



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉS FERNANDO LANCHEROS SÁNCHEZ

**FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM
BIODIESEL B10 UTILIZANDO *Canavalia ensiformis***

Londrina
2015

ANDRÉS FERNANDO LANCHEROS SÁNCHEZ

**FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM
BIODIESEL B10 UTILIZANDO *Canavalia ensiformis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Guimarães

Co-orientador: Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lancheros Sánchez, Andrés Fernando.

Fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 utilizando Canavalia ensiformis / Andrés Fernando Lancheros Sánchez. - Londrina, 2015.
114 f. : il.

Orientador: Maria de Fátima Guimarães.

Coorientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Biodiesel - Tese. 2. Biodiesel - Análise - Tese. 3. Biocombustíveis - Tese. 4. Fitorremediação - Tese. I. Guimarães, Maria de Fátima. II. Guedes, Carmen Luisa Barbosa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

ANDRÉS FERNANDO LANCHEROS SÁNCHEZ

**FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM BIODIESEL
B10 UTILIZANDO *Canavalia ensiformis***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima
Guimarães
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Osmar Rodrigues Brito
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Dionísio Borsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de março de 2015.

*Aos meus pais e meus irmãos Ginna e
Ricardo*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por abençoar cada passo que dou e ser cúmplice na realização dos meus sonhos.

Agradeço a minha família. Minha mãe que desde o céu me ilumina e protege. A Meu pai Manuel e meus irmãos Ginna e Ricardo pelo carinho, apoio incondicional na etapa da formação acadêmica e ajuda nos momentos difíceis. A meus cunhados e sobrinhos.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Guimarães pela confiança depositada para orientar sem me conhecer, pela excelente orientação, dedicação, paciência e carinho.

À Profa. Dra. Carmen Barbosa Guedes, pelos conhecimentos transmitidos, pela constante ajuda e incentivo durante minha formação como mestre.

Ao Prof. Dr. Osmar Rodrigues Brito, por todo o conhecimento de solos transmitido e por sempre mostrar interesse e ajuda com a minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato pela disponibilização dos combustíveis, ao Prof. Dr. Cássio Cavenaghi Prete pelo fornecimento do solo e das sementes, a Prof. Dra. Inés Cristina de Batista Fonseca, pelo ensinamento e auxílio na parte estatística e ao Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza pela disponibilização do equipamento de medição de área foliar.

Aos técnicos, Márcio Alves de Lima Praxedes e João Machado dos Santos do laboratório de solos; José Aparecido Rocha do laboratório de fitopatologia; Geraldo Lopes da Silva do laboratório de fitotecnia, porque sempre mostraram interesse em me ajudar.

À estagiária Daiane Caroline Alves Nunes porque, desinteressadamente e incondicionalmente, do começo ao fim, me apoiou no desenvolvimento do projeto. À estagiária Dalilla Colombo pela colaboração nas práticas experimentais.

Ao meu amigo Fabio Cajamarca pelas sugestões e a imensa ajuda nos momentos mais laboriosos do experimento. À minha amiga Catalina Bastidas Cobos pela ajuda.

Aos colegas do laboratório de solos e LAFLURPE por me auxiliarem várias vezes.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

*“A razão é o passo, o aumento da
ciência o caminho, e o benefício da
humanidade é o fim”*

Thomas Hobbes

LANCHEROS SÁNCHEZ, Andrés Fernando. **Fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 utilizando *Canavalia Ensiformis***. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O uso massificado de combustíveis, representa um problema ambiental relevante, devido aos riscos ambientais associados com derramamentos acidentais. Sua frequente introdução nos ecossistemas terrestres pode levar a efeitos tóxicos sobre as plantas, os microrganismos e a saúde humana. Dentre as técnicas utilizadas para minimizar os impactos ambientais vem-se destacando a fitorremediação, por ser uma técnica de baixo custo, fácil manejo e aplicável a grandes áreas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso da espécie vegetal *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) para remediar de um solo contaminado artificialmente com biodiesel B10, considerando a degradação da fração aromática do B10 no solo, monitorando a fertilidade, a nutrição, crescimento e produção de biomassa da planta. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, usando recipientes construídos com tubos de PVC de 15 cm de diâmetro e 30 cm de profundidade, contendo 3,5 kg de um Latossolo Vermelho argiloso sem contaminação e contaminado com 1% e 2% (m/m) de B10, sob condições naturais de luz e temperatura. Foi testada a remediação em três tratamentos de solo: controle (natural), autoclavado e cultivado, com análises em cinco épocas, no dia da instalação do experimento; e 15, 35, 55 e 75 dias depois. Em cada período o solo foi analisado em três camadas: superior (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20-30 cm). As seguintes variações foram avaliadas: a) degradação dos compostos aromáticos, determinada por espectroscopia de fluorescência *synchronous*; b) fertilidade do solo, avaliando os macronutrientes (Ca, Mg, P e K), micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn), Al, pH e carbono orgânico total (COT); c) crescimento, através da produção de biomassa seca aérea e radicular, altura, número de folhas e área foliar, além da nutrição da planta, medindo-se os teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Zn e Mn no tecido foliar. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variâncias e quando necessário as medidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As áreas integradas dos espectros *synchronous* dos extratos de solos contaminados com 1% e 2%, nos diferentes tratamentos demonstraram que houve uma degradação dos compostos aromáticos, nas três camadas do solo, superando na maioria dos casos, 90% de degradação, sendo processos viáveis na hora de remediar solos contaminados com B10 em todas as camadas. A contaminação com B10 influenciou a fertilidade do solo, reduzindo a disponibilidade de P. Para micronutrientes não foi observado comportamento bem definido. O aumento da contaminação por B10 no solo não causou diferenças significativas no teor trocável de Cu, mas, no Mn e Fe gerou um aumento e no Zn diminuição. O COT e pH no solo aumentaram na presença de B10. Os parâmetros biométricos como biomassa seca aérea, biomassa seca radicular, altura, número de folhas e área foliar diminuem significativamente quando esta espécie vegetal é cultivada em solos contaminados com 1% e 2% de B10 e quanto a nutrição da *Canavalia ensiformis* observou-se redução na absorção de P, K e Zn.

Palavras-chave: Remediação. C aromáticos. Fertilidade do solo. Feijão-de-porco.

