de nFeZ para os microrganismos do solo;
- c) Definir método para recuperação do PCF do solo;
- d) Definir o teor necessário de nFeZ para degradação da concentração inicial do PCF no solo;
- e) Avaliar a degradação do contaminante pelo nFeZ;
- f) Avaliar a biorremediação do teor residual de PCF no solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁREAS CONTAMINADAS

A qualidade do solo pode ser relacionada diretamente com a saúde humana principalmente em função da contaminação da água e alimentos. Desta forma, muitos pesquisadores têm mostrado relações entre o estado do solo e a saúde humana (BREVIK; SAUER, 2015).

De acordo com a USEPA (2004), aproximadamente 350 mil áreas contaminadas existentes nos Estados Unidos levariam mais de 30 anos para serem descontaminadas, sendo necessário para isto, um investimento de 8,3 bilhões de dólares/ano. Já na Europa, foram identificadas mais de 342 mil áreas contaminadas e sua descontaminação custaria em torno de 6 bilhões de Euros/ano (PANAGOS et al., 2013). Não se sabe o número exato de áreas contaminadas existentes no Brasil, mas de acordo com a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2013), somente no estado de São Paulo existiam 4771 áreas contaminadas, na sua maioria por postos de combustíveis.

A necessidade de recuperação destas áreas não é questionável, visto que a contaminação pode ocorrer diretamente através da absorção dérmica e inalação de partículas do solo, ou indiretamente através do consumo de culturas e legumes da área contaminada e produtos de origem animal, ou através da água (KABENGI; CHRYSOCHOOU, 2015).

Assim, o governo através de ferramentas legais tem estabelecido ações para reverter a atual situação. Em 2010 entrou em vigor a CONAMA 420 de 28 de dezembro de 2009, que dá diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas através do estabelecimento de valores aceitáveis para determinadas substâncias químicas no solo. Esta resolução representa uma importante aliada na busca pelo uso sustentável e proteção da funcionalidade do solo.

De acordo com Van-Liedekerke et al. (2014), o solo é contaminado predominantemente por óleos minerais e metais pesados, originados em atividades comerciais e industriais além de tratamento e disposição de resíduos urbanos e industriais.

Os hidrocarbonetos, em função da grande utilização, têm aumentadas as chances de vazamentos e derramamentos durante transporte e armazenagem (HASAN; GHANNAM; ESMAIL, 2010).

Segundo Dalgren et al. (2009), muitas áreas contaminadas com pesticidas organoclorados foram identificadas em países industrializados. Na Europa, uma estimativa aponta que das áreas identificadas, 2,4% são contaminadas com organoclorados (EEA, 2007),

um conjunto de poluentes orgânicos persistentes tóxicos que foram utilizados amplamente como pesticidas e possuem alta persistência e difícil degradação, acumulando-se por muito tempo no ambiente (GAO et al., 2008). De acordo com Sun et al. (2013), a maioria destes locais representa uma ameaça aos moradores e ao meio ambiente, necessitando de técnicas de remediação adequadas e eficazes.

Sabe-se que muitas áreas contaminadas têm o potencial para a reconstrução e reestabelecimento de condições apropriadas para a sua reutilização produtiva, o que pode trazer muitos benefícios sociais, econômicos e financeiros (CORNWALL COUNCIL, 2010). No entanto, a presença de contaminantes que representam riscos significativos para a saúde humana e para o meio ambiente são condicionantes à sua reutilização, e por isso a avaliação e gestão de risco desempenham papel crucial neste processo (WCISŁO et al., 2016).

Para Schädler et al. (2011) o incentivo à remediação de solo está no planejamento e comunicação dos possíveis usos da área às partes interessadas. Neste sentido, a recuperação de áreas contaminadas é atraente porque reduz os riscos para a saúde humana e os impactos causados ao meio ambiente, ocasionando uma série de benefícios sociais e econômicos (ALBERINI et al., 2006).

2.2 ORGANOCLORADOS: HISTÓRICO E PROPRIEDADES

As propriedades inseticidas dos organoclorados, preliminarmente sintetizados por Zeidler em 1874, foram descobertas em 1940 por Paul Mueller na Suíça (FARIA, 2009), e tiveram seu uso expandido auxiliando na prevenção e eliminação de pragas. Na Itália, durante a Segunda Guerra Mundial o diclorodifeniltricloroetano (DDT) chegou a ser pulverizado na pele da população a fim de prevenir epidemias como o tifo e em outros casos a malária e febre amarela, pragas até então dificilmente controláveis (KONRADSEN et al., 2004). Pela primeira vez na história, uma epidemia de tifo não foi só contida, mas quase imediatamente dizimada, utilizando-se DDT (CASIDA; QUISTAD, 1998).

A eficiência constatada fez com que seu uso se expandisse para a agricultura, propiciando colheitas com alto rendimento econômico (BENN; McAULIFFE, 1981; MARICONI, 1985).

Outros tipos de organoclorados foram criados para que se pudesse controlar pragas e epidemias, mas logo suas desvantagens começaram a aparecer pois a redução na eficácia exigiu dosagens cada vez maiores necessitando de produção em grande escala de inseticidas mais eficientes e biodegradáveis (TURK, 1989).

Mesmo propiciando um aumento na produtividade, os organoclorados quando no solo não matavam somente os organismos alvo, mas também insetos neutros ou até mesmo benéficos ao homem (KADIR; BARLOW, 2000). Além disso, o poder residual, considerado até então como algo positivo, passou a ser revisto em função da persistência ambiental e estabilidade química, sendo detectados nos mais variados substratos e tendo provocado a inquietação dos estudiosos do assunto e da população em geral.

Em 1962, Rachel Carson, uma bióloga norte-Americana lançou um livro intitulado de “Silent Spring” (Primavera Silenciosa), que denunciava a toxicidade de inseticidas, principalmente o organoclorado DDT. Ainda na segunda metade da década de 60, os estudos sobre pesticidas organoclorados se intensificaram, resultando na restrição ou proibição do seu uso (MATUO et al., 1990). Assim, no início da década de 70 a Agência de Proteção Ambiental norte-americana cancelou todos seus usos. Os outros países desenvolvidos seguiram o exemplo rapidamente (CASIDA; QUISTAD, 1998).

Na Convenção de Estocolmo em 2001, um tratado foi assinado por 151 países, incluindo o Brasil, a fim de parar a fabricação e utilização de 12 substâncias tóxicas, inseticidas como aldrin, dieldrin, endrin, clordano, DDT, heptacloro, toxafeno e mirex, dois químicos de aplicação industrial como hexaclorobenzeno, bifenilas policloradas (PCB's) e dois resíduos dioxinas e furanos (ALMEIDA et al. 2007).

No Brasil, os organoclorados foram proibidos para o uso agrícola, sendo somente autorizado por órgãos públicos responsáveis pelas Campanhas de Saúde (Portaria n.º 329 de 2/9/85 do Ministério da Agricultura) (LIMA; RACCA FILHO, 1987). O mais clorado dos clorofenóis, o pentaclorofenol, também deixou de ser produzido no Brasil na década de 70 e após uma série de restrições, teve sua utilização oficial permitida apenas ao processo de preservação da madeira. De acordo com o IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, o pouco produto disponível no Brasil é importado e tem um elevado custo. Ainda declara que por se tratar de um produto agressivo ao ser humano tem seu uso desestimulado pela legislação,

Os produtos precursores são solventes organoclorados obtidos pela hidrocloração e cloração de compostos orgânicos, apresentando seis produtos principais: cloreto de metileno, tricloroetano (TCE), clorofórmio, tetracloreto de carbono, cloreto de metila e tetracloroetano (PCE) (ARMAS, 2007).

Os solventes clorados mais comuns estão na forma de metanos clorados, etanos e etenos. A maioria é solúvel em água, apresentam pressão de vapor variável e mais densos que a água, tendendo a afundar e ficar depositados no fundo dos aquíferos (EPA, 1998).

Os organoclorados podem ser classificados em função do seu peso molecular. Os compostos de baixo peso molecular são aqueles voláteis com baixa capacidade de acúmulo na biota, sendo assim um potencial contaminante da atmosfera. Já os organoclorados de alto peso molecular constituem-se de pesticidas e bifenilas policloradas, que provocam impacto no sistema aquático, solo e sedimentos em função da sua capacidade de acumular-se (ZHANG et al., 2012).

Devido à persistência ambiental, toxicidade e capacidade de bioacumular-se, tais compostos são ainda classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (PNUMA 2002). A emissão destes contaminantes pode ocorrer durante o processo de produção, logística de transporte e uso, e seu destino ambiental dependerá das propriedades físico-químicas do organoclorado e do ambiente ao qual foi exposto.

Segundo Del Grande (2005), são relativamente inertes quando comparados a outras classes de pesticidas, pois apresentam alta estabilidade devido às ligações carbono-cloro. Mesmo assim, os compostos organoclorados podem sofrer processos de desidrocloração, oxidação, descloração, rearranjo, hidrólise e reações fotoquímicas, evidenciando processos de bioacumulação nos tecidos adiposos dos organismos vivos.

Santos (2007) define a adsorção de compostos organoclorados na matéria orgânica (MO) como o maior processo físico-químico não destrutivo que pode influenciar na concentração após sua introdução no meio ambiente. Sua baixa solubilidade em água e o alto coeficiente de partição octanol-água indicam alta afinidade pela MO (SANTOS, 2001), o que torna a determinação do teor orgânico dos sedimentos uma importante ferramenta para avaliar a distribuição dessas substâncias no ambiente.

De acordo com Silva et al. (2016), o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo seguido pelos Estados Unidos, colaborando com a expansão do mercado de pesticidas que em 2010 cresceu aproximadamente 190%. A toxicidade dos inseticidas associados a ampla utilização, tornam a rotina de trabalho na área agrícola uma das mais perigosas em função do risco de intoxicações agudas, doenças crônicas, problemas reprodutivos, danos ambientais, entre outros (PIGNATI; MACHADO, 2011).

Estudos sobre o impacto da utilização de pesticidas na saúde humana ainda são insuficientes para quantificar a extensão dos danos causados pela exposição a essas substâncias tóxicas. Um levantamento das áreas com maior índice de contaminação por poluentes orgânicos persistentes (POP's) ainda é um desafio no Brasil em função da falta de dados que compromete a avaliação da extensão do problema e o monitoramento da sua evolução temporal.

2.3 PENTACLOROFENOL

O pentaclorofenol (PCF, C_6Cl_5OH), cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 1, é um composto orgânico clorado de caráter ácido, constituído por cinco átomos de cloro substituídos, pertencente ao grupo dos hidrocarbonetos halogenados (MACHADO et al., 2005). As propriedades físicas e químicas do PCF estão apresentadas na Tabela 1.

A estabilidade do anel aromático e o alto conteúdo de cloro dessa molécula a torna de difícil degradação (MONTIEL et al., 2004). De acordo com Kim e Carraway (2003), a toxicidade aumenta com o número de moléculas de cloro substituídos no anel, o que torna o PCF um composto de grande importância do ponto de vista ambiental, podendo ser ainda encontrado em vários locais do mundo que já fizeram sua utilização (HE et al., 2006; LAN et al., 2011).

Figura 1- Estrutura química do PCF.

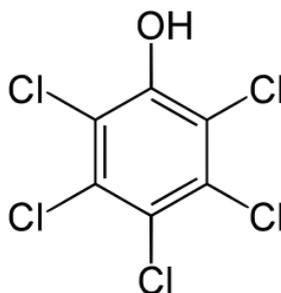


Tabela 1- Propriedades do PCF.

Peso molecular	266,35 g/mol
Ponto de fusão	190 °C
Ponto de ebulição	309-310 °C
Densidade	1,978 g/mg a 22°C
Solubilidade em água	14 mg/L a 20°C
Solubilidade em solventes orgânicos	Muito solúvel em álcool, éter, solúvel em benzeno, levemente em éter de petróleo frio
Log Kow	5,01
Log Koc	4,5
Pressão de Vapor a 25 °C	0,00011 mmHg
Constante de Henry a 25°C	$3,4 \times 10^{-6}$ atm-m ³ /mol

Fonte: U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2001)

Estudos toxicológicos agudos relativos ao PCF e seus sais indicam que sua Dose letal para mais de 50% da população (DL50) varia entre 27-205 mg/kg, inalatória Concentração letal

(CL50): 294 mg/m³ de ar, dérmica: 80-350 mg/kg, é irritante para a pele, olhos e mucosa (IPCS, 1987).

A Resolução 420 de 2009 do CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas, estabelece um valor limite de 0,35, 1,3 e 3 mg/kg de solo para área agrícola, residencial e industrial respectivamente. O limite de PCF para água subterrânea é 9 µg/L, definida pela Portaria nº 518/2004 do Ministério da saúde.

A Agencia de registros para substancias toxicas e doenças (ATSDR, 2001), após reavaliação toxicológica caracterizou o PCF como interferente endócrino, o que torna necessário a recuperação de áreas contaminadas e a restrição total do seu uso.

Subramanian et al. (2010) classificaram a hidrofobicidade do PCF como alta ($\log K_{ow}=5$), tendendo a permanecer no solo ou sedimento. Desta forma, o solo é considerado um dos seus principais destinos no meio ambiente e uma potencial fonte de remissão (DIAGBOYA et al., 2016).

2.4 CONTAMINAÇÃO DE SOLO COM PCF

Contaminações de solos com PCF são comumente encontradas em estações de tratamento de madeira. Segundo Park e Bielefeldt (2005), mais de 700 áreas foram contaminadas com PCF no Estados Unidos em função desta atividade. Ainda, Weber et al. (2008) sugere que contaminações com PCF podem ser encontradas na Suécia, Finlândia, (Rio Kymijoki), República Tcheca (Indústria Química Spolana), Alemanha (Cidade de Bitterfeld) e no Brasil (São Paulo).

A CETESB considera os solos da Baixada Santista no estado de São Paulo, uma das regiões mais industrializadas do país, contaminadas com diversos resíduos industriais, contendo altas concentrações de hexaclorobenzeno (HCB), além da mistura de organoclorados como o PCF, tri-clorobenzeno e hexaclorobutadieno, que foram resultantes de processos industriais na década de 70 (MATHEUS 2003; MACHADO et al., 2005).

Um dos primeiros casos de contaminação com PCF a ter repercussão no Brasil aconteceu no Estado de São Paulo e tornou-se público em 1980, com a descoberta de diversos depósitos clandestinos de resíduos organoclorados nos municípios de Cubatão e São Vicente. Os resíduos tiveram origem na fabricação de agrotóxicos pela empresa Clorogil, que foi

comprada pela então estatal francesa Rhodia S.A. em 1976. As atividades da empresa tiveram início no ano de 1965, na cidade de Cubatão, São Paulo, e sua principal finalidade era a produção de pesticidas organoclorados, mais precisamente PCF e pentaclorofenato de sódio, ambos popularmente conhecidos como “pó da China” (SILVA, 2007).

As primeiras vítimas da empresa Rhodia foram seus próprios funcionários da unidade de produção em Cubatão, os quais realizaram as primeiras denúncias sobre problemas de saúde em 1978, sem muita repercussão junto à opinião pública (SILVA, 2007).

Com a ocupação dos locais contaminados a empresa interrompeu o processo de descarte dos resíduos fora de sua área fabril e passou a confiná-los precariamente dentro dos limites físicos de suas instalações. Como consequência, o Ministério Público paulista entrou em ação e, através de procedimentos investigatórios, constatou contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas na região onde houve os descartes.

Assim, a Curadoria do Meio Ambiente de São Vicente obrigou a Rhodia a isolar as áreas onde ocorreram os descartes e remover o solo contaminado para uma “estação de espera” localizada às margens da rodovia Pedro Taques. Também foi iniciada a construção de um incinerador no interior da fábrica que foi substituído por um processo de contenção e filtragem do lençol freático poluído. Tais medidas foram aprovadas pela CETESB, mas por limitações na fiscalização passou a fazer auditorias ocasionais (GOMES, 2004). Por outro lado, em outras localidades, como Itanhaém, foi realizada apenas a operação de remoção superficial do solo contaminado, sua substituição por solo limpo, reflorestamento e isolamento precário na superfície.

Em janeiro de 2002, a Rhodia anunciou oficialmente sua saída definitiva da região da Baixada Santista, sem, no entanto, oferecer maiores garantias quanto ao cumprimento das obrigações impostas devido ao seu enorme passivo ambiental (SILVA, 2007).

2.5 REAÇÕES PCF NO SOLO

O uso intensivo de PCF difundiu sua presença no solo devido à sua estabilidade molecular e propriedades de sorção (MÄNNISTÖ; TIROLA; PUHAKKA, 2001). Segundo Dams et al. (2006), quando no solo, o destino do PCF depende das condições ambientais e das interações com os componentes do solo e seus compostos orgânicos. Portanto, a heterogeneidade do solo influencia diretamente o destino e transporte desta substância no solo.

Mesmo as condições químicas do solo e do ambiente tendo papel definitivo no comportamento de compostos orgânicos, a difícil degradação química, fotolítica e biológica de

xenobióticos como o PCF (STOCKHOLM DECLARATION, 2001) propiciam sua adsorção nas partículas do solo pela afinidade com a MO (BRAS, 2005), tornando este o seu principal destino no solo.

Diagboya et al. (2016) explicam que o conhecimento da sorção de pesticidas no solo é fundamental, pois a influência de fatores externos e das propriedades do solo dificultam a utilização de um modelo de sorção generalizada para previsão do destino do PCF no solo. Mesmo a sorção sendo a principal reação, o PCF ainda pode ser fotolizado pela luz solar, metabolizado por microrganismos e plantas (U.S. Department of Health and Human Services), ou deixar as camadas superficiais do solo através da evaporação, além de lixiviar para águas subterrâneas (OLOLADE et al., 2016).

Alguns autores estudaram o processo de adsorção de PCF no solo. De acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (1992), tal processo ocorre mais facilmente em condições ácidas. Diagboya et al. (2016) concluíram que os minerais do solo (óxidos de ferro, óxidos de manganês e argila) e a MO desempenham variadas funções no processo de retenção e mobilidade do PCF.

Outros estudos concluíram que a MO é o adsorvente predominante (KODESOVA et al., 2011, ORECCHIO; MANNINO, 2010, SUN et al., 2010). No entanto, mesmo na presença de teores mais elevados de MO, os minerais de argila têm importante papel na sorção de pesticidas (IGLESIAS et al., 2010), porém, ainda há pouca informação sobre o assunto.

Diagboya et al. (2016) concluíram que a sorção de PCF no solo depende da temperatura e pH. Quanto maiores estes fatores, menor será a sorção. Ainda, os óxidos de ferro do solo desempenharam papel mais importante que a MO na retenção de PCF.

Do ponto de vista ambiental, os processos de imobilização são de grande importância pois diminuem a biodisponibilidade e conseqüentemente seus efeitos tóxicos.

Durante os ensaios de adsorção em teste de bancada, Alves (1998) observou que a areia de duna, oriunda da praia da Joaquina (SC), apresenta uma fraca tendência de adsorção do PCF. Isto se deve ao fato da areia possuir apenas traços de matéria orgânica e nenhum outro constituinte com propriedades adsorptivas importantes. Ainda, constatou que a retenção do PCF pela areia se mostrou praticamente inexistente quando comparada à de um solo argiloso.

Dams et al. (2006) estudaram a degradação em solo arenoso e argiloso na presença e ausência de plantas e constataram que no solo arenoso não houve degradação significativa, de modo que mais de 75% do PCF estava adsorvido ao solo e conseqüentemente não-disponível aos organismos degradadores. Segundo os autores, isso ocorreu em função do elevado teor de argila e silte existentes no solo arenoso em estudo. Dercova et al. (2007) determinaram a

influência de um complexo organomineral de ácido húmico e zeolite na degradação de PCF. A propriedade de sorção do complexo depende da concentração de ácido húmico e do PCF, e tem como objetivo diminuir a biodisponibilidade do xenobiótico no solo. Foram simuladas chuvas ácidas para a liberação gradual do PCF e foi constatada a biodegradação pelos microrganismos nativos.

Desta forma, a adsorção é responsável pela diminuição da concentração para níveis menos tóxicos, permitindo que a degradação microbiana ocorra (DERCOVA, 2007).

No entanto, as informações atuais são insuficientes para fornecer uma compreensão da função e mecanismos dos componentes do solo na sorção de pesticidas, bem como fatores ambientais, como pH e temperatura, tempo de contato com as partículas do solo, capacidade de troca catiônica (CTC), que podem ser definitivos no processo de sorção. Desta forma, novos estudos com determinados tipos de solo devem ser desenvolvidos objetivando entender as reações que ocorrem entre o PCF e o solo, para que a melhor técnica de remediação possa ser definida.

2.5.1 Análise do PCF do solo

A pesquisa de novas técnicas de preparação de amostras para química analítica tendem a desenvolver processos que produzam amostras mais representativas em menor tempo e com menor uso de solventes. A fim de avaliar a degradação do contaminante no solo, torna-se necessário estabelecer um processo que o retire do solo e o transfira para a fração líquida, a fim de ser analisada através da detecção dos compostos presentes nela.

Este processo pode ser chamado de recuperação ou recuperação do PCF, e precisa assegurar que todo o contaminante presente no solo seja transferido para uma fase líquida, para análise por espectrofotometria ou cromatografia.

O Quadro 1 apresenta um levantamento de literatura de diferentes métodos de recuperação e quantificação de PCF do solo. O primeiro método encontrado na literatura utilizando a espectrometria como forma analítica ocorreu em 1998 e foi desenvolvido por Alvez. Nos demais relatos, a detecção das moléculas do PCF foi realizada por cromatografia líquida ou gasosa. Quanto ao método de extração, observa-se uma grande variação em relação a massa de solo, volume e tipo do solvente, bem como o(s) equipamento(s) utilizado(s). Desta forma, entende-se que não existe um método específico para este processo, provavelmente em função do tipo de solo atuar como um interferente.