LANCHEROS SÁNCHEZ, Andrés Fernando. **Canavalia ensiformis in the phytoremediation of soil contaminated with B10 biodiesel**. 2015. 114 p. Dissertation (Masters in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The massive use of fuels, represent a significant environmental problem, environmental risks with accidental spills. Their presence in terrestrial ecosystems can lead to toxic effects on plants, micro-organisms and human health. Among the techniques used to minimize environmental impacts, it has been emphasized in a fitoremediation, by a low cost technique, simple handling and large areas. In this context, the objective of this study is to evaluate the use of the plant species *Canavalia ensiformis* (jack bean) to remedy an artificially contaminated soil with B10 biodiesel, considering a degradation of the aromatic fraction of B10 not only by monitoring Fertility, Nutrition, growth and biomass production of the plant. The experiment was conducted in the vegetation house with a completely randomized experimental design with four replicates, using containers constructed with PVC tubes of 15 cm diameter and 30 cm depth, containing 3.5 kg of a clayey Red Latosol Contamination and contaminated with 1% and 2% (m / m) of B10, under natural conditions of light and temperature. In the case of a control problem, the control was performed by an automatic control system, E 15, 35, 55 and 75 days later. (0-10 cm), intermediate (10-20 cm) and lower (20-30 cm). The following variations were evaluated: a) degradation of aromatic compounds, determined by synchronous fluorescence spectroscopy; B) soil fertility, evaluating the macronutrients (Ca, Mg, P and K), micronutrients (Cu, Fe, Mn and Zn), Al, pH and total organic carbon (TOC); C) growth, by the production of aerial and root dry biomass, height, number of leaves and leaf area, besides the plant nutrition, being measured the contents of N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Zn and Mn in leaf tissue. The 5% probability is based on the analysis of the results obtained. As integrated areas of the synchronous spectra of the 1% and 2% contaminated soils, the different treatments showed that there was a degradation of the aromatic compounds, the three layers of soil, most of which exceeded 90% degradation. The time to remedy alone contaminated with B10 in all the layers. B10 contamination influenced soil fertility, reducing P availability. For micronutrients, the well-defined behavior was not observed. The increase in contamination by B10 not only caused no significant differences in the non-exchangeable content of Cu, but, no Mn and Fe generated an increase and no Zn decrease. The COT e pH does not increase the presence of B10. The biometric data of aerial dry biomass, dry biomass, height, leaf number and leaf area decrease when this plant species is cultivated in soils contaminated with 1% and 2% of B10 and as a nutrition of *Canavalia ensiformis* was observed in the absorption of P, K and Zn.

Key words: Remediation. Aromatic compounds. Soil fertility. Jack Bean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Reação de transesterificação.....	21
Figura 2 –	Modelo conceitual de domínios geosorventes	22
Figura 3 –	Quantitativo de acidentes registrados em 2013 pelo IBAMA, por tipo de evento.....	25
Figura 4 –	Quantitativo de acidentes ocorridos no ano de 2013 por tipo de dano causado.....	25
Figura 5 –	Fotodegradação do naftaleno em meio aquoso	27
Figura 6 –	Rotas metabólicas de biodegradação aeróbia para hidrocarbonetos	29
Figura 7 –	Técnicas usadas no tratamento de solos contaminados com combustíveis	31
Figura 8 –	Classificação das técnicas de fitorremediação.....	33
Figura 9 –	Algumas publicações, realizadas entre 2002 e 2015, sobre fitorremediação de solos contaminados com combustível diesel e afins.....	35
Figura 10 –	Variação da temperatura no período de desenvolvimento do experimento na região de Londrina.....	36
Figura 11 –	Passos para a construção dos recipientes usados no experimento	38
Figura 12 –	Esquema ilustrativo do experimento	39
Figura 13 –	Espectros de fluorescência <i>synchronous</i> de diesel, biodiesel em diclorometano (1/1000 v/v), utilizado no experimento	46
Figura 14 –	Correlação entre absorção e emissão de energia para diferentes HPAs	47
Figura 15 –	Espectros de fluorescência <i>synchronous</i> para os solos sem contaminação de B10 nas camadas, aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	47
Figura 16 –	Áreas integradas dos espectros de fluorescência, para os tratamentos do solo sem contaminação e contaminado com 1% 2% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento, nas três camadas avaliadas	48

Figura 17 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 1% de B10 na camada superior (0-10 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	49
Figura 18 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 1% de B10 na camada intermediária (10-20 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	50
Figura 19 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 1% de B10 na camada inferior (20-30 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	51
Figura 20 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 2% de B10 na camada superior (0-10 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	55
Figura 21 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 2% de B10 na camada intermediária (10-20 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	56
Figura 22 – Espectros de fluorescência synchronous para solos contaminados com 1% de B10 na camada inferior (20-30 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	57
Figura 23 – Disponibilidade de nutrientes e de Al de acordo com o pH do solo.....	73
Figura 24 – Produção de biomassa seca da parte aérea da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias	82
Figura 25 – Ilustração da produção de biomassa aérea da <i>Canavalia ensiformis</i> no dia 40 para o solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10	83

Figura 26 – Produção de biomassa seca radicular da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias	84
Figura 27 – Ilustração da produção de biomassa radicular da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10.....	85
Figura 28 – Altura da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias.....	86
Figura 29 – Ilustração da altura da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada para o solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10 aos 60 dias após a semeadura.....	87
Figura 30 – Número de folhas da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solos sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias	88
Figura 31 – Ilustração do número de folhas da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias	88
Figura 32 – Área foliar da <i>Canavalia ensiformis</i> cultivada em solo sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias.....	89
Figura 33 – Teores foliares médios de absorção de N pela <i>Canavalia ensiformis</i> para solos contaminados com B10 em três épocas de avaliação	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização granulométrica e química dos solos antes da instalação do experimento	37
Tabela 2 – Caracterização do biodiesel B100 usado no preparo do biodiesel B10.....	37
Tabela 3 – Porcentagem de degradação dos compostos aromáticos para os tratamentos de solo contaminado com 1% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	52
Tabela 4 – Porcentagem de degradação dos compostos aromáticos para os tratamentos de solo contaminado com 2% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	58
Tabela 5 – Valores médios por porcentagem de degradação para a interação entre % de contaminação de B10 no solo e o tratamento do solo aos 75 dias	59
Tabela 6 – Valores médios dos macronutrientes do solo no final do experimento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando <i>Canavalia ensiformis</i>	68
Tabela 7 – Valores médios dos micronutrientes do solo no final do tratamento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando <i>Canavalia ensiformis</i>	70
Tabela 8 – Valores médios de carbono orgânico total (COT) e pH do solo no final do tratamento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando <i>Canavalia ensiformis</i>	72
Tabela 9 – Valores médios (três repetições) para teores de macronutrientes da biomassa foliar de <i>Canavalia ensiformis</i> para diferentes concentrações de contaminação do solo com B10.....	91
Tabela 10 – Teores foliares médios (de três repetições) para micronutrientes em <i>Canavalia ensiformis</i> para diferentes níveis de contaminação do solo com B10	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
ANP	Agência Nacional de Petróleo
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xilenos.
ConA	Concanavalina A
COT	Carbono Orgânico Total
EAA	Espectrofotometria de Absorção Atômica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia.
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LFNA	Líquidos em Fase Não Aquosa aderidos ou aprisionados no solo
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Matéria Orgânica
MOS	Matéria Orgânica Sorvente
MTBE	Metil tert-butil éter
PCB	Bifenilpoliclorado
TCE	Tricloroetileno
TFSA	Terra Fina Seca ao Ar
TNT	Trinitrotolueno
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	DIESEL E BIODIESEL	20
2.2	CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR DIESEL E BIODIESEL	21
2.3	ACIDENTES AMBIENTAIS POR DERRAMAMENTO DE DIESEL E BIODIESEL	24
2.4	PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO NATURAL DE DIESEL E BIODIESEL EM SOLOS	25
2.4.1	Fotodegradação	26
2.4.2	Biodegradação	28
2.5	REMEDIÇÃO	30
2.5.1	Biorremediação	31
2.5.2	Fitorremediação	32
2.5.2.1	A planta <i>Canavalia Ensiformis</i> como fitorremediadora	34
2.6	PUBLICAÇÕES SOBRE FITORREMEDIÇÃO DE HIDROCARBONETOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	COLETA DOS MATERIAIS E CONTAMINAÇÃO DO SOLO	36
3.1.1	Preparo do Solo	36
3.1.2	Preparo do B10	37
3.1.3	Contaminação do Solo com Biodiesel B10	37
3.1.4	Recipientes com Solo Contaminado	38
3.2	ESPECIE VEGETAL CULTIVADA	38
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
3.4	CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	39
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

4	ARTIGO A: DEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO AROMÁTICA DO BODIESEL B10 EM SOLO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE E CULTIVADO COM <i>Canavalia Ensiformis</i>	41
4.1	RESUMO	41
4.2	ABSTRACT	42
4.3	INTRODUÇÃO	43
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.4.1	Análise da Frações Aromáticas	44
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.5.1	Frações Aromáticas	45
4.5.2	Degradação dos compostos aromáticos em solo contaminado com 1% de biodiesel B10	49
4.5.3	Degradação dos compostos aromáticos em solo contaminado com 2% de biodiesel B10	54
4.5.4	Análise Estatística	58
4.6	CONCLUSÕES	60
5	ARTIGO B: MONITORAMENTO DA FERTILIDADE DE UM SOLO CONTAMINADO COM BODIESEL B10 CULTIVADO COM <i>Canavalia ensiformis</i>	61
5.1	RESUMO	61
5.2	ABSTRACT	62
5.3	INTRODUÇÃO	63
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	64
5.4.1	Análises Químicas do Solo	64
5.4.1.1	Macronutrientes	64
5.4.1.1.1	Determinação de Ca^{2+} e Mg^{2+}	64
5.4.1.1.2	Determinação de Ca^{2+}	64
5.4.1.1.3	Determinação de K	65
5.4.1.1.4	Determinação de P	65
5.4.1.2	Micronutrientes	65
5.4.1.3	Leitura de pH	65
5.4.1.4	Determinação de Al trocável (Al^{3+})	65
5.4.1.5	Determinação de Carbono Orgânico Total (COT)	66
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.5.1	Macronutrientes	66
5.5.2	Micronutrientes	69
5.5.3	pH.	71
5.5.4	Carbono Orgânico Total (COT)	73
5.6	CONCLUSÕES	74

6	ARTIGO C DESENVOLVIMENTO DA <i>Canavalia ensiformis</i> EM SOLO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE COM BIODIESEL B10	75
6.1	RESUMO	75
6.2	ABSTRACT	76
6.3	INTRODUÇÃO	77
6.4	MATERIAL E MÉTODOS	78
6.4.1	Delineamento Experimental	78
6.4.2	Desenvolvimento do Experimento	78
6.4.3	Avaliações Biométricas	78
6.4.3.1	Biomassa seca aérea	78
6.4.3.2	Biomassa seca radicular	79
6.4.3.3	Altura da planta e número de folhas	79
6.4.3.4	Área foliar	79
6.4.4	Análises Químicas dos Tecidos Vegetais	79
6.4.4.1	Macronutrientes	80
6.4.4.1.1	<i>Determinação de Ca²⁺ e Mg²⁺</i>	80
6.4.4.1.2	<i>Determinação de K</i>	80
6.4.4.1.3	<i>Determinação de P</i>	80
6.4.4.1.4	<i>Determinação de S</i>	80
6.4.4.1.5	<i>Determinação de N</i>	80
6.4.4.2	Micronutrientes	81
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
6.5.1	Avaliações Biométricas	81
6.5.1.1	Produção de biomassa seca aérea	81
6.5.1.2	Produção de biomassa seca radicular	83
6.5.1.3	Altura	85
6.5.1.4	Número de folhas	86
6.5.1.5	Área foliar	89
6.5.2	Análises Químicas dos Tecidos Vegetais	90
6.5.2.1	Macronutrientes	90
6.5.2.2	Micronutrientes	93
6.6	CONCLUSÃO	95

REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	108
ANEXO A – Espectros de fluorescência <i>synchronous</i> para os solos sem contaminação de B10 na três camada avaliadas (0-10, 10-20, 20-30 cm), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento	109
ANEXO B – Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos aos 0, 15, 35, 55 e 75 após a instalação do experimento	112

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas da sociedade atual é a contaminação ambiental, decorrente do uso inadequado dos recursos naturais, ineficiência na legislação e falta de consciência ambiental (CORRER et al., 2007).

A atividade petrolífera é um dos fatores de maior risco para o meio ambiente, porque pode contaminar ecossistemas terrestres e aquáticos ao longo da cadeia de produção. Essa contaminação afeta a saúde humana, diminui a qualidade dos recursos hídricos, restringe o uso do solo e produz danos à biota. Dos produtos desta atividade destaca-se o diesel, pois é o combustível derivado de petróleo comercializado em maior escala no Brasil constituindo-se como o principal combustível dentro da matriz energética nacional (TRAMONTINI, 2013) e responsável pela maioria dos acidentes ambientais.

Devido às consequências ambientais que o uso massificado dos combustíveis de origem fóssil gera, a energia renovável proveniente da biomassa tem ocupado um espaço importante a nível nacional e mundial. A partir da biomassa pode-se obter biocombustíveis, como o biodiesel. O biodiesel é uma mistura de mono-alquil ésteres obtida a partir de fontes renováveis, que apresenta vantagens sobre o diesel de petróleo, pois não é tóxico, melhora a qualidade das emissões durante o processo de combustão, apresenta maior viscosidade proporcionando maior lubricidade reduzindo o desgaste das partes móveis do motor (LOBO; FERREIRA; DA CRUZ, 2009), e, estimula o agronegócio e a geração de empregos. Atualmente a legislação brasileira regula a mistura de diesel (94%) com biodiesel (6%) buscando minimizar a contaminação produzida pelo uso dos combustíveis. O aumento da produção e consumo de biodiesel tem motivado os pesquisadores a avaliar os riscos e efeitos do diesel no ambiente (MORAIS et al., 2012).

O excessivo transporte rodoviário desses combustíveis tem gerado acidentes com derramamento no solo. Segundo o relatório apresentado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no ano de 2011, do total dos acidentes, 26,5% corresponde a líquidos inflamáveis, dos quais, o diesel ocupa a maior porcentagem correspondente a 44,5%.

As técnicas mais empregadas para a remediação de solos contaminados por combustíveis são: química (oxidação química in-situ), biológica (atenuação natural e biorremediação) e física (extração dos vapores do solo)

(ANDRADE et al., 2010), porém, estas técnicas são muito caras e podem alterar a fauna e a flora presentes no solo. Assim, a pesquisa tem buscado encontrar novos métodos de tratamento que sejam mais baratos e eficientes, dentre os quais, destaca-se a fitorremediação.