Quadro 1 - Levamento de métodos de recuperação descritos na literatura.

Autor (es)	Título	Método analítico	Solvente utilizado	Método
CEA et al., 2010	Biorremediação de solo contaminado com pentaclorofenol por <i>Anthracophyllum discolor</i> e seus efeitos nos microrganismos do solo.	HPLC	hexano: acetona (1:1)	5 gramas de solo agitadas com 10 ml de hexano: acetona por 2 horas. Após as amostras foram sonicadas por 5 min e filtradas com membrana millipore (0.45 µm de diâmetro).
TONG et al., 2014	Os principais microrganismos para a degradação anaeróbia de pentaclorofenol em arrozal como revelado por sondagem isotópica estável.	HPLC	água/etanol (1:1)	2ml da suspensão de solo foram agitados num agitador horizontal a 180rpm por 1 hora. Após as amostras foram filtradas com membrana millipore (0.45 µm de diâmetro).
CAO et al., 2015	Remediação eficiente de solo contaminado com pentaclorofenol com lavagem de tetrapolifosfato e subsequente tratamento com nfeZ/Ar	HPLC	metanol	0,5 g de solo com 5mL de metanol foram ultrasonicadas (20 kHz) por 30 min.
GIMENES, 2011	Biodegradação de PCF por <i>Trametes</i> .	GC	metanol	3g de solo e 10 ml de metanol foram agitadas em mesa agitadora por 10 minutos, a 160 rpm e ultrassom por 10 minutos. O extrato foi filtrado em membrana Millipore (0.45 µm de diâmetro).

RYBNIKOVA et al., 2017	Remediação de solo contaminado com PCF por oxidação química sob condições de fluxo.	HPLC	metanol/água	O solo com metanol/água foi submetido a banho ultrassônico por 60min. A suspensão foi centrifugada por 10 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e analisado.
SCELZA et al., 2008	Resposta de um solo agrícola à contaminação com pentaclorofenol (PCP) e à adição de composto ou matéria orgânica dissolvida.	HPLC	Água/etanol	1 g de solo e 20 ml de água-etanol foram agitados num agitador horizontal a 190rpm por 1 hora. Após a amostras foi centrifugado por 15 min a 3000g e concentrada por evaporação. Cada amostra foi resuspendida para 2ml de metanol.
DARKO-KAGYA et al., 2010	Reatividade das partículas de ferro em nano escala modificadas com lactato de alumínio com pentaclorofenol em solos	GC	água/etanol (1:3)	O solo foi misturado com solvente (1:3 v/v) por 24 horas. O extrato foi filtrado e acidificado para pH 2 antes da extração líquido-líquido com hexano para injeção no GC.

DAMS, 2007	Rizoremediação de PCP em solo argiloso por <i>Sphingomonas chlorophenolica</i> TCC 39723	HPLC	metanol	1 g de solo com 10 ml de metanol agitados por 1 h agitador rotatório. Alíquotas de 1 ml foram centrifugadas (6,000 x g, 30 min) e passadas por uma coluna de Extração de Fase Sólida (Bond Elut C18, 1cc/100mg, Varian, The Netherlands), sendo lavada com 10 ml de metanol. O sobrenadante (contendo metanol e PCP) passou através da coluna para remover qualquer partícula de solo e o material foi coletado em frascos âmbar (2 ml) para HPLC.
ALVEZ, 1998	Deslocamento e adsorção de um pesticida (PCP) em um solo agrícola de santa catarina: estudo experimental e simulação	Espec. UV	água	Amostras de solo com água foram agitadas a 70 rpm no shaker com posterior centrifugação. O sobrenadante era coletado e analisado em espectrofotômetro na faixa do ultravioleta (UV), com comprimento de onda de 250nm.

2.6 REMEDIAÇÃO DE SOLO

2.6.1 Nanorremediação

As aplicações de nanoferro metálico de valência zero (nFeZ) para a remediação de solo têm sido bem aceitas pelas agências reguladoras por apresentarem baixo custo e elevada eficiência (EPA, 2008; YAN, 2013), fomentando pesquisas e investigações acerca deste material.

Em função da sua pequena escala (geralmente inferior a 100 nm), elevada área superficial e considerável potencial redutor, o nFeZ classifica-se como potencial agente redutor de contaminantes, desde metais tóxicos como cromo e arsênio até a desalogenação de compostos orgânicos persistentes (THOME et al., 2015).

Wang e Zang (1997) e Zang et al. (1998) apresentaram os primeiros trabalhos usando nanopartículas metálicas para descontaminação de águas subterrâneas contaminadas com organoclorados. Foi constatada uma rápida e completa degradação através da doação de elétrons dos elementos Fe e Zn e não foi observada a formação de subprodutos. Muitos estudos recentes classificam o nanoferro de valência zero um eficiente redutor de compostos orgânicos (WEBBER et al., 2008).

As tecnologias de remediação com as nanopartículas (NPs) podem ser divididas de acordo com as reações químicas que ocorrem. Na reação de redução, as NPs doam elétrons para os contaminantes, transformando-os em formas menos tóxicas e menos móveis. Já nas tecnologias de estabilização e sorção, as NPs funcionam como um agente sorbente, coprecipitante ou imobilizante do contaminante (CUNDY et al., 2008).

Basicamente, o mecanismo de remediação do nFeZ consiste na transferência direta de elétrons para o contaminante (FU; DIONYSIOU; LIU, 2014) e a forma de injeção no solo das (NPs) varia de acordo com a permeabilidade do solo. A suspensão de nFeZ é preparada através da mistura das nanopartículas em pó com água. É necessário algum processo de ativação, cuja finalidade é a separação dos grumos de nanopartículas, resultantes do atrito e das forças superficiais existentes.

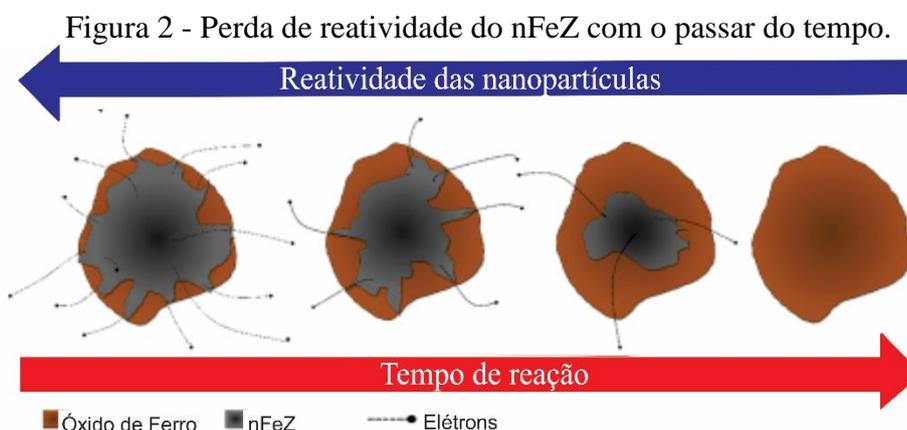
A solução de nanoferro é preparada de acordo com as necessidades da área contaminada, sendo que a concentração da suspensão deve respeitar os limites da condutividade hidráulica do solo. Em solos mais permeáveis escava-se poços no local, ou crava-se hastes no terreno para injetar a solução, com a pressão da coluna de líquido no sistema, já para materiais com baixa

permeabilidade utiliza-se a injeção sob pressão, podendo ou não gerar o fraturamento do solo (CHRISTIANSEN et al., 2010). Para solos de baixa permeabilidade geralmente são adotadas pressões elevadas a fim de ocorrer o fraturamento do meio, facilitando a percolação.

Durante a remediação utilizando nanopartículas de ferro *in situ*, muitos fatores podem influenciar. As características da própria partícula e as condições do meio em que serão aplicadas propiciam reações antes que cheguem até o contaminante isto porque, em alguns casos, as contaminações estão em elevada profundidade, necessitando que as nanopartículas mantenham suas características e sua reatividade para poder realizar a remediação. Sabe-se que até mesmo o contato com o oxigênio provoca reações, diminuindo a capacidade das nFeZ.

As partículas de nFeZ possuem elevada reatividade, isto é, capacidade de reagir com o ambiente circundante desde a sua síntese, acarretando na formação de uma fina camada de óxido de ferro com o passar do tempo, como demonstrado na Figura 2. Portanto, toda partícula de nFeZ é formada por um núcleo de Fe^0 envolta por uma crosta de óxido de espessura de aproximadamente de 2 a 3nm (MARTIN et al., 2008).

Segundo Baer et al. (2010), quando aplicado, a camada de óxido aumentará de espessura com o tempo, reduzindo a reatividade. No entanto, mesmo que em menor quantidade, ainda ocorrerá a transferência de elétrons do núcleo através de fissuras da camada oxidada.



Fonte: Cecchin et al., 2016

Desta forma, somente a elevada reatividade das nanopartículas não é suficiente para degradar e transformar compostos tóxicos no solo, pois as inúmeras reações que ocorrem entre as nanopartículas e o solo incitadas pela alta reatividade, dificultam sua mobilidade em função do efeito de filtração mecânica gerado pelo acúmulo das partículas nos vazios do solo (SALEH

et al., 2007). Além disso, quando agregadas às partículas acabam perdendo suas propriedades atribuídas ao seu tamanho (NURMI et. al., 2005).

Para viabilizar a aplicação, é preciso garantir que as partículas de nanoferro consigam se deslocar a grandes distâncias, diminuindo assim o número de poços de injeção e consequentemente seu custo (THOMÉ et al., 2015).

As modificações no nFeZ com o intuito de retardar as reações e favorecer o transporte em meio poroso tornam-se essenciais para a eficaz aplicação no tratamento de solo e águas subterrâneas. O uso de polímeros orgânicos inertes ou estabilizantes, como a carboximetil celulose (CMC), goma guar, lactato, entre outros, no revestimento das NPs tem se mostrado um eficiente método para as limitações citadas (WEI et al., 2010; REDDY, 2010). Os princípios de funcionamento destes polímeros são semelhantes, e baseiam-se na cobertura superficial das partículas, criando uma camada eletronicamente negativa que promove repulsão entre as partículas e com o solo, reduzindo assim o processo de aglomeração e aumentando sua migração no solo (HE; ZHAO, 2005, REDDY, 2010).

Reddy et al. (2014), num estudo para avaliar os efeitos da granulometria do solo no transporte de suspensões de nFeZ estabilizadas e não estabilizadas, concluíram que, independentemente do tamanho das partículas do solo, o uso de estabilizantes promove um melhor transporte das nanopartículas através dos vazios do solo.

Embora a eficácia da aplicação de nFeZ tenha sido comprovada, seus efeitos para a microbiota local ainda não são totalmente conhecidos. Isso dificulta a tomada de decisão por agências que regulam sua aplicação para remediação de solo, de modo que sua aplicabilidade depende das políticas vigentes em cada país (CECCHIN et al., 2016).

Mesmo com a capacidade de se adaptar a condições extremas, os microrganismos do solo desempenham um papel crucial na degradação de compostos orgânicos e metais tóxicos (BOKARE et al., 2012), e por isso o entendimento dos processos microbianos na presença de nanomateriais precisa ser entendido para a aplicabilidade desta técnica de remediação.

As vias de exposição, organismos expostos, dose e potencial de bioacumulação são considerados parâmetros relevantes para avaliação da exposição de nFeZ. Toda a microbiota, incluindo a subsuperficial como bactérias, protozoários, fungos, algas, podem ser expostas, desde a região de injeção até pontos mais distantes, considerando os inúmeros mecanismos de mobilidade implementados nas nanopartículas visando atingir contaminações mais profundas.

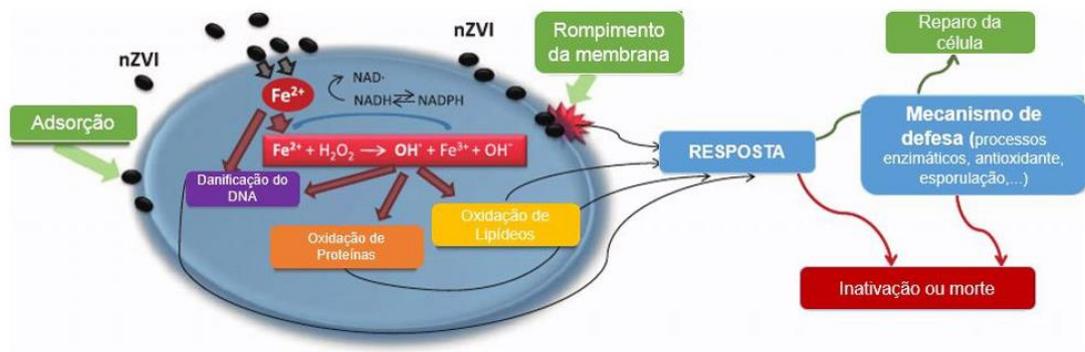
De acordo com Cecchin et al. (2016), o efeito tóxico do nanoferro se relaciona com fatores como geoquímica local, mineralogia, microbiota, substratos, entre outras condições. Por

exemplo, estudos mostraram que a degradação do nanoferro pode funcionar como bioestimulante para alguns tipos de bactérias que utilizam nFeZ como doador de elétrons (LIU; LOWRY, 2006). Já Lefreve et al. (2016) sugerem que a o contato direto das nanopartículas com a célula pode romper a parede celular e danificá-la, como apresentado na Figura 3. Segundo Lee et al. (2008), o poder de redução do nFeZ pode desnaturar lipopolissacarídeos, assim como as proteínas de transporte iônico, prejudicando assim a permeabilidade da membrana e facilitando a entrada de Fe^{2+} na célula. Uma vez dentro da célula, o Fe^{2+} pode reagir com o peróxido de hidrogênio produzido pelas mitocôndrias, formando espécies reativas de oxigênio, promovendo estresse oxidativo e morte celular.

O revestimento das nanopartículas com polímeros orgânicos pode ser oportuno a microbiota do solo. Alguns estudos mostraram que o revestimento pode funcionar como um bioestimulante para os microrganismos nativos do solo, favorecendo tratamentos biológicos subsequentes, como atenuação natural ou biorremediação.

Neste caso, a nanorremediação de compostos tóxicos, presentes em elevadas concentrações no solo, pode ser favorável à posterior metabolização dos microrganismos, uma vez que reduzirá as concentrações iniciais a níveis convenientes à aplicação de biorremediação no local.

Figura 3 - Mecanismo de Toxicidade do nanoferro.



2.6.2 Biorremediação de clorofenóis

A Biorremediação é uma técnica que utiliza microrganismos para controlar e destruir poluentes a uma concentração a níveis aceitáveis. É uma alternativa tecnológica atrativa, não apenas pelo baixo custo, mas também pela possibilidade de se obter a completa degradação de contaminantes. Por se tratar de processos biológicos, a biorremediação constitui uma tecnologia eficiente do ponto de vista ambiental (BALLAMINUT, 2007).

Chen et al. (2015) consideram a biorremediação de solos contaminados com pesticidas e clorofenóis de grande interesse. O processo de compostagem com palha, por exemplo, foi capaz de reduzir mais de 90% de clorofenol do solo (LAINE; JORGENSEN, 1997).

A capacidade dos microrganismos de utilizar pesticidas como fonte de nutrientes pode os transformar através de reações catalisadas por suas enzimas resultando em modificações na estrutura química e potencial tóxico destes compostos (GAVRILESCU, 2005). Os microrganismos são adaptáveis a condições adversas e mesmo em ambientes desfavoráveis, podem se desenvolver (KUMAR et al., 2011), tornando-se potenciais biodegradadores e auxiliando na redução dos efeitos adversos causados pelos contaminantes ao meio ambiente (CEA et al., 2010).

Vryzas et al. (2012) consideram a degradação biológica através da atividade de microrganismos o principal processo que conduz à dissipação de pesticidas no solo.

A retirada dos cloros das moléculas, que diminui a toxicidade destes compostos, pode ser feita através da descloração redutiva, que se dá pela transferência de elétrons induzida pela respiração anaeróbia, no qual os poluentes orgânicos clorados servem como aceptores de elétrons (PAYNE et al., 2011).

Os três modelos de metabolismo mais relevantes na desalogenação de organoclorados foram introduzidos por El Fantroussi, Naveau e Agathos (1998 apud BRUCHA 2007). São eles:

- a) Via metabolismo central: o composto é a única fonte de carbono e energia para a célula e é usual quando os substratos são hidrocarbonetos simples (C1 e C2) clorados;
- b) Via co-metabolismo: se refere a um conjunto de reações que resultam na modificação acidental do organoclorado por enzimas e cofatores que normalmente catalisam outras reações do metabolismo microbiano; nesse caso, a transformação não é energeticamente útil para a célula e, portanto, outros doadores de elétrons e/ou aceptores de elétrons exercerão essa função. Por essa via, o composto é transformado ainda que o organismo seja incapaz de o utilizar em seus mecanismos energéticos;
- c) Via halorespiração: processo pelo qual compostos halogenados são utilizados como aceptores de elétrons em reações exergônicas de desalogenação, com a consequente conservação de energia para o crescimento celular; ao contrário do que acontece no co-metabolismo, a desalogenação nesses organismos é

catalisada por enzimas com grande afinidade pelo substrato e elevada especificidade.

Segundo Larsen et al., (1991), os metabólitos mais comuns formados durante a desalogenação do PCF são 2,3,4,5-TeCP, o 3,4,5-TCP, o 3,5-DCP e o 3-CP.

Chen et al. (2012) e Li et al. (2013), constataram que a cinética de transformação de PCF era geralmente sigmoideal, consistindo de um atraso inicial seguido por uma transformação relativamente rápida e então a fase estacionária. Os estudos de Mahmood et al. (2005) indicaram que as mudanças na comunidade resultaram no crescimento ou morte bacteriana, sendo que os microrganismos nativos desempenharam papel importante na descloração dos organoclorados.

Estudos demonstram que componentes da matéria orgânica do solo são favoráveis à descloração de PCF pois funcionam como mediadores de elétrons para reações de redução microbiana e esta função tem sido estudada extensivamente (ZHANG et al., 2015).

As substâncias húmicas estão presentes no solo através da matéria orgânica natural e contêm substâncias orgânicas heterogêneas em diferentes fases de decomposição como plantas, animais e biomassa (SEMENOV et al., 2013). A fração das substâncias húmicas que são insolúveis em água a qualquer pH, é capaz de doar elétrons para as reações responsáveis pela descloração redutiva microbiana de PCF (ZHANG e KATAYAMA, 2012).

Bosso e Cristinzio (2014) consideram a *Desulfitobacterium sp* uma das bactérias do solo mais conhecidas para transformação de PCF em 3-clorofenol em condições anaeróbias. No entanto os microrganismos do solo que possuem capacidade de degradar PCF ainda são pouco explorados.

Yoshida et al. (2007) avaliaram a transformação de PCF em fenol através de uma comunidade bacteriana e concluíram que a principal espécie nesta comunidade era a *Clostridium*, uma típica bactéria presente em solos com altos teores de ferro. Já Cea et al. (2010) apontaram que bactérias do filo Proteobacterias foram dominantes durante a biodegradação de PCF. Desta forma, a relação entre bactérias redutoras de ferro (III) e a transformação anaeróbia de poluentes orgânicos tem chamado atenção.

Tong et al. (2014) descobriram que membros da família *Veillonellaceae* e *Peptococcaceae*, que contêm muitas espécies redutoras de Fe (III) e gêneros bacterianos desalogenantes, respectivamente, foram os grupos predominantes na transformação da PCF em solo inundado. As bactérias redutoras de Fe (III), tais como *Geobacter sp.* e *Shewanella sp.*, podem reduzir Fe (III) para Fe (II).

Desta forma, as espécies Fe (II) geradas podem atuar indiretamente como redutores importantes para a biodegradação de pesticidas organoclorados no solo (BORCH et al., 2010), já as bactérias de descloração, como *Dehalobacter sp* e *Desulfito bacterium sp.*, podem reduzir pesticidas organoclorados diretamente (Li et al., 2013).

Segundo Chen et al. (2016), as bactérias redutivas de Fe (III) e as de descloração podem funcionar indiretamente para a transformação de PCF. Desta forma, comunidades microbianas do solo e bactérias específicas com potenciais capacidades de descloração, e a redução de Fe (III) desempenham papéis importantes na transformação de PCF.

Chen et al. (2016) concluíram que em 10 dias o PCF foi completamente biotransformado por uma comunidade bacteriana composta predominantemente por *Veillonellaceae* e *Clostridium*. Além disso, as bactérias de descloração, incluindo *Geobacter sp.*, *Shewanella sp.* e *Dehalobacter sp.*, também desempenharam papéis críticos na transformação de PCF. Os autores também introduziram lactato ao meio, que funcionou como fonte de carbono nos processos de degradação do PCF.

Desta forma, a literatura aponta a biodegradação como uma alternativa importante para a remediação de áreas contaminadas com organoclorados. Este processo pode ser acelerado pela presença de substâncias húmicas no solo que funcionam como mediadores de elétrons para a descloração redutiva, mecanismo pelo qual os microrganismos promovem a transformação do cloro presente na molécula (ZHANG; KATAYAMA, 2012). As bactérias de descloração podem agir diretamente neste processo, já as bactérias redutoras de ferro ao formarem o ferro (II) propiciam redução indireta do PCF, pois neste estado de oxidação ele é considerado um potencial doador de elétrons. Esses fatores, associados à capacidade de adaptação dos microrganismos tornam, esta técnica uma promissora maneira de recuperar solos contaminados com PCF.

2.6.3 Técnicas sequenciais de remediação: nanobiorremediação

Nos últimos anos, uma nova abordagem em relação a processos de remediação foi proposta por alguns pesquisadores, que envolve a aplicação sequencial ou concomitante de duas ou mais técnicas. De acordo com Singh et al. (2013), esse tipo de tratamento geralmente envolve processos químicos e biológicos visando a remoção completa dos contaminantes do solo.

Um exemplo desta tecnologia é a nanobiorremediação, que segundo Checchin et al., (2016) trata-se da utilização de nanopartículas de ferro de valência zero seguido da técnica de biorremediação para degradar contaminantes presentes no solo.

A nanorremediação é considerada um processo tecnológico e rápido, capaz de tratar altas concentrações de contaminantes presentes no solo, mas seu alto custo desfavorece o processo. Já a biorremediação tem baixo custo mas ocorre com taxas de velocidades menores. Desta forma, tais propriedades se utilizadas em conjunto podem ser consideradas uma solução viável para remediação *in situ*.

A literatura já descreve alguns casos que utilizaram a nanobiorremediação para tratar solo contaminado. Bokare et al. (2010) relataram a transformação de Triclosan em compostos não tóxicos por uma integração sequencial de nanoferro com tratamento biológico. Kim et al. (2012) empregaram com sucesso nFeZ e bactérias degradantes no tratamento de solo contaminado com éter difenílico.

Le et al., (2015) observaram uma alta eficiência de descloração usando uma combinação de tratamento químico e biológico, e consideraram a estratégia vantajosa pela redução do período de remediação, se comparado com o processo biológico isoladamente.

Para compostos clorados, a primeira fase, o nFeZ através da descloração redutora, os transforma em compostos intermediários e produtos finais não tóxicos ou de baixa toxicidade (KOENING et al., 2016), de modo que sejam mais facilmente metabolizadas pelos microrganismos.

No entanto, a toxicidade dos contaminantes pode prejudicar a microbiota do solo, resultando em processos lentos de degradação. Nestes casos, uma combinação de injeção de nFeZ e estimulação do metabolismo microbiano pode ser considerada uma solução potencial. Assim, o processo redutivo do nFeZ reduziria concentrações mais altas e o estimulante microbiano favoreceria as condições para a degradação via descloração redutiva.

3 METODOLOGIA

3.1 SOLO

O solo utilizado neste experimento é classificado pedologicamente como Latossolo Vermelho Distrófico Húmico (STRECK et al., 2008) e foi coletado no horizonte B (1,2 metros de profundidade) do Campo experimental de Geotecnia da Universidade de Passo Fundo.

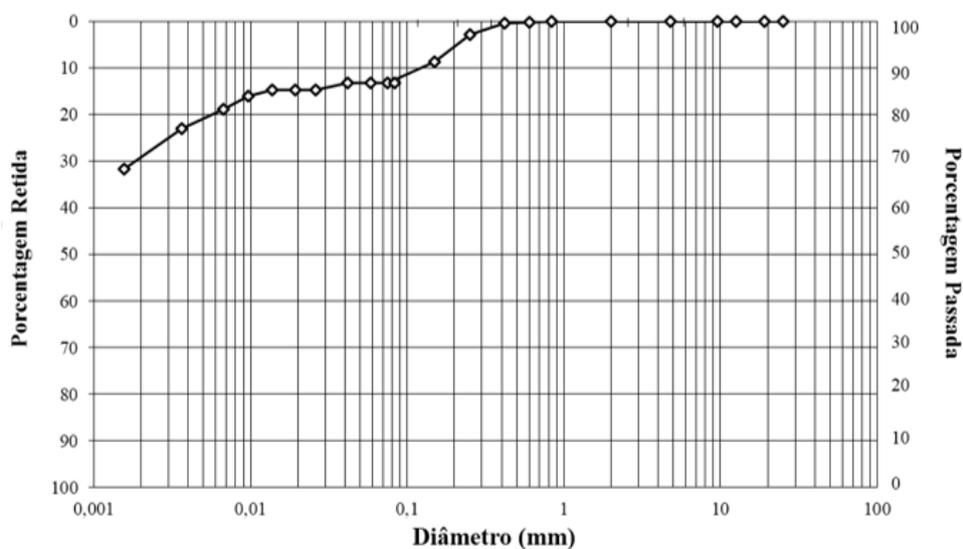
A caracterização do solo foi realizada de acordo com as normas em vigor. Já a caracterização físico-química seguiu a metodologia proposta por Tedesco et al. (1992). A Tabela 2 apresenta as principais características do solo em estudo e a Figura 4 apresenta a curva granulométrica do solo.

Tabela 2 - Características do solo.

Parâmetro	Valor
Argila (%)	72
Silte (%)	15
Areia (%)	13
Limite de Liquidez (%)	53,0
Limite de Plasticidade (%)	42,0
Peso Específico das Partículas (kN/m ³)	26,7
Índice de Vazios	1,19
Peso Especifico Natural (kN/m ³)	16,3
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,1
Matéria Orgânica (%)	< 0,8
Condutividade Hidráulica (cm/s)	1,39 x10 ⁻³
Fósforo (mg/dm ³)	0,7
Potássio (mg/dm ³)	23
Alumínio (cmolc/dm ³)	2,7
Cálcio (cmolc/dm ³)	1,1
Magnésio (cmolc/dm ³)	0,7
H+Al (cmolc/dm ³)	10,9
CTC (cmolc/dm ³)	12,7
Saturação de Bases (%)	15
Saturação de Alumínio (%)	60

Fonte: Thomé et al., (2017)

Figura 4 - Curva Granulométrica do solo em estudo.



Fonte: Thomé et al., (2017)

3.2 REAGENTES

A nanorremediação foi executada com nanoferro comercial *Nanofer Star* estabilizado, produzido pela empresa NANO IRON, s.r.o. A ativação ou quebra dos grumos, foi realizada no desruptor de partículas (ultrassom). A Tabela 3 apresenta as características do nanoferro em pó.

Tabela 3 - Composição do nanoferro em pó.

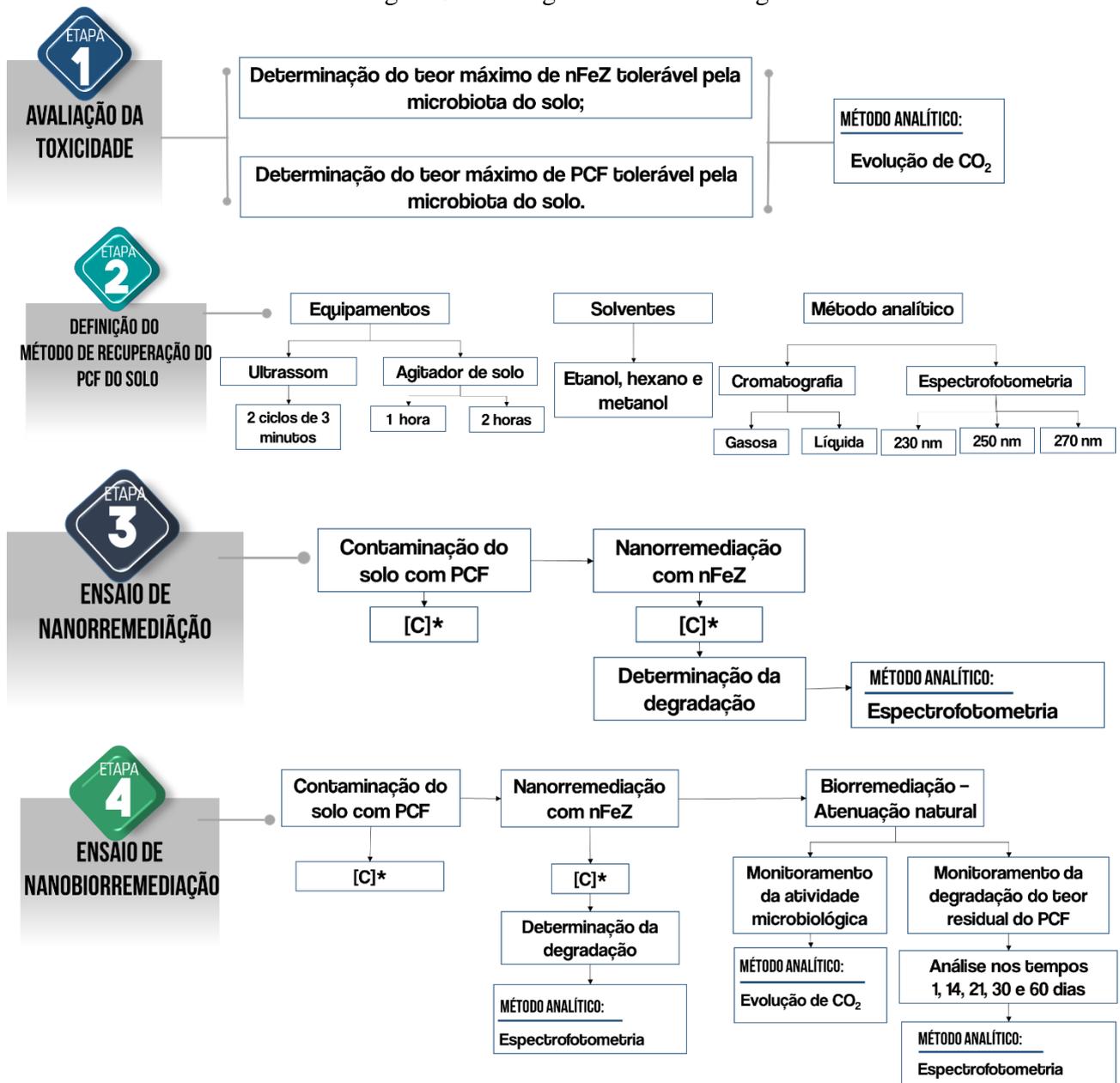
NanoFer Star	
Composição	Conteúdo em massa (%)
Ferro (Fe)	65 a 80
Magnetita(Fe_3O_4) e óxido de ferro	20 a 30

O pentaclorofenol (97%) utilizado é fabricado pela *SIGMA-ALDRICH*[®] sendo um sólido cristalino branco. As concentrações utilizadas neste trabalho foram diluídas a partir deste reagente padrão. O manuseio deste composto exigiu a utilização de equipamentos de proteção como máscara semi-facial com filtro de carvão ativo e luvas nitrílicas.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental deste trabalho está apresentado na Figura 5 e seguirá a seguinte sequência: Verificação da concentração tóxica de nFeZ e PCF aos microrganismos; Definição do método que proporcione a maior eficiência de recuperação do PCF do solo; Definição da concentração necessária de nanoferro para a degradação do PCF e por fim, o ensaio final de nanobiorremediação de solo contaminado com PCF.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia.



[C]* Concentrações definidas em ensaios da Etapa 1.

3.3.1 Contaminação do solo com PCF

O processo de contaminação do solo com PCF foi realizado utilizando EPI's e seguiu o método adotado na literatura (DARKO-KAGYA et al., 2010; WANG et al., 2010; CAO et al., 2015). O PCF era pesado e solubilizado em um volume de hexano e então conduzido ao agitador magnético. Neste equipamento a mistura ocorria através do movimento de uma barra magnética até que houvesse o completo desaparecimento dos sólidos.

O hexano com a concentração desejada de PCF era então misturado ao solo e levado a capela. Esta mistura permanecia nestas condições por cerca de 48 horas até a completa volatilização do hexano.

3.3.2 Teores limite de toxicidade para os microrganismos do solo

3.3.2.1 Toxicidade do nFeZ

Considerando que parte da degradação do PCF deve ser realizada pelos microrganismos, estes devem ser mantidos preservados durante o experimento. Concentrações de nFeZ de 4, 15 e 50g/kg, foram testadas no solo para avaliar sua influência na microbiota ali presente. Para isto utilizou-se a metodologia de respirometria, adaptado do método respirométrico de Bartha descrito pela NBR – 14.283.

Estas concentrações foram definidas de acordo com resultados obtidos em ensaios anteriores. Tais estudos demonstraram que concentrações de 4 e 15 g/kg de nFeZ não influenciaram na permeabilidade natural do solo. Já a concentração de 50 g/kg foi utilizada por apresentar boa eficiência na degradação de contaminantes, anteriormente avaliados.

As amostras de solo contendo diferentes concentrações de nFeZ foram inseridas nos respirômetros, através dos quais foi possível determinar a produção de dióxido de carbono (CO₂) oriunda da atividade microbiana. Além do branco (respirômetro vazio para quantificar o CO₂ existente no interior dos frascos), analisou-se o Controle, no qual não foi inserido nFeZ, contendo apenas solo e água.

É importante ressaltar que como fonte de carbono aos microrganismos foi inserida glicose, no teor de 1% em todas amostras.

Tabela 4 - Concentrações de nanoferro a serem avaliadas.

Concentração de nFeZ (g/kg de solo)
Branco
Controle
4
15
50

As análises foram realizadas a cada 48 horas e durante este período os respirômetros foram mantidos em igual condição e isolados da luz e do calor. A Figura 6 apresenta o experimento montado.

Figura 6 - Respirômetros para análise da toxicidade do nFeZ.



3.3.2.2 Toxicidade do PCF

A avaliação da toxicidade do PCF foi realizada utilizando a metodologia descrita na norma NBR – 14.283 de respirometria, apresentada no item 3.3.2.1 deste trabalho. As concentrações de PCF utilizadas neste experimento estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de PCF a serem testadas.

PCF (mg/kg)	Relação contaminante/padrão de referência
Branco	-
Controle	-
Controle H	-
3	1
10	3,33
20	6,66
50	16
150	50

A amostra Branco refere-se aos respirômetros vazios, para fins de análise da concentração de CO₂ existente no interior dos frascos. As amostras de Controle são os respirômetros contendo solo e água para o ajuste da umidade. Os respirômetros de Controles H são respirômetros preenchidos com solo e hexano e tiveram a função de testar se este solvente utilizado no processo de contaminação do solo interfere na atividade microbiana.

As concentrações de PCF de 10 e 20 mg/kg foram definidas seguindo os experimentos de Xu et al. (2014), que avaliaram a degradação de PCF através da bioestimulação. Neste trabalho, concluiu-se que concentrações acima destes valores influenciaram na atividade microbiológica. Já a concentração de 150 mg/kg foi testada por Yang e Lee (2008) e de acordo com os autores representava a contaminação real do lençol freático estudado.

O valor de referência adotado como comparativo neste planejamento, especifica o teor de PCF admitido para áreas industriais de 3 mg/kg de solo, estabelecido pela Resolução 420/2009 do CONAMA.

Em função do baixo acúmulo de CO₂ gerado pela influência tóxica do contaminante em todas as unidades experimentais, no tempo 39 dias de experimento foi adicionado glicose como fonte de carbono complementar aos microrganismos, no teor de 1%. As análises, que eram realizadas a cada 48 horas, seguiram por mais 32 dias, totalizando um tempo de 68 dias de experimento. A Figura 7 mostra o experimento preparado.

Figura 7 - Experimento de toxicidade do PCF.



3.3.3 Processo de recuperação do PCF do solo

Como os métodos variam muito entre si e o tipo de solo usado atua como um interferente neste processo, foram realizados testes de recuperação do PCF do solo, variando diferentes fatores como demonstrado na Etapa 2 da Figura 5.

Os testes de recuperação foram realizados seguindo os métodos descritos no Quadro 1, cujos procedimentos foram adaptados às condições disponíveis no laboratório.

Para todos os experimentos o solo foi contaminado com PCF nas concentrações de 20 a 150 mg/kg. A concentração de 20 mg/kg foi escolhida por ter apresentado, em ensaio preliminar de toxicidade, potencial para ser utilizada no ensaio final de nanobiorremediação. Já as concentrações mais altas foram utilizadas por serem próximas ao limite máximo avaliado nos ensaios de toxicidade e representarem uma concentração de ocorrência real de PCF. Cabe ressaltar que procedimentos de controle sempre foram seguidos a fim de reduzir erros analíticos, como por exemplo, submersão da vidraria utilizada por 24 horas no HCl (20%), pesagens em balança analítica, calibração de micropipetas entre outros.

3.3.3.1 Equipamentos

Os testes de recuperação foram realizados utilizando o Desruptor/sonicador ultrassônico (ultrassom) e o agitador de solo, com dois níveis de concentração de PCF. A Tabela 6 apresenta os fatores e níveis investigados neste experimento.

Tabela 6 – Planejamento fatorial.

Fatores	Níveis	
Equipamento	Ultrassom	Agitador de solo
Concentração de PCF	20 mg/kg	150 mg/kg

O ultrassom está apresentado na Figura 8 e é do modelo QR750- Ultronique, fabricado pela empresa Eco-Sonics. Já a Figura 9 e 10 apresentam o agitador para análise física do solo utilizado, do modelo TE-161 que foi produzido pela empresa *TECNAL*.

Figura 8 - Ultrassom utilizado nos experimentos.



Figura 9 - Agitador de solo utilizado.



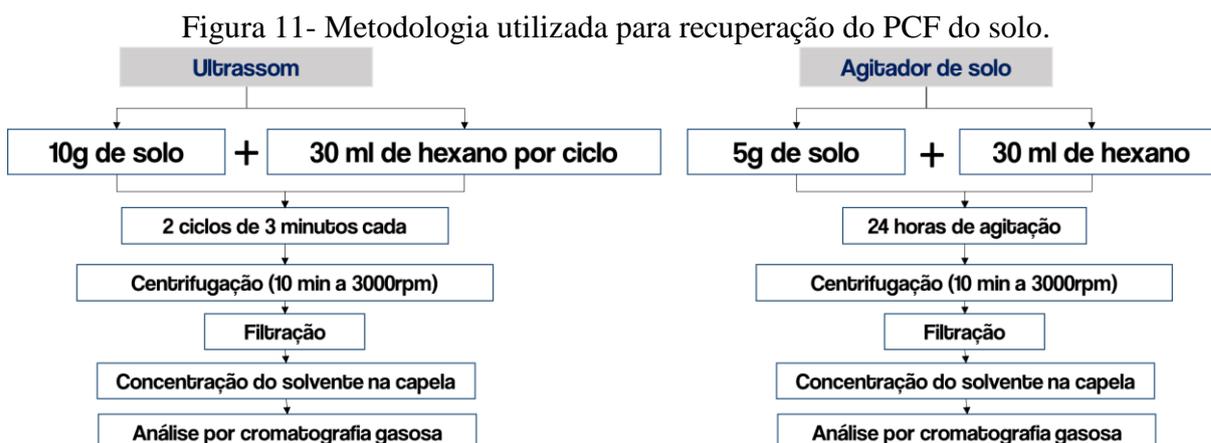
Figura 10 - Detalhe das gavetas do agitador de solo.



Para análise em ultrassom, o solo contaminado com PCF foi misturado com 30 ml de hexano e submetido a dois ciclos de 3 minutos cada. O hexano utilizado era coletado e reservado

e novamente o processo se repetia, de modo que mais 30 ml do solvente foram misturados ao mesmo solo e exposto ao segundo ciclo no ultrassom. As amostras de hexano e solo eram centrifugadas e filtradas com membrana Millipore 0,45 μ m. A fase líquida era concentrada, através da volatilização do hexano na capela, para posterior análise.

O teste de recuperação por agitação foi realizado através da mistura de hexano e solo contaminado com PCF. O solo e o solvente, nas quantidades informadas na Figura 11 foram inseridos em vials de 50ml, e dispostos nos reatores das gavetas do agitador de solo em uma velocidade de 29 r.p.m.. Após as 24 horas de agitação, o solo foi separado do hexano através da centrifugação e filtração para posterior concentração através da volatilização na capela. Após este processo, a amostra era analisada por cromatografia gasosa seguindo as especificações cromatográficas apresentadas no item 3.3.3.3.1. A Figura 11 apresenta os procedimentos seguidos.



3.3.3.2 Solventes

Em função da variabilidade na literatura devido à interferência do tipo do solvente utilizado, foram realizados testes com solventes puros e combinados, todos em grau de pureza para análise cromatográfica. A Tabela 7 apresenta a solubilidade do PCF nos diferentes solventes utilizados neste experimento de acordo com Royal Society of Chemistry (1989).

Tabela 7 - Solubilidade do PCF nos solventes utilizados.

Composto	Solubilidade (g/l)
Etanol	1200
Hexano	1000
Metanol	1800

O experimento seguiu o planejamento fatorial apresentado na Tabela 8, e foi realizado como mostrado no fluxograma da Figura 12 e 13.

Tabela 8 - Planejamento fatorial testado.

Fatores	Níveis	
Solventes	Etanol/Água	Metanol
Concentração de PCF	20 mg/kg	150 mg/kg
Relação solo/solvente (g:ml)	1:20	1:5

Figura 12 - Realização do experimento utilizando Etanol/Água.

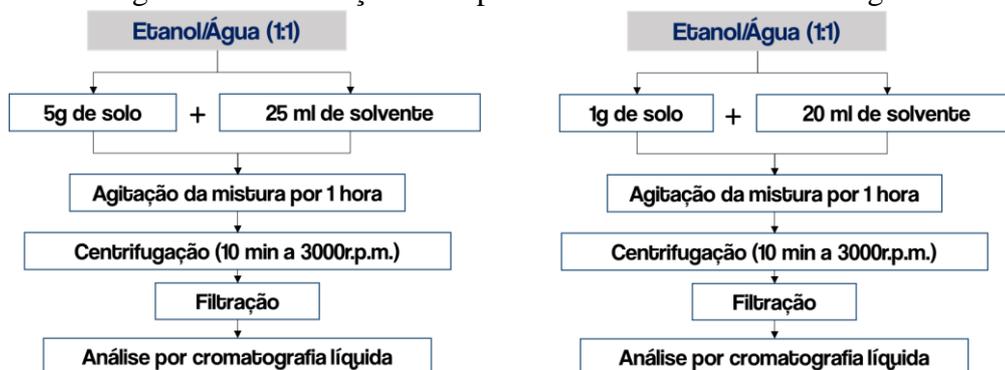
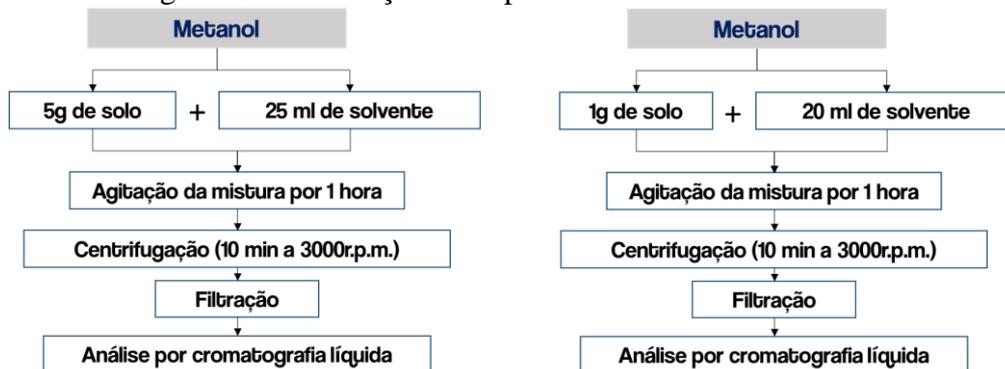


Figura 13 - Realização do experimento utilizando Metanol.