A fitorremediação define-se como a tecnologia que envolve o cultivo de plantas que podem degradar, reter, imobilizar ou reduzir os contaminantes ambientais, a níveis não tóxicos em solos ou águas. (USEPA, 2000).

Devido aos riscos ambientais produzidos pelos derramamentos de combustíveis misturados com biocombustíveis, o presente estudo tem como objetivo avaliar a fitorremediação de solos contaminados com biodiesel B10 usando *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco).

Para o desenvolvimento do estudo, foram estabelecidos três objetivos específicos (representados em artigos): a) avaliar a degradação da fração aromática de diesel de petróleo contendo 10% de biodiesel, em solo contaminado artificialmente e cultivado com *Canavalia ensiformis*; b) monitorar a fertilidade do solo, pela avaliação dos macronutrientes (Ca, Mg, P e K), micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn), Al e pH, durante o tratamento de fitorremediação para solo contaminado com B10; c) verificar o efeito de nutrição, capacidade de crescimento e geração de biomassa da *Canavalia ensiformis* em um solo não contaminado e contaminado com B10.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIESEL E BIODIESEL

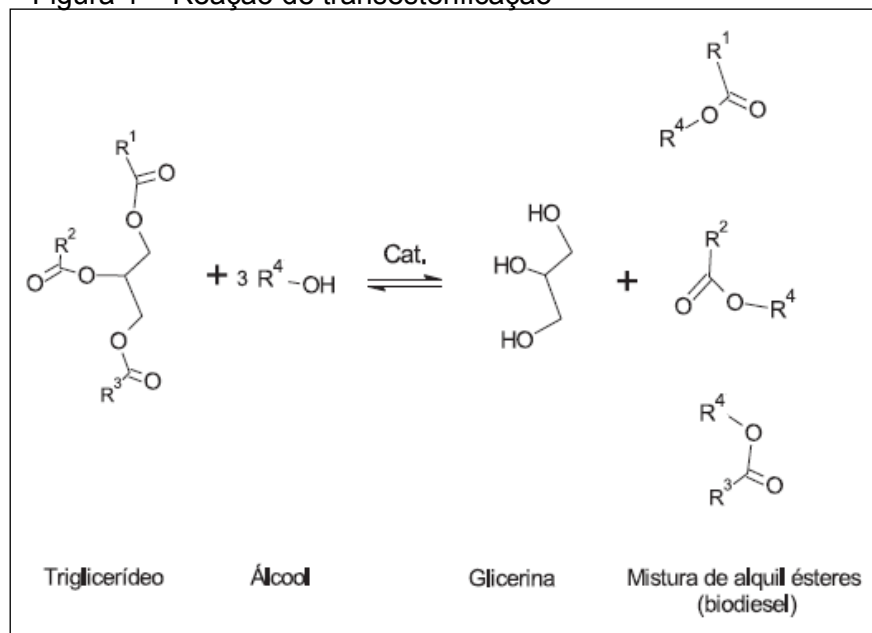
O diesel é um combustível derivado do petróleo, composto por uma complexa mistura de parafinas, cicloalcanos, compostos aromáticos e pequenas quantidades de moléculas de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio. (CHANDRAN; DAS, 2011). A fração aromática contém benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX), compostos que possuem só um anel aromático, e os Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que possuem dois ou mais anéis benzênicos na sua estrutura (PEREIRA et al., 2000). Existem mais de 100 tipos diferentes de HPAs no estado líquido ou sólido, apresentando ponto de ebulição superior a 80°C a pressão atmosférica normal, considerados como compostos de alto risco para a saúde pela sua elevada toxicidade e por serem potencialmente carcinogênicos e mutagênicos (ANDREONI et al., 2004), principalmente os compostos tri, tetra, penta e hexacíclicos. Os HPAs de alta massa molar são dificilmente degradáveis e tendem a se acumular no ambiente por longos períodos de tempo devido a sua estabilidade química.

O biodiesel é um combustível ou aditivo renovável, biodegradável e não tóxico, composto de uma mistura de mono-alquil ésteres de cadeia longa, obtida a partir do craqueamento, esterificação de ácidos graxos e/ou transesterificação de triglicerídeos de óleos vegetais ou gorduras animais, que atenda as especificações contidas no regulamento técnico nº 4/2012 da ANP. (MA; HANNA, 1999; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

A transesterificação é uma reação química de um óleo vegetal ou gordura animal com um álcool, usualmente metanol, em presença de um catalisador, geralmente uma base forte como hidróxido de sódio ou potássio, produzindo ésteres mono-alquílicos de ácidos graxos e o glicerol como co-produto. (Figura 1) (MAIA et al., 2011).

Ao se comparar com o diesel de petróleo, o biodiesel apresenta baixas emissões de monóxido de carbono e material particulado; minimiza o efeito estufa porque o dióxido de carbono produzido durante a combustão do biodiesel pode ser reciclado pela fotossíntese, diminui as emissões de óxidos sulfurados, pois não contem enxofre na sua estrutura e proporciona propriedades lubrificantes reduzindo o desgaste do motor (ZHANG et al., 2003).

Figura 1 – Reação de transesterificação



Fonte: Lobo Ferreira e Cruz (2009)

No mundo inteiro, há alguns anos está-se tornando cada vez mais comum a mistura diesel/biodiesel. Na Europa, desde janeiro de 2004, o diesel pode ter até 5% de biodiesel (OWSIANIAK et al., 2009), essas misturas são designadas pela abreviação BX onde, B indica biodiesel, e X a porcentagem de biodiesel na mistura.

No Brasil, a mistura de diesel com biodiesel tornou-se obrigatória a partir da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Essa lei propôs o uso opcional de B2 até o início de 2008, quando passou a ser obrigatória. Entre 2008 e 2013, podiam ser usadas misturas com até 5% de biodiesel. A partir de 2013 o uso do B5 passou a ser obrigatório (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). Há previsão de que se possa chegar até a uma mistura B20 (80% de diesel e 20% de biodiesel) até 2018 (REGINATTO et al., 2012)