Estes testes foram realizados utilizando o agitador de solo, de modo que a mistura ficou neste equipamento durante 1 hora a uma rotação de 29 r.p.m.. Além do tipo e volume de solvente, a massa de solo contaminado também foi variada em 1 e 5 gramas.

Como demonstrado na Figura 12, a mistura de etanol/água foi fracionada, utilizando-se 12,5 ml de água e 12,5 ml de etanol para 5 gramas de solo. Para a massa de solo 1 grama, utilizou-se 10ml de etanol e 10 ml de água. A mistura de solvente e solo contaminado foi

agitada e centrifugada por 10min a 3000r.p.m. O solvente sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore e analisado por cromatografia líquida.

3.3.3.3 Método Analítico

3.3.3.3.1 Cromatografia

As análises de concentração de PCF foram feitas através de cromatografia gasosa (GC) e líquida (LC). As características técnicas dos equipamentos utilizados estão descritas abaixo.

GC: *Cromatógrafo Gasoso Clarus® 680* da marca *PerkinElmer*, acoplado a um espectrômetro de massa com Coluna Rtx®-5MS composta por 5% Difenil e 95% Dimetil Polisiloxano (30m x 0.25mm x 0,25µm). O gás de arraste utilizado é o hélio com fluxo de 1,0 ml min⁻¹. A temperatura de operação foi de 260 °C no injetor. O programa de temperatura da coluna foi de 200 °C com aquecimento de 5 °C por minuto até atingir 320°C.

LC: *Cromatógrafo líquido com espectrômetro de massa LC 8040* da marca *Shimadzu*, com amostrador Nexera; coluna analítica XR-ODS III (150 x 2,0 mm x 2,2 µm); Fase móvel A: metanol, Fase móvel B: Hexano, Fase móvel C: etanol, vazão da fase móvel: 0,3 ml/min; O PCF foi analisado com comprimento de onda 270nm.

Os cromatógrafos estão dispostos no Laboratório de Cromatografia do prédio L1 Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. A curva de calibração de PCF foi conduzida pela equipe responsável pelo equipamento, utilizando padrão de pentaclorofenol 5000µg/ml de metanol, fabricado pela marca *Sigma-aldrich*.

3.3.3.3.2 Espectrofotometria

Seguindo a metodologia de Alves (1998), foram realizadas leituras de concentração de PCF em espectrofotômetro por luz UV. O equipamento utilizado, da marca PRO-TOOLS, modelo UV-1600 está apresentado na Figura 14.

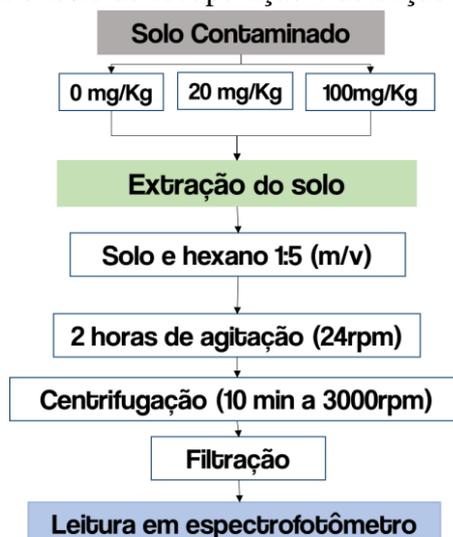
Figura 14 - Espectrofotômetro utilizado.



As leituras foram realizadas utilizando a cubeta de quartzo em diferentes comprimentos de onda. Para analisar o comprimento de onda (λ), uma varredura em 230 nm, 250 nm e 270 nm foi realizada. As curvas de calibração foram realizadas através da diluição das soluções de PCF em metanol.

Após a realização das curvas foram realizados testes de recuperação de PCF do solo, a fim de analisar o método analítico. Utilizou-se concentrações de 0, 20 e 100 mg/kg de PCF. A amostra sem contaminação foi utilizada como branco neste experimento e teve a finalidade de estabelecer valores de absorvância dos demais componentes extraídos do solo que não fossem o PCF. A Figura 15 apresenta a metodologia utilizada para este teste.

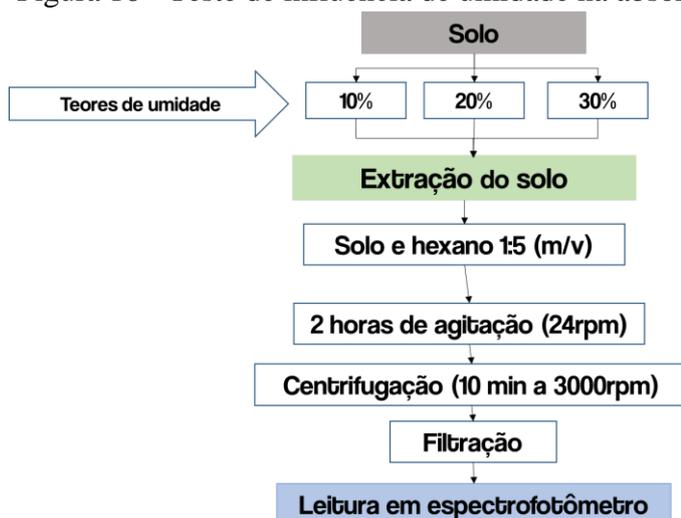
Figura 15 - Metodologia para o teste de recuperação e detecção em espectrofotômetro.



Além do comprimento de onda, foi avaliada a interferência da umidade do solo no valor de absorvância medida. Para isso, foram estabelecidos controles, de modo que solo sem

contaminação de PCF em três teores de umidade foram submetidos a recuperação e leitura de absorvância como mostrado no fluxograma da Figura 16. Estes valores de umidade foram escolhidos por serem próximos ao teor natural existente no solo, o qual será utilizado nos ensaios deste trabalho.

Figura 16 - Teste de influência de umidade na absorvância.



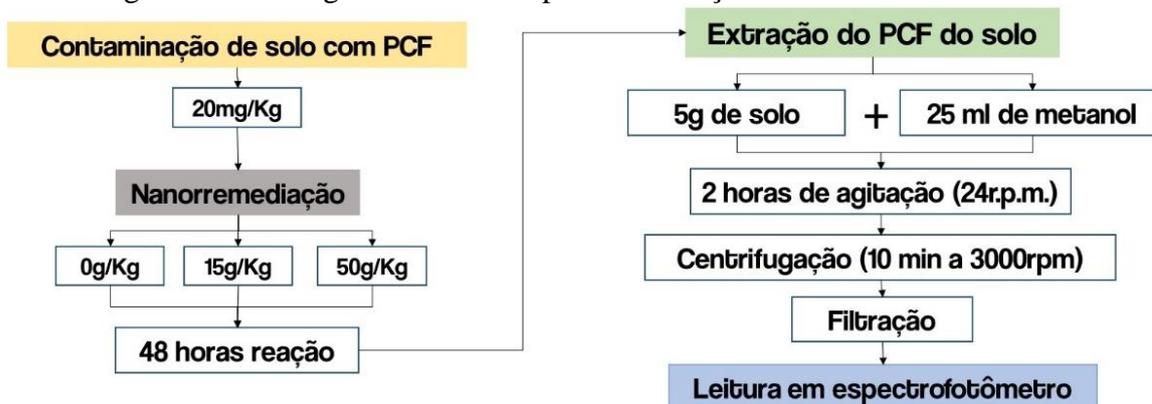
3.3.4 Nanorremediação utilizando nFeZ

A fim de definir concentrações a serem utilizadas no ensaio final de nanobiorremediação, foram realizados testes de eficiência de degradação do PCF no solo utilizando nFeZ. Assim, pode-se determinar o teor necessário de nFeZ para se chegar, através da degradação, na concentração de PCF que não teve efeito letal à microbiota do solo (definido no ensaio de toxicidade). A Tabela 9 apresenta o delineamento fatorial e a Figura 17 demonstra o fluxograma do ensaio em questão.

Tabela 9 - Planejamento fatorial do experimento.

Variáveis		Níveis	
Concentração de PCF		20 mg/kg	
Concentração de nFeZ	0g/L	15g/L	50g/L

Figura 17 - Fluxograma do ensaio para remediação do PCF utilizando nFeZ.



O solo contaminado na concentração de 20 mg/kg recebeu diferentes concentrações de nFeZ para avaliação da degradação do PCF. O nFeZ foi ativado no ultrassom, juntamente com o teor de água necessário para o ajuste de umidade do solo para 34% (considerada natural) e misturado ao solo contaminado. Após este processo, esta mistura foi mantida isolada do calor e luz por um período de 48 h para que houvessem reações de oxi-redução entre o contaminante e o agente redutor.

Passadas as 48 h de reação ocorreu o processo de recuperação do PCF do solo em todas as amostras. Para reduzir possíveis interferências nas leituras de absorbância, unidades experimentais com diferentes concentrações de nFeZ, porém sem adição de PCF foram executadas como controle. Assim, amostras com 15 g/kg de nFeZ foram utilizadas como branco para amostras que avaliaram a degradação do PCF utilizando 15 g/kg de nFeZ. O processo se repetiu para a concentração 50 g/kg de nFeZ.

Cabe lembrar que o preparo do solo contaminado com PCF envolve sua mistura com hexano. Assim, nesta etapa, no preparo da unidade experimental “Branco” (Solo sem adição de PCF e nFeZ também ocorreu a mistura com hexano (sem contaminação) para que suas condições experimentais não fossem diferentes em relação as unidades experimentais contendo PCF.

Com os resultados destes ensaios gerou-se o gráfico de degradação do PCF, plotando-se a concentração do PCF x Concentração de nFeZ utilizada. Através da equação desta reta, foi possível estimar a concentração necessária de nFeZ para atingir o valor de PCF que não possui efeito de letalidade para a microbiota do solo, definido no ensaio descrito no item 3.3.2.2. A Figura 18 apresenta o solo contaminado logo após a adição de nFeZ preparado para o período de reação.

Figura 18 - Ensaio de nanorremediação.



3.3.5 Nanobiorremediação

Este ensaio propôs-se a definir a biodegradação do teor de PCF restante no solo após a nanorremediação. As concentrações utilizadas nesta etapa foram determinadas através de ensaios preliminares como demonstrado no Quadro 2, já os valores empregados estão apresentados na Tabela 10, que apresenta o delineamento experimental deste ensaio.

Quadro 2 - Resultados utilizados para o ensaio de nanobiorremediação.

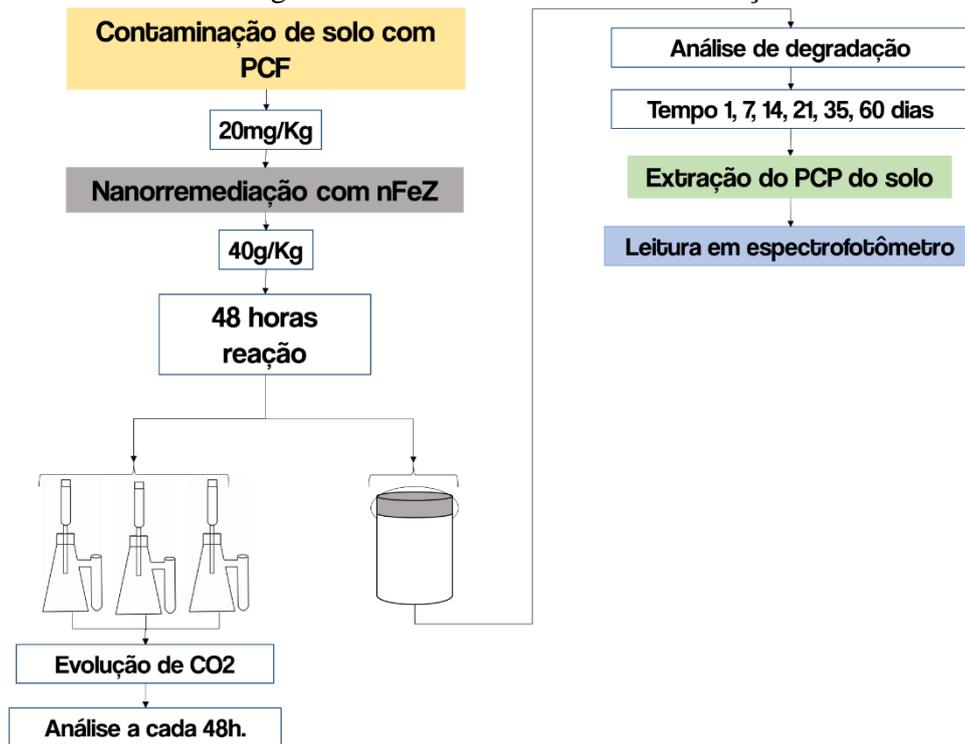
Dado	Método	Item	
Concentração de nFeZ	Toxicidade do nFeZ e Teste de nanorremediação	3.3.2.1	3.3.4
Concentração de PCF	Toxicidade do PCF	3.3.2.2	

Tabela 10 – Condições testadas no ensaio de nanobiorremediação.

Variável	Níveis	
Concentração de PCF	20 mg/kg	
Concentração de nFeZ	40 mg/kg	
Esterilização do solo	Sim	Não

O solo contaminado com 20 mg/kg de PCF foi misturado a uma suspensão de 40 mg/kg de nFeZ para a degradação do teor inicial. Esta mistura foi mantida isolada por 48 h para que ocorresse a nanorremediação do solo. Após este período, parte deste solo foi inserido em respirômetros e o restante permaneceu nas mesmas condições em um recipiente hermeticamente fechado para as análises de degradação, como demonstrado no fluxograma da Figura 19.

Figura 19 - Ensaio de nanobiorremediação.



O monitoramento da atividade microbiológica do solo seguiu a NBR 14283/1999, com leituras a cada 48 horas por um período de 35 dias. Concomitantemente a investigação do acúmulo de CO₂, ocorreram análises para quantificar a concentração restante de PCF no solo nos tempos de 1, 2, 7, 14, e 21 dias após a inserção do nFeZ no solo contaminado.

O mesmo procedimento apresentado na Figura 19 foi realizado para amostras com solo autoclavado. Sem a presença de microrganismos no solo, foi possível atribuir e quantificar a degradação resultante da adição de nFeZ e/ou da biodegradação do PCF. O solo foi autoclavado antes da contaminação com PCF, já que o hexano utilizado neste processo pode trazer riscos se autoclavado.

Além da amostra contaminada com PCF, analisou-se o Branco, que não possui contaminação, mas foi preparado nas mesmas condições das demais amostras e tem por função avaliar a influência das nanopartículas na absorbância. Assim, a absorbância gerada no Branco foi descontada das demais amostras. A Figura 20 apresenta os respirômetros utilizados para avaliação da biodegradação do PCF e a Figura 21 apresenta o solo para os testes de quantificação de degradação.

Figura 20 - Ensaio de biodegradação do PCF.



Figura 21 - Solo para análise de degradação.



3.3.6 Análise estatística

Os valores de concentração de PCF no solo foram submetidas a análise estatística na ferramenta ANOVA do software Statistica (STATSOFT, 1999). O nível de significância será fixado em 95%, de modo que os dados considerados significantes são aqueles que possuem um erro menor que 5%, ou seja, $p=0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

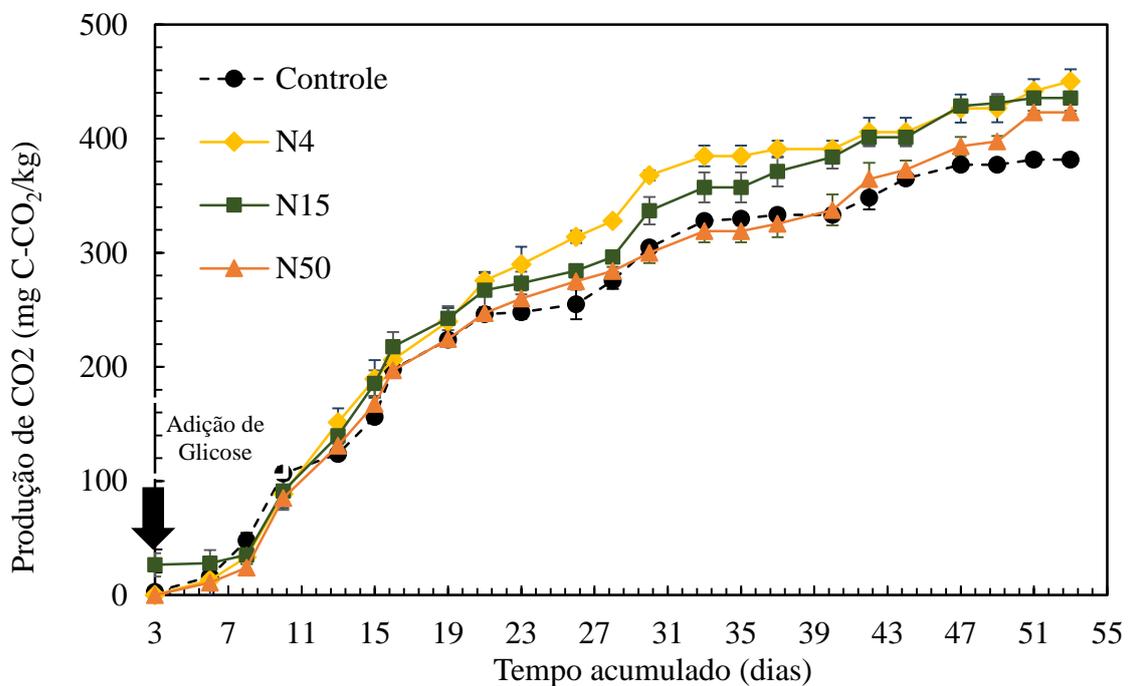
4.1 TEORES LIMITE DE TOXICIDADE PARA OS MICRORGANISMOS DO SOLO

4.1.1 Toxicidade do nFeZ

A produção de CO₂ neste experimento foi acompanhada por um período de 53 dias, tempo considerado necessário para a avaliação qualitativa da toxicidade do nFeZ para a microbiota do solo. A quantificação de CO₂ foi feita para amostras do branco, do controle e de diferentes concentrações de nFeZ, sendo elas 4, 15 e 50 g/kg (N4, N15 e N50, respectivamente), de modo que os tratamentos foram comparados ao solo sem adição de nFeZ (controle).

A Figura 22 apresenta o gráfico da produção de CO₂ analisada nesse experimento. Os pontos que compõem o gráfico representam a média de 3 repetições realizadas a fim de analisar a variabilidade dos dados. A dispersão estatística entre as médias da produção de CO₂ mostrou-se baixa e também está apresentada na Figura 22 através dos valores de desvio padrão.

Figura 22 - Acúmulo de CO₂ para diferentes concentrações de nanoferro.



As curvas de liberação de CO₂ para todas as amostras apresentam um aumento notável entre os dias 7 e 20, indicando condições propícias aos microrganismos neste período, após a fase de adaptação. Após este período é observada uma estabilização, gerada pela diminuição na

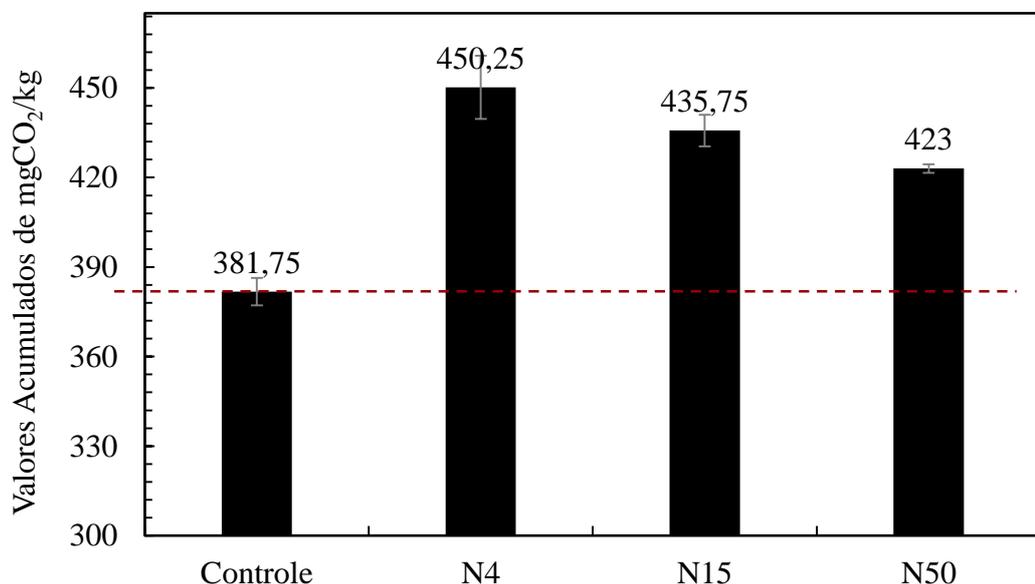
atividade, provavelmente em função do consumo dos nutrientes adicionados no início do experimento.

A incorporação de nFeZ ao solo promoveu uma maior liberação acumulada de CO₂ se comparada ao solo Controle. Este, por sua vez, apresenta uma liberação acumulada de CO₂ em torno de 380 mg C-CO₂/kg e esteve abaixo de todas as amostras. Os valores maiores de acúmulo de CO₂ foram para a amostra N4 e N15 durante todo o monitoramento.

Tais valores evidenciam uma atividade microbiológica intensa, com valores finais de acúmulo de CO₂ entre 400 e 500 mg C-CO₂/kg. Este comportamento está relacionado à adição de glicose nas amostras, que supriu as necessidades nutritivas de carbono e tornou o ambiente mais favorável à multiplicação das células.

Em relação à toxicidade, considerando que as curvas de liberação de CO₂ para todas as amostras contendo nFeZ estiveram acima ou muito próximas da curva de liberação de CO₂ do Controle, pode-se inferir que houve ausência de comportamento tóxico do nFeZ nas concentrações testadas. Esta ocorrência pode ser vista na Figura 23 que apresenta o valor acumulado de CO₂ para as amostras comparando-as com o Controle.

Figura 23 - Acúmulo total de CO₂ para as amostras.



A Figura 23 mostra com clareza a diferença de valores no acúmulo total de CO₂, evidenciando a maior produção nas amostras contendo nFeZ do que no Controle. Considerando que todas as unidades experimentais tiveram a adição de 1% de glicose, tudo indica que o nFeZ

atuou como estimulador da microbiota do solo. Este efeito pode ser corroborado pela existência de um revestimento orgânico sob as nanopartículas utilizadas no experimento.

Estudos apontam que a atividade microbiana pode se beneficiar da existência deste componente, utilizando-a como fonte de carbono e, desta forma, propiciando um maior desenvolvimento microbiano (KIM et al., 2009). Kirschling et al. (2010) apresentaram em seu estudo que a existência de um sistema de cobertura (*coating*) sobre as nano partículas de ferro zero valente, não apenas apresentou-se atóxico aos organismos teste, como também estimulou o desenvolvimento das populações bacterianas em uma ordem de grandeza.

Através dos valores de acúmulo de CO₂ analisados neste experimento, foi verificado que os microrganismos não são sensíveis aos teores de nanoferro testados, e que nestas condições, as nano partículas ainda podem favorecer a atividade microbiológica do solo em função do seu revestimento que serve como fonte de carbono.

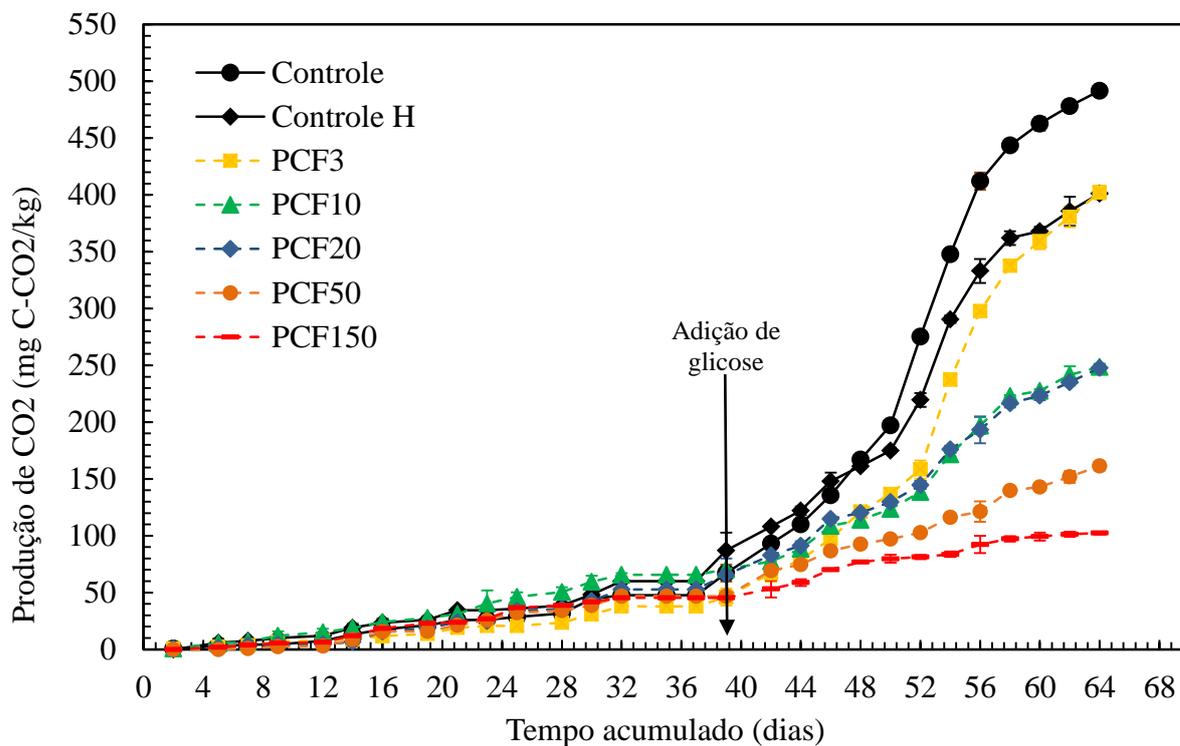
Desta forma, nenhuma das concentrações testadas neste experimento demonstrou efeito nocivo à microbiota do solo, podendo, portanto, serem utilizadas em ensaios de nanorremediação com posterior tratamento biológico.

4.1.2 Toxicidade do PCF

Para avaliação da influência do PCF na microbiota do solo foi utilizado ensaio de respirometria nas concentrações 3, 10, 20, 50 e 150 mg/kg, nomeados no gráfico como PCF3, PCF10, PCF20, PCF50 e PCF150, respectivamente. Além disso, foi avaliado o Branco (respirômetros vazios), Controle (respirômetros contendo solo e água) e Controle H (solo e hexano).

As análises ocorreram a cada 48 horas durante 68 dias. Neste período, os respirômetros permaneceram isolados da luz e calor a fim de eliminar variáveis como a fotodegradação do PCF. Os resultados de acúmulo de CO₂ estão apresentados na Figura 24, onde cada ponto representa uma média de 3 repetições, realizadas a fim de analisar a variabilidade dos dados. Esta, por sua vez, manteve-se baixa, como mostram os valores de desvio padrão entre as médias da produção de CO₂, também apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Acúmulo de CO₂ para diferentes concentrações no teste de toxicidade do PCF.



De acordo com a Figura 24, até o tempo 39 dias ocorreu uma baixa atividade microbiana, na faixa de 30 a 80 mg de CO₂/kg produzido. Após este período, a adição de 1% de glicose aos respirômetros gerou um incremento no acúmulo de CO₂ para todas as amostras, especialmente nas amostras Controle, Controle H, PCF3, PCF 10 e PCF20. Isso mostra que nessas concentrações, a presença de PCF exerceu influência, mas não danificou integralmente os microrganismos do solo, que ao receber nova fonte de carbono aumentaram suas atividades.

No que diz respeito às amostras sem contaminante, conforme a Figura 24, até o tempo 50 dias, o acúmulo de CO₂ para o controle com hexano (Controle H) esteve acima do Controle sem hexano (Controle). Neste caso, o hexano serviu como fonte de carbono aos microrganismos antes da adição da glicose e por isso gerou valor maior de acúmulo de CO₂. Isto revela que, nessa circunstância, tal solvente necessário no processo de contaminação do solo com PCF apresentou-se como um estímulo na produção de CO₂, gerando influência favorável aos microrganismos ali presentes. Como todas as demais amostras tiveram contato com hexano na contaminação com as diferentes concentrações de PCF, o Controle H foi considerado como referência neste experimento.

Quanto às amostras, no tempo 66 dias, a PCF3 atingiu o valor de acúmulo de CO₂ do Controle H. Este comportamento pode estar relacionado com a adaptação da microbiota do solo

com este teor de PCF no solo. Tal concentração é determinada pela legislação ambiental como valor máximo permitido para área agrícola, e neste caso demonstrou ter a sua característica tóxica anulada pela supressão de parte do PCF, realizada pela microbiota do solo.

Para as unidades experimentais PCF50 e PCF150 é possível notar uma influência tóxica de concentrações altas do contaminante na atividade microbiana, pois mesmo após a adição da fonte de carbono, os valores de acúmulo de CO₂ mantiveram-se em torno de 150 mg de CO₂/kg. Nesse âmbito, o baixo incremento na produção de CO₂ após o fornecimento de carbono de fácil acesso, demonstra que concentrações de 50 a 150 mg/kg de PCF podem causar a erradicação de parte da microbiota existente no solo. De acordo com Varela et al. 2017, os efeitos crônicos do PCF podem reduzir a diversidade da microbiota do solo, induzindo baixa atividade e acúmulo de CO₂ como consequência.

Em relação ao total de acúmulo de CO₂, a Figura 25 mostra os valores para as amostras, enquanto a Figura 26 apresenta a influência do PCF na atividade microbiana relacionada ao Controle H.

Figura 25 - Total acumulado de CO₂ para as amostras testadas.

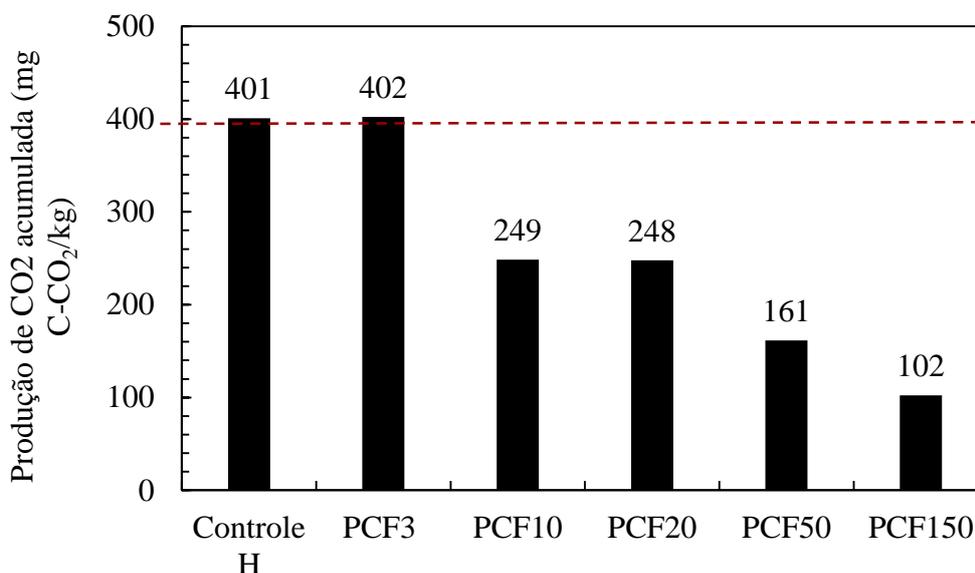
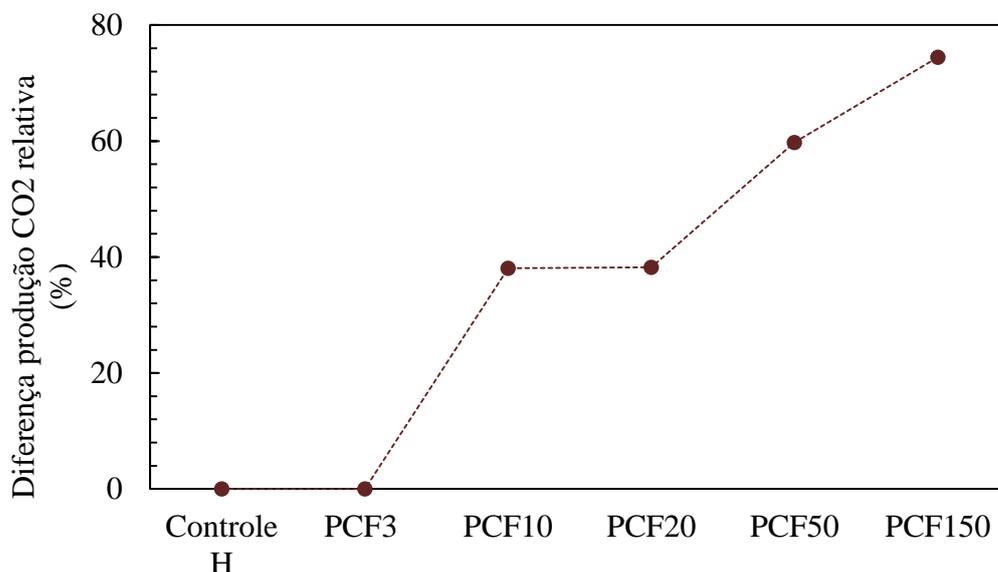


Figura 26 - Influência das concentrações de PCF em relação ao Controle H.



Como mostrado na Figura 25, percebe-se que o PCF 3 teve um valor total de acúmulo de CO₂ muito próximo ao controle, demonstrando baixa influência durante os 68 dias analisados. Se comparado ao controle H, esta diferença representa menos de 1% e está exposta na Figura 26, reforçando a hipótese de que a concentração máxima permitida na legislação para área agrícola não exerce forte influência na microbiota do solo.

As unidades experimentais PCF10 e PCF20 apresentaram um comportamento semelhante, com valores de acúmulo de CO₂ muito próximos, como mostra a Figura 25. Em relação à queda no acúmulo de CO₂ quando comparado ao Controle H, o valor para ambas foi em torno de 40%, demonstrando uma dificuldade de adaptação dos microrganismos nestas concentrações de PCF. Mesmo com esta influência nociva apresentada pela Figura 26, não foi constatado toxicidade suficiente para danificar por completo a microbiota existente no solo, de modo que as amostras ainda assim apresentaram atividade microbiológica.

Já as concentrações de 50 e 150 mg/kg de PCF, aqui expressa como PCF50 e PCF150 promoveram uma queda de mais de 60% nos valores de acúmulo de CO₂ se comparadas ao Controle H, demonstrando uma alteração considerável no sistema natural. Neste caso, a presença do PCF nestas concentrações não permitiu a adaptação dos microrganismos e, portanto, não serão utilizadas no ensaio de nanobiorremediação.

Para a nanobiorremediação, etapa final deste trabalho, o valor da concentração inicial de PCF a ser utilizada deve ser de 20 mg/kg, pretendendo-se a chegar, através da aplicação de

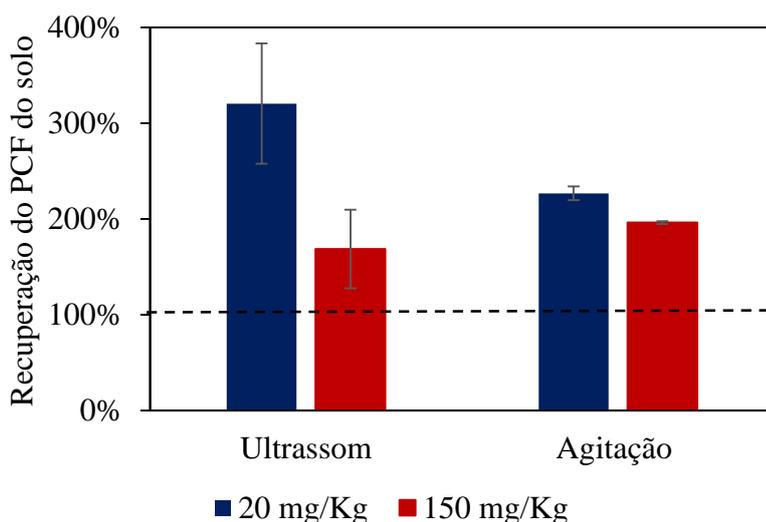
nFeZ a 8mg/kg. De acordo com a Figura 26, concentrações de PCF acima de 20 mg/kg representam uma diferença na produção de CO₂ de mais de 50% em relação ao controle, gerando impactos relevantes sobre a microbiota do solo. Já a concentração de 8 mg/kg tem um efeito menor sobre os microrganismos, cuja atividade é reduzida, mas ainda assim apresenta indícios de recuperação das atividades com potencial de biodegradação do PCF neste teor.

4.2 PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DO PCF DO SOLO

4.2.1 Equipamentos

A Figura 27 apresenta os resultados dos testes de recuperação utilizando o agitador de solo e o ultrassom para a concentração de PCF 20 e 150 mg/Kg.

Figura 27 – Eficiência de recuperação do PCF do solo utilizando Agitador e Ultrassom.



Como demonstrado na Figura 27, as porcentagens de recuperação em todas as unidades testadas permaneceram acima dos 100%, demonstrando valores de PCF acima dos inseridos no solo. Isto retrata a existência de erros experimentais, que geraram a recuperação de outros compostos do solo que o cromatógrafo GC detectou erroneamente como PCF.

A análise do desvio padrão das amostras, apresentado na Figura 27, demonstra grande variação nos dados, principalmente para amostras testadas no ultrassom. O elevado valor de desvio padrão para as amostras extraídas evidencia a retirada heterogênea de compostos do solo, gerando dados incertos e muito variáveis.

Ainda, a utilização do ultrassom ao longo da análise provoca a geração de calor do equipamento, resultando na volatilização do solvente. Tal variação de volume influencia nos valores de concentração, pois dificulta os cálculos, induzindo a erros de concentração do PCF.

Assim, a fim de eliminar variáveis constatadas neste processo, novos testes, que serão apresentados na sequência, foram conduzidos com o agitador de solo, cuja utilização foi a mais frequente na literatura levantada.

Também se questionou o método analítico utilizado neste experimento. O limite de detecção disponível na cromatografia gasosa pode não ter sido suficiente para análise da massa de PCF existente nas amostras. Ao consultar a literatura, foi observado novamente que a cromatografia líquida constituía a maior ocorrência neste tipo de análise e, por isso, optou-se por este método analítico nos próximos testes.

4.2.2 Solventes

As Figuras 28 e 29 apresentam o teor de PCF recuperado do solo através de testes variando a massa do solo e o tipo de solvente.

Figura 28 - PCF recuperado utilizando 5 gramas de solo contaminado.

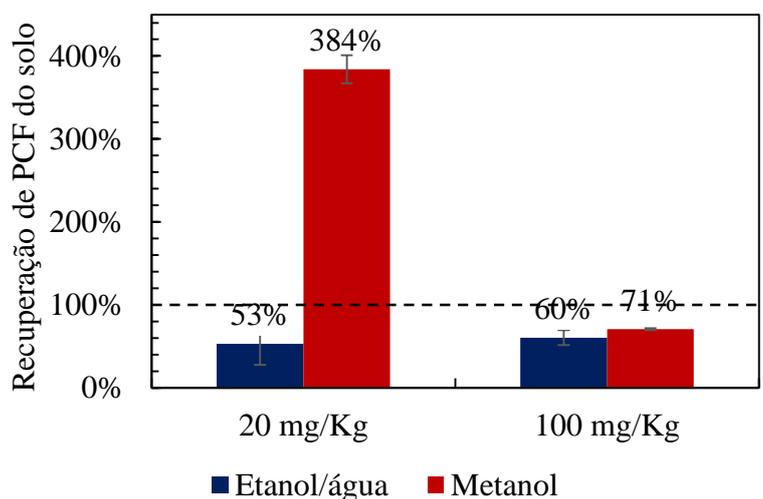
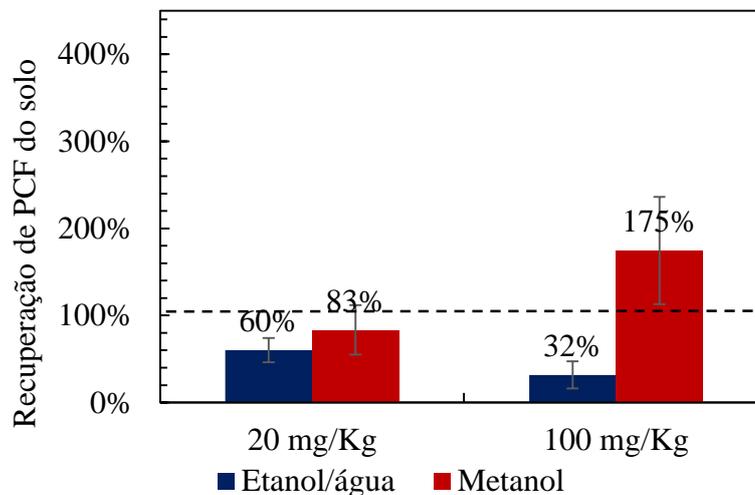


Figura 29 - PCF recuperado do solo utilizando 1 grama de solo contaminado.



Não se obteve resultados satisfatórios em nenhuma das condições investigadas, pois quando os valores de recuperação se aproximaram de 100% (resultado desejado), não se observou uma tendência dos dados.

Para a mistura de etanol/água, em todas as circunstâncias, as quantidades de PCF extraídas estiveram abaixo da adicionada ao solo. Quando utilizado 5 g de solo, obteve-se um valor de pouco mais de 50% de recuperação e para a massa de 1 grama de solo contaminado este valor esteve em 60% para a concentração mais baixa de PCF e 32% para a mais alta. Nestes casos, denota-se uma baixa solubilização do PCF na mistura de etanol/água. Este efeito pode estar associado à baixa solubilidade do contaminante na fração água, que é menor se comparada à solubilidade no solvente.

Em relação a eficiência de recuperação utilizando-se metanol, os valores estiveram mais altos se comparados aos valores utilizando etanol/água, contudo, alguns deles tornam-se infundamentados, pois obteve-se valores maiores que 100%. Para a concentração 20 mg/kg utilizando-se 5 gramas de solo, foi recuperado uma concentração muito maior do que a de referência, cerca de 380%. Este efeito foi observado na concentração de 150 mg/kg utilizando-se 1 grama de solo, onde o valor de recuperação de PCF foi de 175%, ou seja, superior a contaminação inicial do solo.

Ponderando estes valores e a elevada dispersão dos dados, expressas pelo desvio padrão apresentadas nos gráficos das Figuras 28 e 29, torna-se complexa a consideração destes dados, sinalizando a existência de erros experimentais e/ou analíticos.