2.2 CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR DIESEL E BIODIESEL

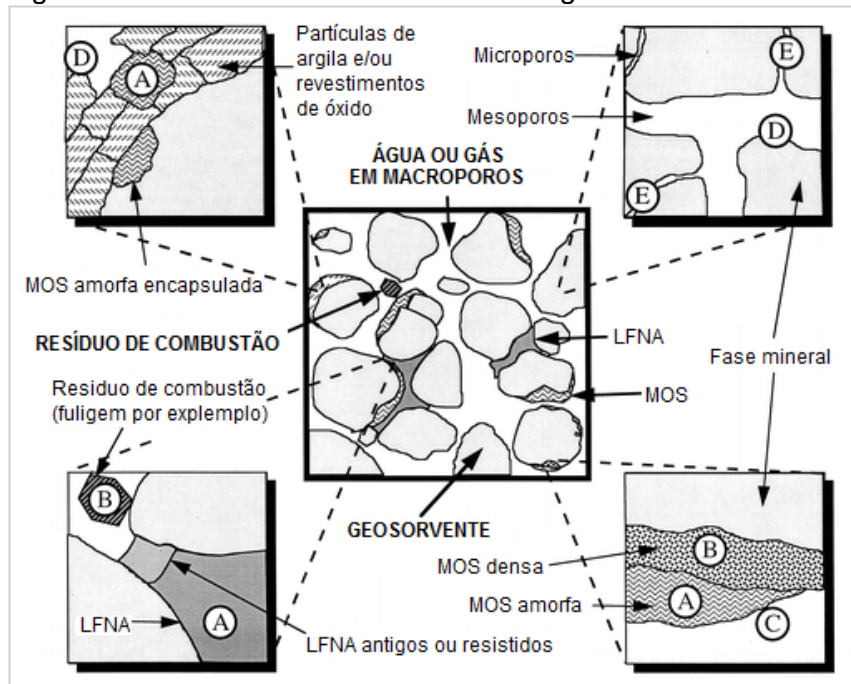
A contaminação do solo pode ser descrita como a acumulação de materiais que afetam os processos naturais entre a matéria e a energia e que são prejudiciais para os organismos (LAPINSKIENĖ; MARTINKUS; RĒBŽDAITĒ, 2006). A contaminação com diesel e outros derivados de petróleo tem se tornado um importante foco de pesquisa, pois, além do solo tornam-se a longo prazo fonte potencial de contaminação dos aquíferos (ZHOU; CRAWFORD, 1995).

A interação do diesel com o solo é influenciada por diversos fatores, tais como: tamanho dos poros, estrutura, quantidade e natureza da matéria orgânica, constituintes inorgânicos e a quantidade de combustível contaminante (REID; JONES; SEMPLE, 2000).

Luthy et al. (1997) propuseram um modelo conceitual (figura 2) do mecanismo pelo qual os componentes do solo agem para o sequestro (difusão, adsorção e/ou partição) dos compostos orgânicos presentes nos combustíveis. No modelo, geosorvente refere-se a qualquer tipo de solo e/ou sedimento, não fazendo distinção entre tipos de solo. LFNA são os líquidos em fase não aquosa aderidos ou aprisionados, por exemplo, alcatrão, solventes e óleos. MOS é a matéria orgânica sorvente. Os resíduos de combustão e partículas de carbono (fuligem e cinzas) também podem atuar como absorventes.

Na Figura 2, as letras indicam uma comparação qualitativa das hipóteses dos mecanismos e das observações macroscópicas, sendo útil para avaliar o processo da sorção dos compostos orgânicos não polares com os geosorventes.

Figura 2 – Modelo conceitual de domínios geosorventes



A: carbono orgânico amorfo; B: carbono orgânico condensado; C: adsorção não polar em superfícies orgânicas heterogêneas; D: superfícies hidrófilas minerais; E: superfícies hidrofóbicas microporosas de minerais; LFNA: líquidos em fase não aquosa aderidos ou aprisionados; MOS: matéria orgânica sorvente.

Fonte: Adaptado de Luthy et al. (1997).

A cinética de troca revela que as associações surgem principalmente das interações de fisissorção (sem alteração da espécie química absorvida) em vez de quimissorção. A absorção na matéria orgânica natural amorfa (casos A, C, e D) ocorre rapidamente, segundos ou minutos, com baixa energia de ativação e possibilidade de alta extração com solventes. No entanto, a absorção em matéria orgânica condensada (caso B) ou a difusão em regiões minerais microporosas hidrofóbicas (caso E), requer maior tempo, inclusive dias. As diferenças estéricas são importantes, a energia de ativação é alta e a extração com solvente é baixa.

A persistência dos contaminantes orgânicos (como o diesel e o biodiesel) no solo depende de vários fatores, incluindo as características do solo, propriedades do contaminante e fatores ambientais, como temperatura, radiação solar e precipitação (REID; JONES; SEMPLE, 2000).

Para Pezeshki et al. (2000) a granulometria e a matéria orgânica do solo (areia, argila, silte) influenciam o grau de degradação dos combustíveis. Assim, os substratos arenosos permitem uma penetração mais rápida e profunda que substratos de textura fina como as argilas.

A matéria orgânica representa os constituintes orgânicos do solo, incluindo resíduos de plantas e animais em vários estágios de decomposição química, física e microbiológica. As substâncias húmicas, constituídas por três frações operacionalmente definidas como ácido fúlvico (AF), ácido húmico (AH) e humina, são as responsáveis pela sorção de compostos aterogênicos no solo (FERREIRA et al., 2004)

Como o óleo diesel é um derivado do petróleo, é constituído por componentes que apresentam diferentes pressões de vapor. As taxas de volatilização para cada componente diferem, de modo que, os mais voláteis irão se difundir pelos poros do solo. Os componentes não volatilizados permanecerão no solo, constituindo a contaminação (FINE et al., 1997).

Para Andrade (2007), os principais impactos dos combustíveis fósseis nos ecossistemas terrestres são:

- Aumento de temperatura, especialmente nas regiões do ártico e tropical, gerando um déficit hídrico e redução no crescimento das plantas.
- Perda da capacidade de retenção de água, tornando o solo hidrofóbico e hidro-repelente.

- Condições anaeróbias pelo aumento da demanda por oxigênio, reduzindo a degradação microbiana e conduzindo a persistência do óleo no solo.

Além disso, o óleo produz um efeito negativo nas plantas, desintegrando as membranas celulares e a morte da mesma, diminuindo o intercâmbio gasoso e inibindo a germinação da semente (SANGABRIEL et al., 2006). Segundo Ogbo (2008), o óleo diesel em concentrações relativamente baixas é fitotóxico.

O biodiesel tem sido usado como substituto do diesel, ou como aditivo de combustíveis, e além das vantagens bem conhecidas, o biodiesel apresenta rápida degradação no ambiente. Em meio aquoso depois de 28 dias a degradação atinge 95% (MUDGE; PEREIRA, 1999).

As misturas de biodiesel com diesel de petróleo promovem uma rápida biodegradação no solo e uma toxicidade um pouco inferior em organismos aquáticos. Em geral, o biodiesel tem sido reportado como uma mistura ambientalmente correta para ajudar a remediar os HPAs, o alcatrão, o petróleo bruto e o óleo combustível pesado (PRINCE; HAITMANEK; COYLE, 2008).

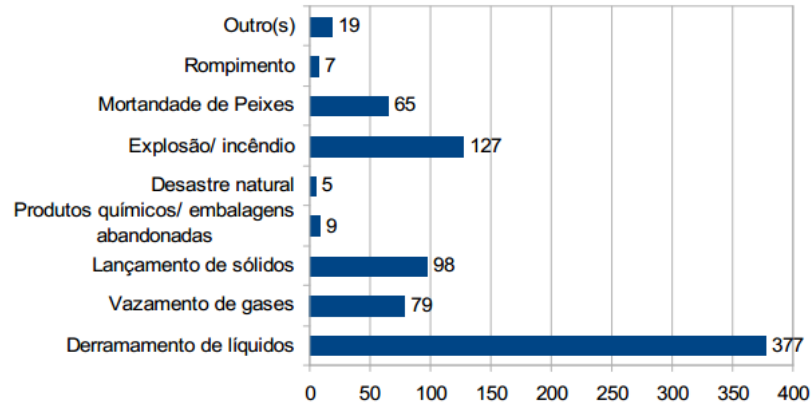
2.3 ACIDENTES AMBIENTAIS POR DERRAMAMENTOS DE DIESEL E BIODIESEL

Nas últimas décadas houve um aumento significativo dos acidentes por vazamento ou derramamento de combustíveis durante sua exploração, refinamento, transporte e armazenamento (CHAGAS-SPINELLI et al., 2012).