Como este procedimento foi manipulado de forma muito semelhante à literatura, cujos teores de recuperação eram muito próximos de 100%, passou-se a questionar o método analítico. Isso, porque outras variáveis de controle como equipamento, massa de solo e tipo de solvente já foram investigadas e isoladas, restando, portanto, tal condição a ser estudada.

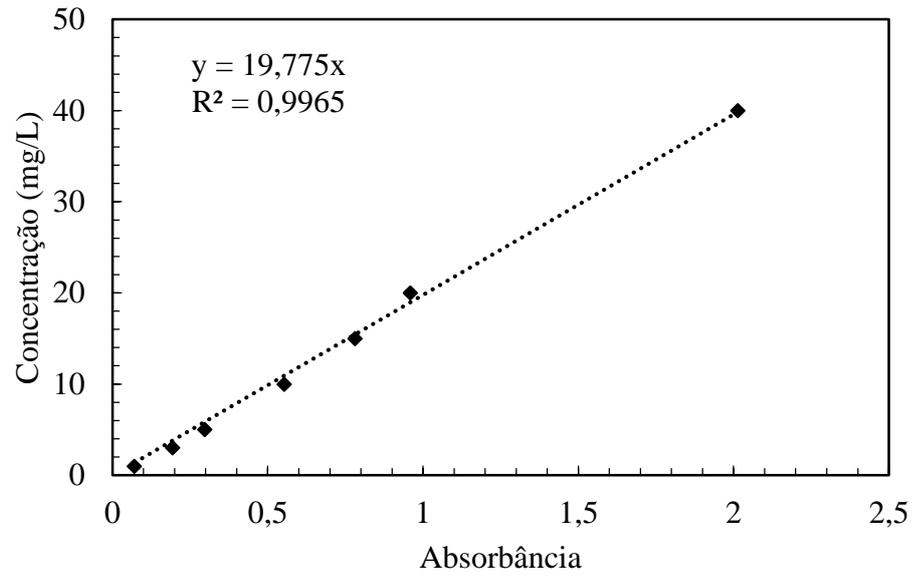
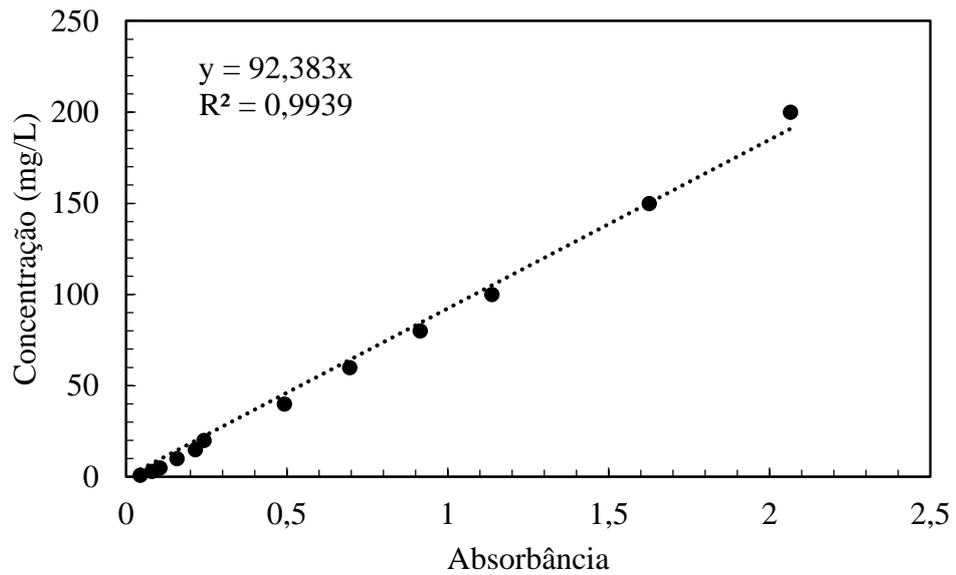
4.2.3 Método Analítico

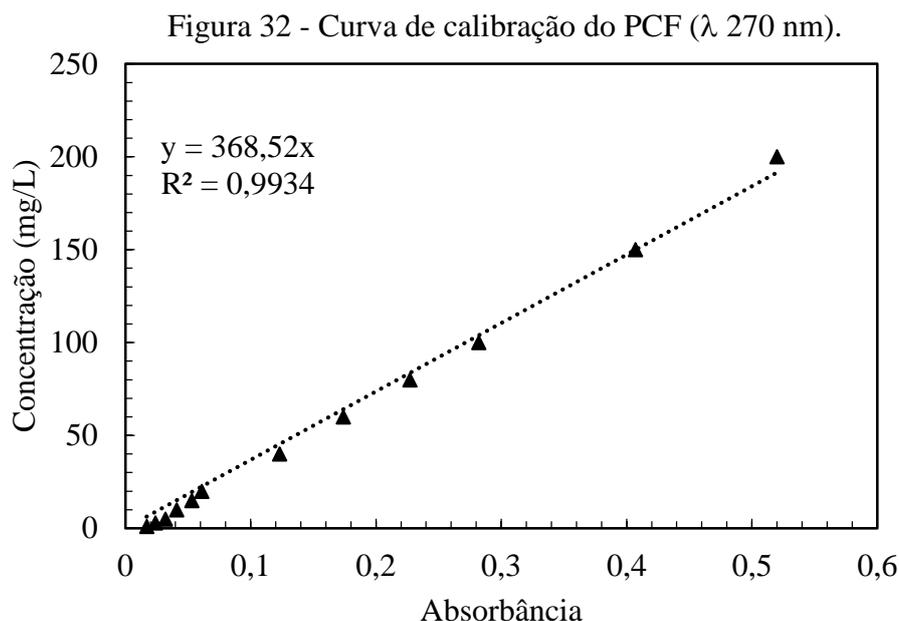
4.2.3.1 *Cromatografia*

Os resultados para os testes de recuperação utilizando a cromatografia gasosa e líquida já foram apresentados no item 4.2. Para análises nestes equipamentos, as amostras eram preparadas de acordo com as metodologias apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13 e levadas ao laboratório de cromatografia, onde o eram injetadas por funcionários do laboratório. Como o manuseio nestes equipamentos era realizado por pessoas especializadas, a curva padrão foi executada pelos mesmos, através da utilização de padrão de PCF.

4.2.3.2 *Espectrofotometria*

Testes utilizando espectrofotometria por luz ultravioleta (UV) foram realizados utilizando λ 230, 250 e 270nm. A Figuras 30, 31 e 32 apresentam as curvas de calibração, a equação da reta e o valor de ajuste ao modelo (R^2) para o PCF nos diferentes comprimentos de onda testados.

Figura 30 - Curva de calibração do PCF (λ 230 nm).Figura 31 - Curva de calibração do PCF (λ 250 nm).



Todas as curvas de calibração de PCF apresentadas nas Figuras 30, 31 e 32 são compostas por mais de 5 pontos, e foram analisadas na região do espectro da luz ultravioleta em função da inexistência de reações colorimétricas nas amostras, pois o PCF ao ser solubilizado no metanol não altera a cor do solvente.

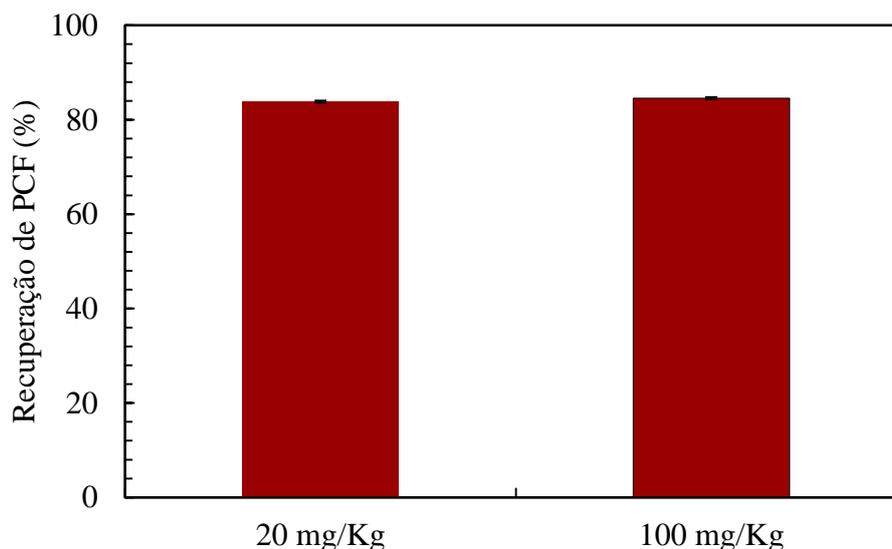
Como demonstrado nas Figuras 30, 31 e 32, para todos os comprimentos de ondas testados, os dados demonstraram bons valores de adequação ao modelo linear, com valores de R^2 de 0,99. Isso elucida a aptidão do modelo para explicar os dados coletados.

O limite de detecção de PCF variou com o comprimento de onda, como mostram os dados coletados. Para 230 nm a concentração máxima observada foi de 50mg/L, enquanto com λ 250 e λ 270 nm foi possível se chegar a 200 mg/L sem atingir o limite de absorbância.

A fim de investigar a espectrofotometria como método analítico, foram realizados testes de recuperação do PCF do solo utilizando dois comprimentos de onda: λ 230nm, pois neste caso, pequenas variações na concentração resultaram maior variação na resposta, tornando o método mais sensível e menos susceptível a erros; e λ 270 nm por ser o mesmo comprimento de onda utilizado na cromatografia líquida para as análises de PCF. Os valores de recuperação obtidos neste experimento utilizando λ 230 estão demonstrados na Tabela 11 e Figura 33.

Tabela 11 - Valores de concentração de PCF recuperados utilizando $\lambda 230$.

Amostra	Concentração extraída (mg/kg)
Branco	2,998
20 mg/Kg	19,767
100 mg/Kg	87,569

Figura 33 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando $\lambda 230$.

De acordo com a Tabela 11, a concentração detectada pela espectrofotometria nas análises possui valores muito próximos a inicialmente inserida no solo, indicando boas condições de recuperação e leitura do PCF. O processo de recuperação no solo mesmo sem contaminante gerou valores de absorvância, que no comprimento de onda de 230nm resultou em uma concentração de 2,9 mg/kg. Tal absorvância ocorreu em função de outros compostos presentes no solo que foram detectados pela luz UV como PCF. Portanto, o valor do branco foi descontado em todas as amostras para não gerar valores de concentração acima do existente.

A Figura 33 apresenta a eficiência de recuperação do PCF do solo utilizando $\lambda 230$ para as duas concentrações testadas. Ainda, está sendo apresentado o desvio padrão dos dados, que se manteve muito baixo, demonstrando confiabilidade dos dados.

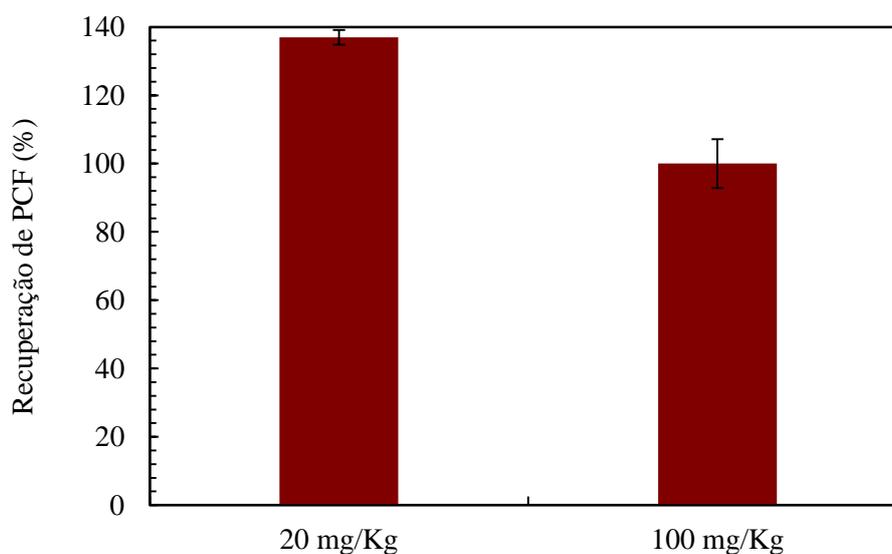
Em relação a eficiência de recuperação do PCF do solo, a Figura 33 mostra um comportamento similar para ambas condições analisadas, com valores próximos a 85%. Isto denota que estas condições possibilitaram que as concentrações inicialmente inseridas no solo pudessem ser transferidas para o solvente e detectadas pelo espectrofotômetro com relevante eficiência. O comprimento de onda de 230 nm permitiram que o PCF solubilizado no metanol fosse detectado pelo espectrofotômetro, consolidado as condições analisadas.

A Figura 34 e a Tabela 12 apresentam a concentração de PCF detectada no solo utilizando comprimento de onda de 250 nm.

Tabela 12 - Valores de concentração de PCF utilizando $\lambda 250$.

Amostra	Concentração extraída (mg/kg)
Branco	10,006
20 mg/Kg	37,385
100 mg/Kg	113,155

Figura 34 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando $\lambda 250$.



A Tabela 12 apresenta os valores de concentração de PCF calculadas a partir da absorbância detectada em $\lambda 250$. Observa-se que neste comprimento de onda, foi detectado uma concentração de PCF mais alta que a inicialmente adicionada ao solo. Este aumento do valor de absorbância foi mais significativo na amostra branco, que não possui contaminante. Isto ocorreu pois demais compostos, além do PCF foram identificados nas amostras, gerando eficiência de recuperação acima de 100%, se considerado o desvio padrão, como mostra a Figura 34.

Os dados que compõe a Figura 34 tiveram o valor do branco descontado, gerando eficiência de recuperação de PCF de 137 e 100% para 20 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente. Para a amostra contendo 20 mg/kg de PCF, observa-se um desvio padrão baixo, no entanto foi detectado uma concentração de PCF maior do que a adicionada no solo. Para a concentração de 100 mg/kg a eficiência de recuperação teve valor de 100%, no entanto com desvio padrão mais significativo, estabelecendo incerteza nos dados.

Neste caso, a inconsistência dos dados se constata devido à dificuldade de uma recuperação completa do contaminante do solo. Estudos mostram que parte do PCF permanece adsorvido nas partículas do solo, especialmente na matéria orgânica em função da afinidade do contaminante (MONTUORI et al., 2014), tornando improváveis extrações de 100% do contaminante do solo.

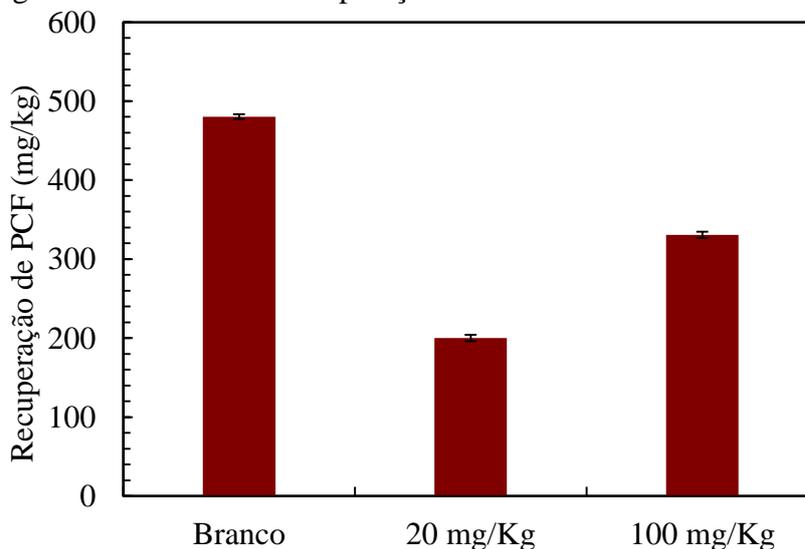
As leituras de concentração do PCF no espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 250nm, demonstraram algumas inconsistências, supostamente porque nessa faixa de leitura, houve a detecção de outros componentes presentes no solo, encobrendo a verdadeira concentração do PCF.

A Figura 35 e a Tabela 13 apresenta os valores de concentração de PCF calculados a partir do valor de absorbância gerado em $\lambda 270$.

Tabela 13 - Valores de concentração de PCF utilizando $\lambda 270$.

Amostra	Concentração extraída (mg/Kg)
Branco	480,352
20 mg/Kg	200,000
100 mg/Kg	330,852

Figura 35 - Valores de recuperação de PCF do solo utilizando $\lambda 270$.



A leitura da concentração de PCF das amostras com comprimento de onda de 270nm, acentuou a tendência comportamental percebida em $\lambda 230$ e $\lambda 250$: conforme o comprimento de onda aumenta, aumenta o valor da absorbância gerado nas amostras. Isto pode ser visto através

da comparação dos valores de concentração de PCF gerados pela absorvância, demonstrado nas Tabelas 11, 12 e 13.

No caso das leituras com comprimento de onda de 270 nm., o valor do Branco esteve acima das do valor das demais amostras, gerando valores negativos para a concentração de PCF. Este comportamento ocorreu, pois, quanto maior o comprimento de onda, menor a seletividade de compostos. Assim, o número de espécies absorventes que interagem com o feixe de radiação é maior, gerando valores mais altos de absorvância. Este valor não corresponde a concentração de PCF, mas sim, a concentração de demais compostos que foram extraídos do solo.

Considerando os resultados obtidos neste ensaio, optou-se para análise de PCF em espectrofotometria no comprimento de onda de 230nm, pois nestas condições, obteve-se a melhor eficiência de recuperação do contaminante presente no solo.

Além do comprimento de onda, foi avaliado se diferentes teores de umidade provocam interferência no valor de absorvância. A Tabela 14 mostra os valores de absorvância para os diferentes teores de umidade, analisados com λ .230nm.

Tabela 14 - Influência da umidade na absorvância.

Teor umidade	Média da Absorvância	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
10%	0,035	0,002517	7,12
20%	0,034	0,002517	7,33
30%	0,037	0,002517	6,74

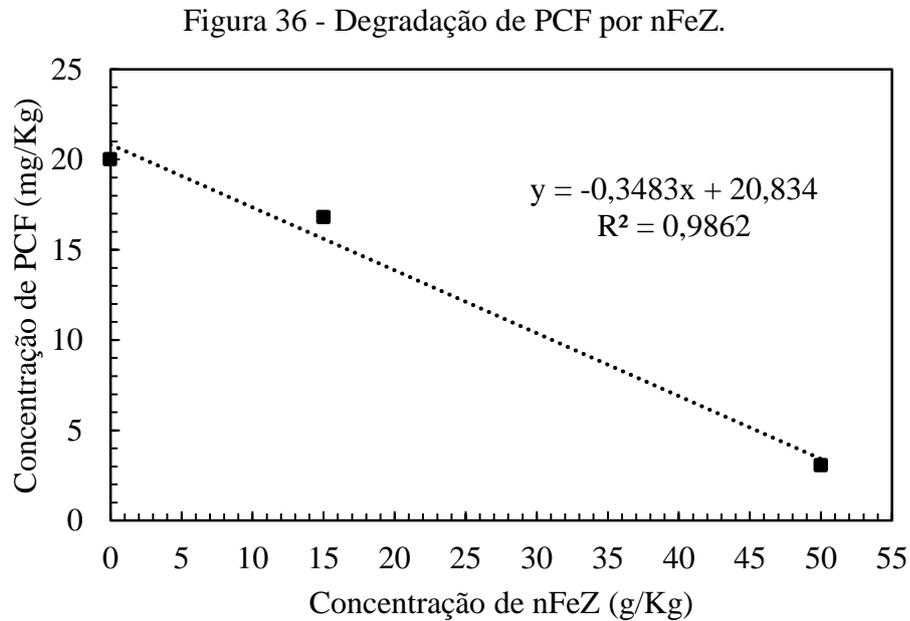
Os valores de absorvância se mostraram pouco dispersos para todas as amostras, como mostra o desvio padrão apresentado na Tabela 14. O coeficiente de variação entre a absorvância de todas as amostras teve valor de 7%, representando pequena diferença entre eles. Neste caso, comprova-se que teores de umidade variando de 10% a 30% não têm efeito sobre o valor de absorvância e por isso não servem como interferentes nas análises de concentração de PCF.

4.3 NANOREMEDIÇÃO UTILIZANDO NFEZ

Para avaliar a eficiência de degradação do PCF pelas nanopartículas de ferro, conduziu-se ensaios de nanorremediação, buscando estabelecer valores para o ensaio final de nanobiorremediação. Estes experimentos obedeceram aos limites de toxicidade avaliados nos

itens 4.1.1 e 4.1.2, tanto para o contaminante quanto para o agente redutor, afim de preservar a microbiota do solo.

A Figura 36 apresenta a degradação do PCF utilizando diferentes concentrações de nFeZ.



A concentração inicial de PCF na contaminação do solo foi de 20 mg/Kg, considerando resultados de experimentos anteriores que verificaram o maior impacto do contaminante sobre a microbiota do solo em concentrações acima desta. Quanto à concentração de nanoferro, utilizou-se 15 e 50 g/kg, pois os ensaios de toxicidade mostraram que, em tais níveis, o nFeZ não gerou efeito tóxico sobre os microrganismos do solo.

De acordo com a Figura 36 observa-se que houve um decaimento da concentração inicial de PCF de 20 mg/kg para 14,94 e 5,03 utilizando-se 15 e 50 g/kg de nFeZ respectivamente. Tal atenuação ocorreu após 48 h e gerou taxas de degradação do contaminante de 25% utilizando 15 g/kg de nFeZ e de 75% com 50 g/kg de nFeZ.

Utilizou-se a equação da reta para se estimar o valor necessário de nFeZ para se atingir concentração de PCF próxima de 8mg/Kg, partindo da concentração inicial de 20 mg/kg. Apartir da equação gerada pela reta, substituiu-se o valor de Y por 8 mg/kg, chegando-se ao valor de x de 36,84 g/kg de nFeZ.

Desta forma, a concentração de nFeZ necessário para se chegar através da nanorremediação a 8 mg/kg de PCF foi de 36,8 g/kg de nFeZ. Para facilitar o procedimento laboratorial, foi adotada a concentração de 40 g/kg de nFeZ. Esta concentração de nFeZ, no

teste de toxicidade (item 4.1.1), não teve impacto negativo sobre a microbiota, podendo, portanto, ser usada sem comprometer condições de biodegradação do PCF.

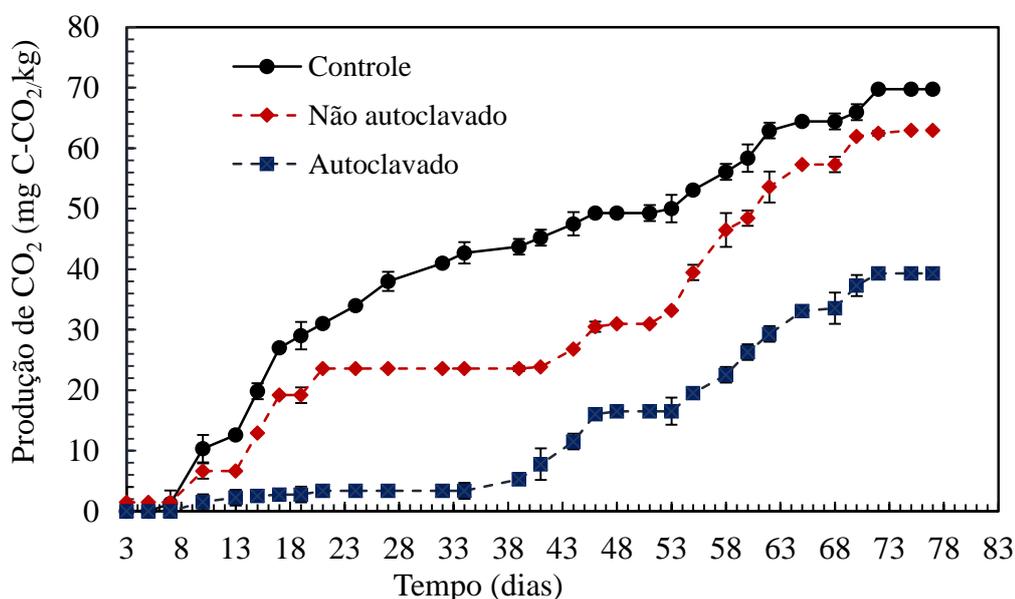
4.4 NANOBIORREMEDIÇÃO

O teste de nanobiorremediação deste trabalho foi concebido a partir de ensaios prévios, que definiram concentrações de contaminante (20 mg/kg de PCF) e agente redutor (40 g/Kg de nFez) convenientes à microbiota e ao processo de descontaminação de solo contendo PCF.

Amostras de solo contaminado com PCF autoclavadas e não autoclavadas, além de solo controle foram analisados. Tais amostras foram submetidas a avaliação da produção de CO₂ para o monitoramento da atividade microbológica, bem como a testes de degradação, a fim de quantificar a concentração de PCF restante no solo.

O acúmulo de CO₂ foi monitorado durante 80 dias e está apresentado na Figura 37.

Figura 37 - Acúmulo de CO₂ de diferentes condições experimentais para a nanobiorremediação.



Observa-se que ao longo do tempo a liberação de CO₂ manteve-se baixa, com valores que chegaram próximos a 80mgC-CO₂/kg para o controle, 65mgC-CO₂/kg para o solo não esterilizado e 40mgC-CO₂/kg para a amostra autoclavada. Tais níveis demonstram uma baixa atividade microbiana dos microrganismos do solo em decorrência da baixa disponibilidade de carbono no ambiente.

A amostra controle gerou o maior acúmulo de CO₂ do ensaio, pois nesse caso não houve a adição do PCF, só de nanoferro. Além da ausência do comportamento tóxico do contaminante, o revestimento orgânico presente nas nanopartículas serviu como alimento para os microrganismos, promovendo assim liberação de CO₂.

Em relação ao solo não autoclavado, o acúmulo de CO₂ abaixo do controle indica que a presença do PCF gerou um ambiente desfavorável aos microrganismos, gerando baixas taxas de produção de CO₂. No último período de monitoramento, a partir do tempo 70 dias o valor de acúmulo de CO₂ entre a amostra com e sem PCF permaneceram muito próximos, indicando ausência da influência tóxica do contaminante em razão da sua degradação. Ainda, este fato mostra que a concentração de PCF inicialmente adicionada ao solo de 20mg/Kg, como esperado, não teve nível de toxicidade elevada a ponto de promover a eliminação dos microrganismos do solo. O nFeZ, por sua vez, reduziu a concentração inicial do PCF, fornecendo a eles um meio propício para sua recuperação.

A amostra autoclavada mesmo esterilizada gerou acúmulo de CO₂. Ainda que inferiores, estas taxas representam contaminação cruzada, já que o solo foi autoclavado antes da contaminação, fazendo com que microrganismos presentes nos demais procedimentos tenham sido inseridos neste solo. O aumento na taxa de produção de CO₂ com o passar do tempo pode ser atribuído as análises. Tal procedimento exige a abertura dos respirômetros para a retirada da solução a ser analisada, diminuindo, portanto, as condições estéreis no decorrer do experimento.

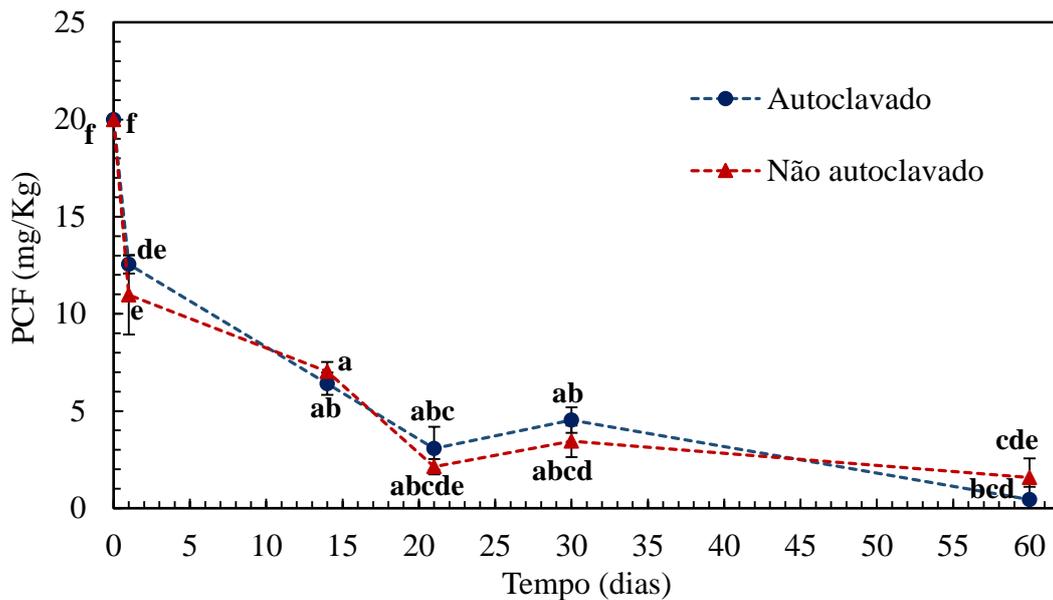
Considerando os valores de produção de CO₂ apresentados na Figura 37 percebe-se que a maior parte do carbono disponível no solo já foi metabolizado pelos microrganismos e transformado em CO₂ nestes 80 dias de monitoramento, justificando a estabilização dos valores. As fontes de carbono consideradas são o PCF, nFeZ e matéria orgânica do solo.

Dos 20 mg/kg de PCF inseridos no solo, estima-se que 27% ou 5,4 mg/kg são apenas de carbono. O nanoferro possui 1% de lactato, composto em 40% de carbono, que no teor de 40 g/kg forneceu ao sistema cerca de 160 mg/kg do elemento. Quanto ao carbono existente na matéria orgânica no solo, trata-se de apenas 0,06%, totalizando 6 mg/kg.

Portanto, a massa de carbono neste contexto totaliza 171,4 mg/kg. Contudo, a NBR 14283, que descreve o método respirométrico, admite que cerca de 50% do carbono presente nas amostras se incorpora ao solo através da mineralização. Considerando esta taxa de mineralização, o valor disponível para a microbiota metabolizar manteve-se próximo a 85 mg/kg, estando muito próximo ao valor real de CO₂ acumulado neste experimento.

Por fim, é possível constatar que houve a degradação do PCF na amostra não autoclavada e, por isso, seu valor de acúmulo de CO₂ manteve-se próximo ao do controle no final do ensaio, mostrando que, como previsto, o nFeZ degradou a concentração inicial do PCF. Assim, estabeleceu-se um ambiente favorável aos microrganismos, sem a influência tóxica da concentração inicial do contaminante adicionada ao solo. A degradação do PCF pode ser observada na Figura 38.

Figura 38 - Degradação do PCF ao longo do tempo.



Letras iguais significam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tuckey.

De acordo com os valores de concentração de PCF, constata-se a ocorrência da degradação do contaminante ao longo do tempo. A primeira análise de concentração, ocorrida após 24 horas da inserção de nFeZ mostram que neste período a degradação do contaminante foi cerca de 40%, chegando na concentração de PCF de 10,9 mg/kg para o solo não autoclavado e 12,5 mg/kg no solo autoclavado, sendo a contaminação inicial de 20 mg/kg.

Após 14 dias de reação, a degradação foi de cerca de 65% do PCF, que se manteve na análise realizada no tempo 21 dias, se considerado o desvio padrão entre as amostras. As análises do tempo 21 e 30 dias resultaram em valores de concentração de PCF sem diferença estatística como demonstra o teste de Tuckey apresentado na Figura 38. Ao longo dos 30 dias de experimento, a concentração final de PCF chegou em 4 mg/kg no solo autoclavado e 3,05 mg/kg para o solo não autoclavado, representando uma eficiência de remediação de 80 e 85% respectivamente. Nesta concentração de PCF, as amostras estão muito próximas do valor

admitido pela legislação para áreas agrícolas, demonstrando bons valores de decaimento do contaminante em apenas 30 dias.

Após 60 dias de monitoramento, o teste de degradação do PCF do solo apontou que a concentração restante no solo autoclavado era 0,44 mg/kg e não autoclavado 1,57 mg/kg como demonstrado na Figura 38. Isto representa uma degradação de mais de 95% para os dois casos.

Houve redução satisfatória do contaminante através da técnica empregada, no entanto, a análise estatística apresentada na Figura 38 mostra que a única via de degradação existente no processo foi através da transferência de elétrons do nFeZ. A semelhança estatística entre os valores de concentração para as amostras autoclavadas e não autoclavadas, especialmente a partir do tempo 15 dias, verificam a ausência da biodegradação do contaminante, sugerindo que a degradação do PCF obtida no experimento ocorreu em função da presença das nanopartículas no solo.

Sabe-se que o nFeZ e as bactérias podem complementar-se um ao outro no processo de degradação do PCF, já que ambos são capazes de promover a desalogenação redutiva (WANG et al., 2016), mas as taxas lentas dos processos biológicos envolvidos dificultaram a biodegradação do PCF, considerando o tempo de avaliação do experimento. Segundo Loffer et al. (2013), a desalogenação redutiva mediada por bactérias é extremamente lenta e pode levar longo período de tempo, de modo que o avaliado neste caso não foi suficiente.

Contudo, foi observado no ensaio de acúmulo de CO₂ que a degradação do teor inicial do contaminante pelo nFeZ forneceu aos microrganismos condições de sobrevivência no meio, possibilitando a eles a retomada de sua atividade e a degradação do PCF restante. Além de diminuir a toxicidade através da redução do contaminante, Kocur et al. (2015) afirmam que o nFeZ pode fornecer condições favoráveis de crescimento das bactérias fornecendo H₂ como doadores de elétrons.

Em relação à concentração de nFeZ utilizada, a degradação do PCF gerada foi satisfatória após 30 dias de reação. De acordo com os dados, pode-se afirmar que a reatividade do nFeZ ocorre em função do tempo, e mesmo que com taxas mais lentas se comparadas às do início da reação, permanece doando elétrons por longo período após sua adição. Isso pois a ação do nFeZ sobre as moléculas de PCF é limitada e diminui com o passar do tempo, provavelmente em função da diminuição dos elétrons com consequente oxidação para F²⁺. Além disso, segundo

Wang et al. (2016), em ambiente aquoso, o nFeZ perde sua capacidade redutiva pela reação com os íons H^+ da água. Estes servem como aceitadores de elétrons e competem com o PCF neste caso, para a reação com os elétrons doados pelo nFeZ.

Destaca-se, portanto, a importância do monitoramento da degradação a longo prazo após a adição do nFeZ. Na ausência deste monitoramento, se considerado somente a análise após 24 horas, se faria necessário doses maiores de nFeZ. Através das análises ao longo do tempo foi possível comprovar que a concentração inicial de nFeZ utilizada foi suficiente para degradação satisfatória do contaminante.

Por fim, a readaptação da microbiota ao ambiente previamente tóxico em função da presença do PCF que está mostrada na figura 37, pode ser entendida como potencial para biodegradação de contaminantes eventualmente presentes no meio. Considerando esta possibilidade como processo subsequente ao ocorrido neste experimento, pode-se considerar que a quantidade de nFeZ utilizada poderia ser ainda menor, diminuindo custos e estimulando seu uso, sem comprometer o processo de remediação do solo contaminado com PCF, que neste caso, enquadrou-se ao valor exigido na legislação ambiental.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou todos os processos envolvidos na nanobiorremediação de solo contaminado com pentaclorofenol.

As concentrações de nFeZ testadas não apresentaram efeito tóxico aos microrganismos, de modo que o revestimento das nanopartículas serviu como fonte de carbono aos microrganismos. Ainda, para o ensaio de nanobiorremediação, concentrações até 50 g/kg poderiam ser utilizadas, já que neste ensaio este foi o limite máximo investigado;

Todas as concentrações de PCF testadas tiveram influência tóxica aos microrganismos do solo, com mais intensidade a partir de 20 mg/kg. A menor concentração utilizada, de 3 mg/kg, gerou valores de acúmulo de CO₂ muito próximos aos da amostra Controle. Considerando demais teores e níveis de toxicidade testados, a concentração limite de PCF estipulada para o ensaio de nanobiorremediação foi de 20 mg/kg, objetivando-se chegar através do nFeZ a 8 mg/kg;

Obteve-se as melhores eficiências de recuperação através da agitação da mistura de solo contaminado e metanol, com posterior centrifugação, filtração e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 230 nm.;

O ensaio de nanorremediação mostrou que para a redução da concentração do PCF de 20 para 8 mg/kg, eram necessárias 40 g/kg de nFeZ. Este teor não foi considerado tóxico no ensaio de toxicidade, podendo, portanto, ser utilizado;

A nanobiorremediação mostrou através do ensaio de acúmulo de CO₂ que após a degradação do PCF pelo nFeZ, os microrganismos se readaptaram ao meio e retomaram suas atividades metabólicas. Quanto à degradação, após 60 dias de ensaio, a eficiência de degradação do PCF foi de 95% tanto no solo autoclavado quanto no solo não autoclavado. Análise dos dados de degradação mostraram semelhança estatística entre os dois tratamentos, pontuando a ausência da biorremediação, de modo que a única via de degradação do PCF que ocorreu no solo foi através do nFeZ.

O teor de nanoferro utilizado neste experimento foi suficiente para degradação do PCF, e assim proporcionou aos microrganismos condições da retomada de suas atividades. Desta forma, a nanobiorremediação apresentou potencial para aplicação em áreas contaminadas através da utilização de concentrações mais baixas de nFeZ, capazes de diminuir concentrações iniciais mais altas e propiciar à microbiota condições para a biodegradação de teores restantes do contaminante;

Destaca-se ainda a importância do monitoramento da degradação por um longo período, visto que foi comprovado através dos ensaios que o nFeZ continua seu processo de redução do contaminante por até 60 dias após sua aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, 2006 apud ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Register. Toxicological Profile of Pentachlorophenol, 2001.
- ALBERINI, A., CHIABAI, A., TURVANI, M., & TONIN, S. Public Support for Policies Addressing Contaminated Sites: Evidence from a Survey of the Italian Public. In ERSA Conference Papers . European Regional Science Association, 2006.
- ALMEIDA, F.V., CAETANO, A.J., BISINOTI, M.C., JARDIM, W.F. Substâncias tóxicas persistentes (STP). *Brasil. Química Nova*, v. 30, p. 1976-1985, 2007.
- ALVES, C. C. A. *Deslocamento e adsorção de um pesticida (pcp) em um solo agrícola de santa catarina.estudo experimental e simulação*. Dissertação.Pós-Graduação em Engenharia Química- Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.
- ARMAS RD. *Caracterização da comunidade bacteriana em água subterrânea contaminada por tetracloroeteno*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba (ESALQ), Piracicaba, SP, 2007.
- BAER, D. R., GASPAR, D. J., NACHIMUTHU, P., TECHANE, S. D., & CASTNER, D. G. Application of surface chemical analysis tools for characterization of nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, n. 3, p. 983–1002, 2010.
- BALLAMINUT N.; MATHEUS, D. R. Caracterização de inóculo fúngico em biorremediação de solo, *Braz. J. Microbiol*, v. 38, n. 2. 2007
- BARBEAU C., DESCHENES, L., KARAMANEV, D., COMEAU Y., SAMSON, R. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 48, p. 745–752, 1997.
- BENN, F.R. & McAULIFFE, C.A. Química e poluição. São Paulo: Editora da USP, 1981.
- BOKARE V., MURUGESAN K., KIM Y. M., JEON J. R, KIM E. J., CHANG Y. S., Degradation of triclosan by an integrated nano-bio redox process, *Bioresour. Technol*, v. 101, p. 6354–6360, 2010.
- BOKARE, V., MURUGESAN, K., KIM, J.-H., KIM, E.-J., CHANG, Y.-S. Integrated hybrid treatment for the remediation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Sci. Total Environ*. 435e436, 563e566, 2012.
- BORCH T., KRETZSCHMAR R., KAPPLER A., CAPPELLEN P. V., GINDER VOGEL M., VOEGELIN A., CAMPBELL, K. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics, *Environ. Sci. Technol*. v. 44, p. 15–23, 2010.
- BOSSO L., CRISTINZIO, G., A comprehensive overview of bacteria and fungi used for pentachlorophenol biodegradation, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*, v. 13, p. 387–427, 2014.

BRÁS, ISABEL PAULA LOPES. *Utilização de casca de pinheiro como adsorvente para Remoção de pentaclorofenol de águas contaminadas*. Dissertação (Ciências de Engenharias) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2005.

BREVIK, E.C., SAUER, T.J. The past, present, and future of soils and human health studies. *Soil*, v.1, n., p. 35–46, 2015.

BRUCHA, G. *Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de Santos-São Vicente*. Tese (Doutorado em Hidráulica e saneamento). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CAO, M., WANG, LI., AI, ZHANG, Efficient remediation of pentachlorophenol contaminated soil with tetrapolyphosphate washing and subsequent ZVI/Air treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 292, p. 27–33, 2015.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden Age of Insecticide research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.* v.43, p.1–16. 1998.

CEA M., JORQUERA, M., RUBILAR, O., LANGER, H., TORTELLA, G., DIEZ, M. C. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracophyllum discolor* and its effect on soil microbial community, *J.Hazard. Mater.* v. 181, p. 315–323, 2010.

CECCHIN, I., REDDY, K.R.; THOMÉ, A., TESSARO, E. Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p.1-10, 2016.

CETESB (2013). Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de SP. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2013/texto-explicativo.pdf>.

CHEN M.; SHIH K.; HU M.; LI F.; LIU C.; WU W.; TONG H. Biostimulation of indigenous microbial communities for anaerobic transformation of pentachlorophenol in paddy soils of southern China, *J. Agric. Food Chem*, v. 60, p. 2967–2975, 2012.

CHEN, M.; LIUA C.; CHENA P.; TONGA, H.; LIA F.; QIAO, J. ANCAGUANGDONG Q. Dynamics of the microbial community and Fe(III)-reducing and dechlorinating microorganisms in response to pentachlorophenol transformation in paddy soil. *Journal Of Hazardous Materials*, v. 312, p.97-105, jul, 2016.

CHEN, MING et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p.745-755, 2015.

CHRISTIANSEN, C.M.; DAMGAARD, I; BROHOLM, M.; KESSLER, T.; KLINT, K.E.; NILSSON, B.; BJERG, P.L. Comparison of delivery methods for enhanced *in situ* remediation in clay till. *Groundwater Monitoring & Remediation*, v. 30, n. 4, p. 107-122, 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Publicado no DOU nº 249, de 30/12/2009, págs. 81-84.

CORNWALL COUNCIL. Guidance on the Redevelopment of Potentially contaminated Sites. Cornwall Council, UK, 2010.

CUNDY, A.B.; HOPKINSON, L.; WHITBY, R.L.D. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: A review. *Science of the Total Environment*. v. 400, p. 42- 51, 2008.

DALGREN, K.E., ARWIDSSON, Z., CAMDZIJA, A., SJÖBERG, R., RIBÉ, V., WAARA, S., ALLARD, B., KRONHELM, T., HEES, P.A.W. Laboratory and pilot scale soil washing of PAH and arsenic from a wood preservation site: changes in concentration and toxicity. *J. Hazard. Mater.*, v. 172, p. 1033–1040, 2009.

DAMS, R. I. Rizoremediação de pentaclorofenol em um solo argiloso por *sphingomonas chlorophenolica* atcc.v.12, n. 4,p. 426-432, 2007.