No Brasil, o relatório de acidentes ambientais de 2013 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), apresenta a figura 3, que evidencia que o derramamento de líquidos é o principal evento ocorrido nos acidentes ambientais desde 2006. No ano 2013 registraram-se 377 derramamentos de líquidos, que corresponde a 51,5% do total de registros.

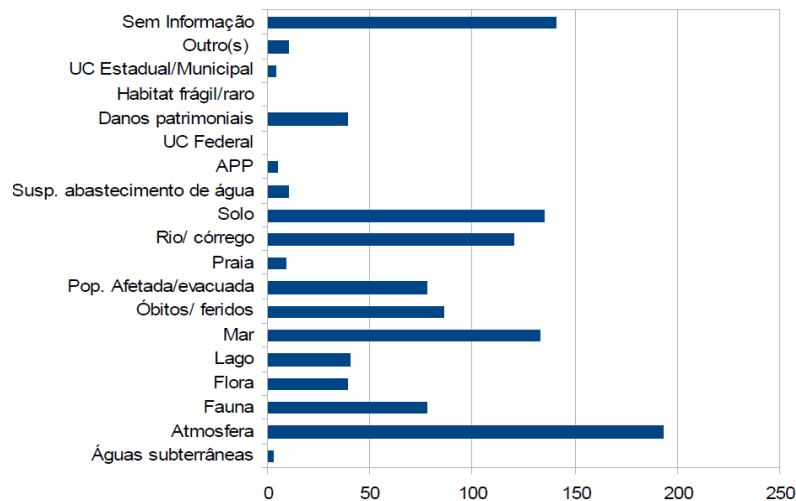
Dos líquidos vazados, os principais produtos foram os inflamáveis. O óleo diesel tem um destaque especial por ser o segundo produto com maior número de acidentes ocorridos, mais de 472,53 m³ derramados. Dos acidentes ambientais ocorridos os danos principais afetaram a atmosfera, o solo, os rios e mares (figura 4). O principal local em que acontecem este tipo de acidente são as rodovias (27% do total de casos).

Figura 3 – Quantitativo de acidentes registrados em 2013 pelo IBAMA, por tipo de evento



Fonte: IBAMA (2013)

Figura 4 – Quantitativo de acidentes ocorridos no ano 2013 por tipo de dano causado



Fonte: IBAMA (2013)

2.4 PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO NATURAL DE DIESEL E BIODIESEL EM SOLOS

O diesel é composto de hidrocarbonetos que estão na faixa de C8 até C26, podendo apresentar de 60-90% de alcanos e cicloalcanos, menos de 5% de alcenos e de 10-30% de compostos aromáticos (AL-BALDAWI et al., 2013). Os compostos aromáticos do diesel, como os BTEX e os HPAs, podem causar sérios danos ao meio ambiente, devido a sua toxicidade, persistência e bioacumulação (SHUTTLEWORTH; CERNIGLIA, 1999). Dependendo do local (solo ou água) e da profundidade onde estiverem, esses compostos orgânicos podem sofrer alterações resultantes de reações químicas, biológicas ou fotoquímicas sendo, a

fotodegradação e biodegradação os processos com maior capacidade de remediar o ambiente.

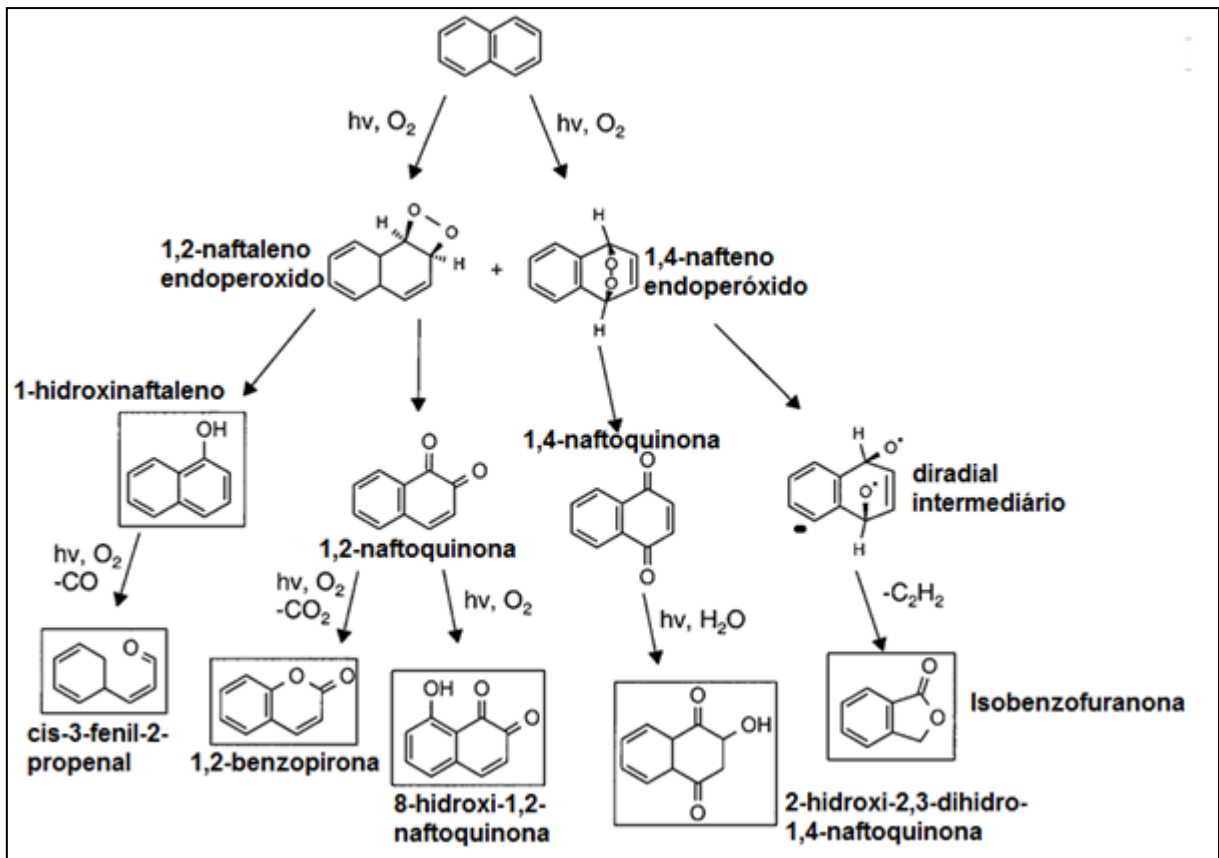
2.4.1 Fotodegradação

Para Dabrowska, Kot-Wasik e Namieśnik (2004), a fotodegradação, define-se como uma “reação química que ocorre sob a influência de fótons ou da luz, que pode ter lugar na atmosfera e na superfície da água ou do solo”, sua eficiência depende da intensidade da radiação Ultra Violeta (UV), que por sua vez, depende de vários fatores como: época do ano, hora do dia, latitude, altitude, densidade do ar, entre outros.

“Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes no óleo diesel, absorvem fortemente na região UV, maior que 300 nm (presente na radiação solar), e muitos deles são rapidamente foto-oxidados” (LOPES; ANDRADE, 1996), ou seja, atuam ao mesmo tempo como sensibilizadores e substratos nas reações de fotodegradação. Segundo a IUPAC, os sensibilizadores são substâncias capazes de absorver radiação e produzir alterações fotoquímicas ou fotofísicas das espécies circundantes (BRASLAVSKY, 2007), como é o caso do oxigênio, que passa do estado triplete ao estado singlete. O oxigênio singlete reage com as duplas ligações presentes nos compostos aromáticos induzindo à formação de endoperóxidos, que a sua vez reagem fotoquimicamente, para obter produtos finais como aldeídos, álcoois, entre outros. Na figura 5 estão apresentadas as reações de fotodegradação do naftaleno.

A degradação do biodiesel depende da natureza dos ácidos graxos utilizados na sua produção, do grau de insaturação dos ésteres que o compõem, da umidade, da temperatura e da luz (LEITE, 2007). Existem dois mecanismos que explicam a oxidação. O primeiro é conhecido como fotoxidação, o qual é promovido principalmente pela radiação UV em presença de fotosensibilizadores (clorofila e outros pigmentos presentes nas espécies vegetais) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete, gerando o estado singlete, este último, reage com as duplas ligações presentes nos ésteres por adição levando à formação de hidroperóxidos, que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 5 – Fotodegradação do naftaleno em meio aquoso



Fonte: Adaptado de McConkey (2002)

O segundo mecanismo é a autooxidação que foi apresentado por Frankel (1980), este processo está associado à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia que ocorre em três etapas: 1. Iniciação: ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz, calor ou presença de um metal; 2. Propagação: os radicais livres que são prontamente suscetíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes, os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico; 3. Término: dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (RAMALHO; JORGE, 2006).

2.4.2 Biodegradação

A biodegradação é a transformação catalisada biologicamente de um composto a formas mais simples. O processo de metabolização de compostos orgânicos que utiliza o oxigênio como receptor final de elétrons, é chamado de respiração aeróbica e pode provocar a mineralização dos poluentes, conduzindo à formação de CO₂, H₂O e biomassa (CHANDRAN; DAS, 2011; CHAPELLE, 1993). A biodegradação anaeróbia é limitada, e ocorre sob condições anóxicas. Nestas situações os microorganismos fazem uso das substâncias inorgânicas como receptores de elétrons, dando início à biodegradação anaeróbica dos contaminantes. Os compostos orgânicos são sucessivamente oxidados, sendo que os produtos de cada etapa da oxidação atuam como substratos nas etapas seguintes, até que a matéria orgânica seja completamente degradada a biogás como CO₂, metano, H₂S e umidade (CRUZ; MARSALOLI, 2012).

Os hidrocarbonetos no ambiente, geralmente são degradados por bactérias, leveduras e fungos. Muitos cientistas relatam que populações mistas são necessárias para aumentar a capacidade enzimática e assim, conseguir degradar misturas complexas como o petróleo e seus derivados (DAS; CHANDRAN, 2011).

A taxa de biodegradação dos combustíveis no solo, depende de vários fatores. Os mais importantes são a composição e a biodegradabilidade do combustível. Os fatores físicos como a temperatura afeta a química do combustível e a fisiologia e diversidade dos microorganismos. Comumente, a degradação é proporcional ao aumento da temperatura. Nutrientes como nitrogênio, fósforo, e em alguns casos, o ferro, aumentam a biodegradação, porém as concentrações excessivas tem efeito contrário (DAS; CHANDRAN, 2011).

Na figura 6 apresenta-se a via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos por microorganismos aeróbios. Os alcanos de cadeias curtas, menores que C₉, são tóxicos para a maioria dos microorganismos, mas evaporam-se rapidamente nos locais de contaminação, enquanto que os alcanos de cadeias longas de C₁₀-C₂₄ são rapidamente degradados (FRITSCHER; HOFRICHTER, 2000)

2.5 REMEDIAÇÃO

Várias técnicas de remediação físicas, químicas e biológicas estão sendo estabelecidas visando a restauração de locais impactados por combustíveis fósseis e biocombustíveis, sendo usadas isoladamente ou em conjunto para restabelecer os níveis de segurança aceitáveis, de acordo com a legislação vigente de cada país (ZHU; LU; ZHANG, 2010)

A legislação brasileira que regula a contaminação por hidrocarbonetos de solos e águas subterrâneas é recente e foi lançada em 28 de dezembro de 2009 (Resolução nº 420). A lei dispõe critérios e apresenta valores orientadores para a qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

O sucesso do tratamento de um local contaminado depende da escolha adequada, desenho, e do ajuste das operações tecnológicas de remediação com base nas propriedades dos contaminantes e dos solos. Escolher um tratamento apropriado é muito difícil, mas, extremamente importante (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004).

De acordo com Castelo-Grande, Augusto e Barbosa (2015), as técnicas de remediação de solos são classificadas em duas categorias, as denominadas *in situ*, que são empregadas no próprio local contaminado; e as *ex situ*, na qual o material contaminado é removido para realizar o tratamento em outro local. Uma segunda classificação pode ser feita levando em consideração a ação usada na remediação, sendo estas divididas em biológicas, físicas, químicas e térmicas, que podem ser usadas individualmente ou em conjunto para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004). Na figura 7, estão apresentadas as técnicas usadas no tratamento de solos contaminados com combustíveis.

Alguns dos métodos biológicos incluem o uso de biossurfactantes, biosuspensão, bioacumulação e fitorremediação. As técnicas químicas, baseiam-se na extração com dissolventes, e, no uso de: tensoativos, dióxido de cloro, oxidação catalisada por peróxido de hidrogênio, etc. Os métodos físicos aplicam técnicas como o ultrassom, difusão de oxigênio, entre outras (PIETROLETTI et al., 2010).

Figura 7 – Técnicas usadas no tratamento de solos contaminados com combustíveis

	TIPO DE TRATAMENTO	TÉCNICA
<i>In situ</i>	Biológico	Biorremediação
		Bioventilação
	Físico/químico	Lavagem de solo
		Extração de vapores SVE
	Térmico	Reforço térmico SVE
		Vitrificação
<i>Ex situ</i>	Biológico (assumindo escavação)	Compostagem
		Controle da fase sólida
		Técnica Agrária
	Físico/químico (assumindo escavação)	Oxido-redução
		Lavagem de solo
		Extração de vapores SVE
		Extração por solventes
	Térmico (assumindo escavação)	Dessorção térmica. Alta temperatura
		Dessorção térmica. Baixa temperatura
		Incineração
		Pirólise
		Vitrificação
		Atenuação natural

Fonte: Adaptado de USEPA (1994)

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010), a técnica de incineração apresenta os maiores custos de tratamento de solos contaminados com petróleo e derivados. Dependendo do combustível, o custo total do tratamento pode alcançar US\$ 2665 por m³. O contrário acontece com a biorremediação que oferece o menor custo de tratamento.