DAMS, R. I., PATON, G. KILLHAM, K. Bioaugmentation of pcp in two different soils by *Sphingomonas chlorophenolica*. *Pesticidas:r. ecotoxicol. E meio ambiente*, V. 16, p. 111-124, 2006.

DARKO-KAGYA, K.; KHODADOUST, A.; REDDY, K. Reactivity of Aluminum Lactate-Modified Nanoscale Iron Particles with Pentachlorophenol in Soils. *Environmental engineering science*, v. 27, n. 10, 2010.

DEL GRANDE, M. *Diagnóstico e Distribuição de Compostos Organoclorados e Metais em Ambientes Aquáticos Tropicais*. 2005. 176 f. Tese (Doutorado) –Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DERCOVA´ K. SEJA´KOVA´ Z, SKOKANOVA´ M., BARANCKOVA´ G, MAKOVNIKOVA´ J. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite. *Cremosphere*.v. 66, p. 783-790. 2007.

DIAGBOYA, Paul N.; OLU-OWOLABI, Bamidele I.; ADEBOWALE, Kayode O. Distribution and interactions of pentachlorophenol in soils: The roles of soil iron oxides and organic matter. *Journal Of Contaminant Hydrology*, v. 191, p.99-106, 2016.

EL FANTROUSSI S., NAVEAU, H. & AGATHOS, S.N. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnology Progress*, v. 14, n. 2, p. 167-88, 1998.

EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY (EEA). Progress in Management of Contaminated Sites. European Environment Agency, Report CSI 015. Copenhagen, Denmark, 2007.

FARIA, A.B. de C. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais* V. 5 N. 2, 2009

FU, F.; DIONYSIOU, D. D.; LIU, H. The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 267, p. 194-205, 2014.

GAO H. J., JIANG X., WANG F. Residual levels and bioaccumulation of chlorinated persistent organic pollutants (POPs) in vegetables from suburb of Nanjing, People's Republic of China, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v. 74, p. 673–680. 2005.

GAO, J.J., LIU, L.H., LIU, X.R., LU, J., ZHOU, H.D., HUANG, S.B., WANG, Z.J., SPEAR, P.A. Occurrence and distribution of organochlorine pesticides -lindane, p, p0-DDT, and heptachlor epoxide-in surface water of China. *Environ. Int.*, v. 34, p. 1097–1103, 2008.

GAVRILESCU, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Biorremediation. *Engineering in Life Sciences*, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.

GIMENES, L. J. *Biodegradação de pentaclorofenol por Trametes villosa (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares*. Tese de doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2011.

GOMES, J. C. “A maior contaminação por POPs no Brasil: o caso Rhodia na Baixada Santista”. In: ACSERALD, H.; HERCULANO, S.; PÁDUA, J. A. *Justiça Ambiental e Cidadania*. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2004.

HASAN, S.W., GHANNAM, M.T., ESMAIL, N. Heavy crude oil viscosity reduction and rheology for pipeline transportation. *Fuel*, v. 89, n. 5, p. 1095–1100, 2010.

HE, F., ZHAO, D.Y. Preparation and characterization of a new class of starchstabilized bimetallic nanoparticles for degradation of chlorinated hydrocarbons in water. *Environ. Sci. Technol.* v. 39, n. 9, p. 3314-3320, 2005.

HE, Y., XU, J., WANG, H., ZHANG, Q., MUHAMMAD, A. Potential contributions of clay minerals and organic matter to pentachlorophenol retention in soils. *Chemosphere* v. 65, p. 497–505. 2006.

IGLESIAS, A., LOPEZ, R., GONDAR, D., ANTELO, J., FIOLE, S., ARCE, F. Adsorption of paraquat on goethite and humic acid-coated goethite. *J.Hazard.Mater.* v. 183, p. 664–668, 2010.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 71 PENTACHLOROPHENOL, World Health Organization Geneva, 1987.

JOHNSON C. R., LAMAR R. T. Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. *Biol. Biochem. V. 29, n. 7*, p. 1143-1148, 1997

KABENGI, N., CHRYSOCHOOU, M. An Integrated Approach to Environmental Management. *Soil science in environmental management*. p.75–96, 2015.

KADIR, A. A. S. A.; BARLOW, H. S. Botanical Insecticides from Higher Plants: First to Fourth Generation Insecticides. *Pest Management and the Environment*, p. 132, 2000.

KIM Y. M., MURUGESAN K., CHANG Y., KIM E. J., CHANG Y.S. Degradation of polybrominated diphenyl ethers by a sequential treatment with nanoscale zero valent iron and anaerobic biodegradation, *J. Chem. Technol. Biotechnol*, v. 87, p. 216–224, 2012.

KIM, H.J., PHENRAT, T., TILTON, R.D., LOWRY, G.V. Fe⁰ nanoparticles remain mobile in porous media after aging due to slow desorption of polymeric surface modifiers. *Environ. Sci. Technol.* v. 43, p. 3824–3830, 2009.

KIM, Y.H., CARRAWAY, E.R. Dechlorination of chlorinated phenols by zero valent zinc. *Environ. Technol.*, v. 24, p. 1455e1463. 2003.

KIRSCHLING, T., GREGORY, K., MINKLEY, N., LOWRY, G., TILTON, R.. Impact of nanoscale zero valent iron on geochemistry and microbial populations. *Environ. Sci. Technol.* v. 44, p. 3474–3480, 2010.

KODESOVA, R., KOCAREK, M., KODES, V., DRABEK, O., KOZAK, J., HEJTMANKOVA, K. Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. *J. Hazard. Mater*, v. 186, p.540–550, 2011.

KOENIG J. C., BOPARAI H., LEE M. J. O'CARROLL D., BARNES R., MANEFIELD M. Particles and enzymes: Combining nanoscale zero valent iron and organochlorine respiring bacteria for the detoxification of chloroethane mixtures. *Journal of Hazardous Materials*, v. 308, p. 106–112, 2016.

KOCUR, C.M., LOMHEIM, L., MOLENDIA, O., WEBER, K.P., AUSTRINS, L.M., SLEEP, B.E., BOPARAI, H.K., EDWARDS, E.A., O'CARROLL, D.M. Long-term field study of microbial community and dechlorinating activity following carboxymethyl cellulose-stabilized nanoscale zero-valent iron injection. *Environ. Sci. Technol.* v. 50, p. 7658–7670, 2016.

KONRADSEN, F; VAN DER HOEK, W; AMERASINGHE, F.P; MUTERO, C. & BOELEEE, E., Engineering and malaria control: learning from the past 100 years. *Acta Tropica*, v.89, p.99-108, 2004.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation environment: A management tool. *International Journal of Environmental and Science*, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

LAINE, M.M., JØRGENSEN, K.S. Effective and safe composting of chlorophenol contaminated soil in pilot scale. *Environ. Sci. Technol.* v. 31, p. 371–378, 1997.

LAN Q., HONG L., FANG-BA L., FENG Z., CHENG-SHUA L. Effect of pH on pentachlorophenol degradation in irradiated iron/oxalate systems, *Chem. Eng. J.* v.168, p. 1209–1216. 2011.

LARSEN, S.; HENDRIKSEN, H.V.; AHRING, B.K. Potential for thermophilic (50°C) anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in different ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.07, p. 2085-2090. 1991.

LE T. T., NGUYEN K., JEON J., FRANCIS A., CHANG Y. Nano/bio treatment of polychlorinated biphenyls with evaluation of comparative toxicity, *Journal of Hazardous Materials*, v. 287, p. 335–341, 2015.

LEE, C., KIM, J.Y., LEE, W.I., NELSON, K.L., YOON, J., SEDLAK, D.L. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on escherichia coli. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4927–4933, 2008.

LEFREVE, E.; BOSSA, N.; WIESNER M.; GUNSCH, C. A review of the environmental implications of *in situ* remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities. *Science of the Total Environment*, 2016.

LI Z., INOUE Y., SUZUKI D., YE L., KATAYAMA A. Long-term anaerobic mineralization of Pentachlorophenol in a continuous-flow system using only lactate as an external nutrient, *Environ. Sci. Technol.*, v. 47, p. 1534–1541, 2013.

LIMA, A. F.; RACCA FILHO, F. *Dicionário de pragas e praguicidas: aspectos legais, toxicológicos e recomendações técnicas*. 1. Ed. Rio de Janeiro: Ver Curiosidades. P. 126, 1987.

LIU, Y., LOWRY, G.V., 2006. Effect of particle age (Fe⁰ content) and solution pH on NZVI reactivity: H₂ evolution and TCE dechlorination, v. 40, n. 19, p. 6085 – 6090, 2006.

LÖFFLER, F.E., EDWARDS, E.A. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 17, p. 274–284, 2006.

MACHADO, K., MATHEUS, D., MONTEIRO, R., BONONI, V. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 297-301, 2005.

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

MAHMOOD, S.; PATON G. I.; PROSSER, J. I. Cultivation-independent *in situ* molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil, *Environ. Microbiol.*, v. 7, p. 1349–1360, 2005.

- MÄNNISTÖ M.K., TIROLA M.A., PUHAKKA, J.A. Degradation of 2, 3, 4,6-tetrachlorophenol at low temperature and low dioxygen concentrations by phylogenetically different groundwater and bioreactor bacteria, *Biodegradation* v. 12, p. 291–301. 2001
- MARICONI, F.A.M. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas*. 7.ed. São Paulo, Nobel, 1985.
- MARTIN, J.E; HERZING, A.A.; YAN, W. L.; LI, X. Q.; KOEL, B. E.; KIELY, C. J; ZHANG, W. X. Determination of the Oxide Layer Thickness in Core–Shell Zerovalent Iron Nanoparticles. *Langmuir*, v.24, p. 4329-4334, 2008.
- MATHEUS, D. R. *Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p, 2003.
- MATUO, Y.K; LOPES, J.N.C. & MATUO, T. *Contaminação do leite humano por organoclorados DDT, BHC e Ciclodienos*. Jaboticabal: Editora da FUNEP, 1990.
- MCALLISTER, K.A., LEE H., TREVORS, J. Microbial degradation of pentachlorophenol, *Biodegradation*, v. 7, n. 1, p. 1-40 1996.
- MOHN, W.W., TIEDJE, J.M., Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev*, v. 56, p. 482–507, 1992.
- MONTIEL, A. M., FERNÁNDEZ, F. F., MARCIAL, J., SORIANO, J. BARRIOS-GONZÁLEZ, J. & TOMASINI, A. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotechnology Letters*. v.26, p. 1353-1357, 2004.
- NURMI, J.T.; TRATNYEK, P.G.; SARATHY, V.; BAER, D.R.; AMONETTE, J.E.; PECHER, K., WANG, C.M.; LINEHAN, J.C.; MATSON, D.W.; PENN, R.L.; DRIESSEN, M.D. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environmental Science Technology*, v. 39, n. 5, p. 1221–1230, 2005.
- LOLADE, O. et al. Interactive influence of Fe–Mn and organic matter on pentachlorophenol sorption under oxic and anoxic conditions. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, v. 4, n. 2, p.1899-1909, 2016.
- ORECCHIO, S., MANNINO, M.R. Chemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: partitioning and extraction of humic substances. *Mar.Pollut. Bull*, v. 60, p.1175–1181, 2010.
- PANAGOS, P.; LIEDEKERKE, M. V.; YIGINI, Y.; MONTANARELLA, L. “Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network”. *Journal of Environmental and Public Health*, 2013.
- PARK S. K., BIELEFELDT, A. R. Non-ionic surfactant flushing of pentachlorophenol from NAPL-contaminated soil, *Water Res.*, v. 39, p. 1388–1396, 2005.

PAYNE RB, MAY HD, SOWERS KR. Enhanced reductive dechlorination of polychlorinated biphenyl impacted sediment by bioaugmentation with a dehalorespiring bacterium. *Environ Sci Technol*, v. 4, p. 8772–9, 2011.

PERALTA-VIDEA, J. R., ZHAO, L., LOPEZ-MORENO, M. L.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials*. v. 186, p. 1-15, 2011.

PIGNATI, W.A., MACHADO, J.M.H., 2011. O agronegócio e Seus Impactos na saúde dos Trabalhadores e Da população Do Estado de Mato Grosso. Saúde Do trabalhador na Sociedade Brasileira contemporânea. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

PNUMA, 2002. Programa de Las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (Productos Químicos). Evaluación regional sobre sustancias tóxicas, 92p.

REDDY, K. Nanotechnology for site remediation: Dehalogenation of organic pollutants in soils and groundwater by nanoscale iron particles. In: PROCEEDINGS OF THE 6TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ENVIRONMENTAL GEOTECHNICS. New Delhi. India, v. 1, p. 163 e 180, 2010.

REDDY, K., DARNAULT, C., DARKO-KAGYA, K. Transport of lactate-modified nanoscale iron particles in porous media. *J. Geotechnical Geoenvironmental Eng*, v. 140, 2014.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. The Agrochemicals Handbook (Dialog Information Services (File 306)), Cambridge, 1989.

RYBNIKOVA V., SINGHAL, N., HANNA K. Remediation of an aged PCP-contaminated soil by chemical oxidation under flow-through conditions. *Chemical Engineering Journal*, V. 314 P. 202–211, 2017.

SALEH, N.; SIRK, K.; LIU, Y.; PHENRAT, T.; DUFOUR, B.; MATYJASZEWSKI, K.; TILTON, R.D.; LOWRY, G.V. Surface Modifications Enhance Nanoiron Transport and NAPL Targeting in Saturated Porous Media. *Environmental Engineering Science*, v. 24, n. 1, p. 45-47, 2007.

SANTOS A. P. *Determinação de Compostos Organoclorados e Hidrocarbonetos Poliaromáticos na Lagoa de Carapicuíba* – SP. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SANTOS, S.; REZENDE, M.O.; LANDGRAF, M.D.; SILVA, S.M.; AMARAL, O.L.C. Determinação de Pesticidas Organoclorados em Sedimentos Coletados no Complexo Estuarino Lagunar de Mundaú-Manguaba – CELMM. *Anais. Assoc. Brás. Quím*, 50(2), 50-58, 2001.

SCELZA, R., RAO M. A., GIANFREDA L. Response of an agricultural soil to pentachlorophenol (PCP) contamination and the addition of compost or dissolved organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 2162–2169, 2008.

SCHÄDLER, S., MORIO, M., BARTKE, S., ROHR-ZAENKER, R., & FINKEL, M.

Designing sustainable and economically attractive brownfield revitalization options using an integrated assessment model. *Journal of Environmental Management*, v. 92, n. 3, p. 827-837, 2011.

SEMENOV, V.M., TULINA, A.S., SEMENOVA, N.A., IVANNIKOVA, L.A. Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: a review. *Eurasian Soil Sci.* v. 46, p. 355–368, 2013.

SILVA, A.M. F. Organochlorines and polychlorinated biphenyl environmental pollution in south coast of Rio De Janeiro state. *Marine Pollution Bulletin*, v. 108, n. 1-2, p.325-331, jul. 2016.

SILVA, R. F.G. GESTÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS E CONFLITOS AMBIENTAIS: O CASO DA CIDADE DOS MENINOS. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SINGH, R., MANICKAM, N., MUDIAM, M., MURTHY, R., MISRA, V. An integrated (nano-bio) technique for degradation of α -HCH contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 258, n. 259, p. 35–41, 2013.

SUBRAMANIAN B., NAMBOODIRI V., KHODADOUST A. P., DIONYSIOU P., Extraction of pentachlorophenol from soils using environmentally benign lactic acid solutions, *J. Hazard. Mater.* v. 174, p. 263–269. 2010.

SUN, K., GAO, B., ZHANG, Z., ZHANG, G., LIU, X., ZHAO, Y., XING, B. Sorption of endocrine disrupting chemicals by condensed organic matter in soils and sediments. *Chemosphere*. V. 80, p.709–715, 2010.

SUN, M.M., LUO, Y.M., TENG, Y., CHRISTIE, P., JIA, Z.J., LI, Z.G, Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon and heavy metals mixed contaminated soil by successive methyl- β -cyclodextrin enhanced soil washing-microbial augmentation: a laboratory scale. *Environ. Sci. Pollut. Res*, v. 20, p. 976–986, 2013.

THOME, A., CECCHIN, I., REGINATTO, C., COLLA, L. M., REDDY, K. Biostimulation and rainfall infiltration: influence on retention of biodiesel in residual clayey soil. *Environ Sci Pollut Res*, 2017.

THOMÉ, A., REDDY, K.R., REGINATTO, C., CECCHIN, I. Review of nanotechnology for soil and groundwater remediation: Brazilian perspectives. *Water, Air Soil Pollut*, v. 226, p. 1e20, 2015.

TONG, H., HU M., LI F., LIU C., CHEN, M. Biochar enhances the microbial and chemical transformation of pentachlorophenol in paddy soil, *Soil Biol. Biochem*, v. 70 p. 142–150, 2014.

TURK, J. Introduction to environmental studies. 3.ed. New York: Saunders College, 1989.

United State Department of Health and Human Services, Toxicological Profile for Pentachlorophenol. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, Draft, 1992.

United States environmental protection agency - USEPA (2004). EPA's Cleaning Up the Nation's Waste Sites: Markets and Technology Trends (2004 Edition). Disponível em: <http://www.epa.gov/superfund/accomp/news/30years.htm>

United States environmental protection agency - USEPA, 2016. Superfund: National Priorities List (NPL) <https://www.epa.gov/superfund/> superfund-national-priorities-list-npl.

United States environmental protection agency – USEPA. ENVIRONMENTAL NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, 2008. Chicago (USA), 2008.

United States environmental protection agency, Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water, Ohio, 1998.

VAN LIEDEKERKE, M., PROKOP, G., RABL-BERGER, S., KIBBLEWHITE, M., LOUWAGIE, G. Progress in management of contaminated sites. European Commission, Joint Research Centre Reference Reports, 2014.

VRYZAS, Z.; PAPADAKIS, E. N.; ORIAKLI, K.; MOYSIADIS, T. P.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Biotransformation of atrazine and metolachlor within soil profile and changes in microbial communities. *Chemosphere*, v. 89, p. 1330-1338, 2012.

XU, Y., HE, Y., FENG, X., LIANG L., XU, J., BROOKES, P., WU, J., Enhanced abiotic and biotic contributions to dechlorination of pentachlorophenol during Fe(III) reduction by an iron-reducing bacterium *Clostridium*. *Science of the Total Environment*. Vol. 473-474, p. 215–223, 2014.

WANG, C-B.; ZHANG, W.X. Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs. *Environ. Sci. Technol.*, v. 31, p.2154–6, 1997.

WANG, T.; LU, N.; LI, J.; WU, Y. Evaluation of the potential of pentachlorophenol degradation in soil by pulsed corona discharge plasma from soil characteristics. *Environ. Sci. Technol.* v. 44, 2010

WANG, S., SIYUAN, C., WANG, Y., LOW, A., LU, Q., QIU, R. Integration of organohalide-respiring bacteria and nanoscale zero-valent iron (Bio-nZVI-RD): A perfect marriage for the remediation of organohalide pollutants?, *Biotechnology Advances*, 2016.

WCISŁO, E. BRONDER, J. BUBAK A., RODRÍGUEZ-VALDÉS E., GALLEGO J. human health risk assessment in restoring safe and productive use of abandoned contaminated sites. *Environ. Int.* 94, 436–448. 2016.

WEBER, R., GAUS, C., TYSKLIND, M., JOHNSTON, P., FORSTER, M., HOLLERT, H., HEINISCH, E., HOLOUBEK, I., LLOYD SMITH, M., MASUNAGA, S., MOCCARELLI, P., SANTILLO, D., SEIKE, N., SYMONS, R., TORRES, J.P.M., VERTA, M., VARBELOW, G., VIJGEN, J., WATSON, A., COSTNER, P., WOELZ, J., WYCISK, P., ZENNEGG, M.

Dioxin and POP contaminated sites contemporary and future relevance and challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 15, p. 363–393, 2008.

WEI, Y.T., WU, S.C., CHOU, C.M., CHE, C.H., TSAI, S.M., LIEN, H.L. Influence of nanoscale zero-valent iron on geochemical properties of groundwater and vinyl chloride degradation: a field case study. *Water Res.*, v. 44, p. 131e140, 2010.

Wu, D., Shen, Y., Ding, A., Mahmood, Q., Liu, S., Tu, Q. Effects of nanoscale zerovalent iron particles on biological nitrogen and phosphorus removal and microorganisms in activated sludge. *J. Hazard. Mater.* v. 262, p. 649–655, 2013.

YAN, W.; LIEN, H-L.; KOEL B.E.; ZHANG, W-X. Iron nanoparticles for environmental clean-up: recent developments and future outlook. *Environ. Sci.*, v. 15, p. 63–77, 2013.

YANG, C. F., LEE, C. M. Pentachlorophenol contaminated groundwater bioremediation using immobilized *Sphingomonas* cells inoculation in the bioreactor system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 152, p. 159-165, 2008.

YOSHIDA, N., YOSHIDA Y., HANDA Y., KIM H.-K.; ICHIHARA S., KATAYAMA A. Polyphasic characterization of a PCP-to-phenol dechlorinating microbial community enriched from paddy soil, *Sci. Total Environ.* v. 381, p. 233–242, 2007.

ZHANG C.; ZHANG D.; XIAO Z.; LI Z.; SUZUKI D.; KATAYAMA A. Characterization of humins from different natural sources and the effect on microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol. *Chemosphere.* v. 131, p. 110–116. 2015.

ZHANG, C., KATAYAMA, A. Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation. *Environ. Sci. Technol.*, v. 46, p. 6575–6583, 2012.

ZHANG, J., LIU, F., CHEN, R., FENG, T., DONG, S., SHEN, H. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in edible shellfish from Xiamen (China) and estimation of human dietary intake. *Food Chem. Toxicol.*, v. 50, p. 4285–4291. 2012.

ZHANG, W.; WANG, C.; LIEN, H. Catalytic reduction of chlorinated hydrocarbons by bimetallic particles. *Catal. Today*, v. 40, n. 4, p. 387–395, 1998.