A remediação usando a técnica bioquímica para o tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem sido utilizada amplamente em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá e vários da Europa. No Brasil, poucos casos práticos tem sido executados, permanecendo relegados ainda ao campo da teoria. (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

2.5.1 Biorremediação

A Biorremediação é o processo que utiliza microrganismos, fungos, plantas para degradar e transformar resíduos orgânicos em formas menos tóxicas, a níveis abaixo dos limites de concentração permitidos pelas autoridades (JUWARKAR; SINGH; MUDHOO, 2010; MEGHARAJ et al., 2011).

Os microrganismos usam o resíduo orgânico persistente como fonte de energia e através de vias metabólicas promovem reações químicas que transformam esses compostos em subprodutos mais facilmente degradáveis. A

biodegradação completa de um substrato leva a formação de compostos químicos simples como CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{-2} , PO_4^{-2} e biomassa microbiana. (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; MEGHARAJ et al., 2011).

Existem vários fatores que afetam a biorremediação, entre esses, “a existência de uma população microbiana capaz de degradar os poluentes; a disponibilidade de contaminantes para a população microbiana; e fatores ambientais como, tipo de solo, temperatura, pH, presença de oxigênio e nutrientes” (VIDALI, 2011; WILSON; JONES, 1993).

2.5.2 Fitorremediação

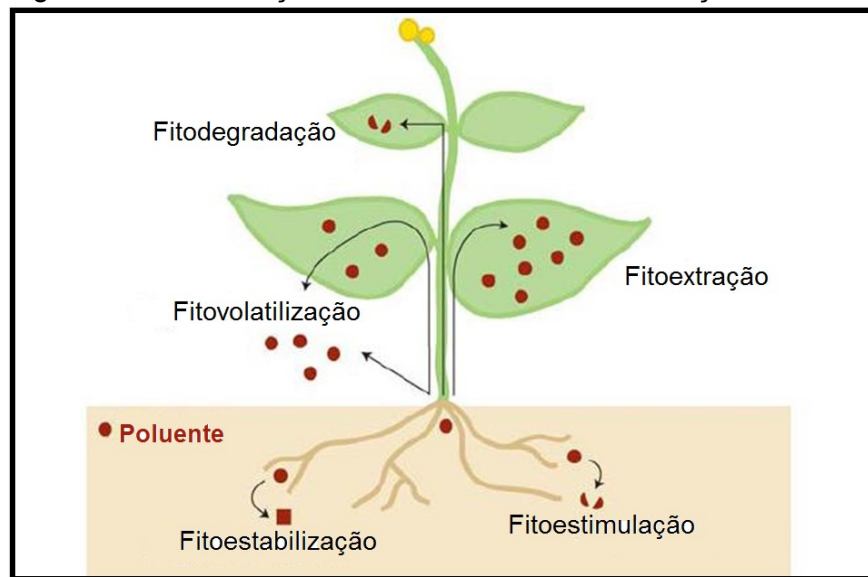
A fitorremediação define-se como a tecnologia que envolve o emprego de plantas vivas e microrganismos associados, que permite a degradação, retenção, imobilização ou redução de contaminantes ambientais, a níveis não tóxicos, em solos ou águas (PILON-SMITS, 2005; USEPA, 2000).

De acordo com Andrade, Tavares e Mahler (2007), a fitorremediação é comumente dividida em 5 técnicas, classificadas de acordo ao destino do contaminante (Figura 7)

- Fitoextração: armazenamento no tecido vegetal, permitindo a eliminação ou reciclagem.
- Fitotransformação ou fitodegradação: transformação no interior da planta ou em sua superfície, passando a formas menos tóxicas (catabolismo ou anabolismo)
- Fitovolatilização: conversão em forma volátil, liberada na atmosfera.
- Fitoestimulação: estimulação a biodegradação microbiana mediante exsudatos radiculares.
- Fitoestabilização: imobilização por meio de sua lignificação ou humificação.

A fitorremediação tem sido reconhecida como uma tecnologia vantajosa na remoção de poluentes orgânicos do solo, em comparação com tecnologias de recuperação físico-químicas, devido ao seu menor custo e pelas características ambientalmente amigáveis (WANG et al., 2011). As plantas florestais além do tratamento fitocorretivo, apresentam a vantagem de ter elevada produção de biomassa, podendo ser usadas eventualmente na produção de energia (SLOBODANKA et al., 2009).

Figura 8 – Classificação das técnicas de fitorremediação



Fonte: Adaptado de Pilon-Smits (2005)

Além disso, o uso da fitorremediação promove a reabilitação da estrutura, da fertilidade e da ecologia do solo, aumentando a quantidade de carbono orgânico, a porosidade e a infiltração da água, reduzindo a erosão. As plantas permitem trocas gasosas no solo e o desenvolvimento dos microrganismos, podendo estes atuarem como biorremediadores (MARQUES; AGUIAR; SILVA, 2011).

Poluentes orgânicos tem sido fitorremediados com sucesso, incluído solventes orgânicos como o tricloroetileno (TCE), herbicidas, como a atrazina, explosivos como o trinitrotolueno (TNT), o metil tert-butil éter (MTBE), o bifenilpoliclorado (PCB), e hidrocarbonetos de petróleo, como os BTEX e os HPAs (PILON-SMITS, 2005; WANG et al., 2011).

A escolha das plantas deve obedecer alguns critérios: a) identificar as espécies que sejam tolerantes ao contaminante, essa análise pode ser feita por meio da taxa de germinação, produção de biomassa e profundidade alcançada pelas raízes; b) as condições locais, como o solo, o clima, a radiação e as precipitações deve ser favoráveis para o desenvolvimento da planta; c) além de ser tolerante com o contaminante, a planta selecionada deve apresentar potencial para diminuir a sua concentração (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2007; MARQUES; AGUIAR; SILVA, 2011).

Dentre as espécies vegetais com potencial para remediar solo contaminado com petróleo e hidrocarbonetos, destacam-se algumas gramíneas e leguminosas (KAIMI; MUKAIDANI; TAMAKI, 2007).

2.5.2.1 A planta *Canavalia Ensiformis* como fitorremediadora

A *Canavalia ensiformis* (L.) DC, conhecida no Brasil como feijão-de-porco, é uma leguminosa originária da parte ocidental da Índia e da América Central (ANCONA; GUERRERO; HERNÁNDEZ, 1997). Seu crescimento é herbáceo, ereto, atingindo de 1,2 m até 1,5 m de altura; folhas alternadas, trifolioladas; folíolos elíptico-ovais, de cor verde-escura; inflorescências em racemos largos e nodosos; flores de cor violácea ou roxa; vagem linear comprida de 30-35 cm coriácea, bivalva com estrias longitudinais, com 12 a 18 sementes; sementes grandes, de forma arredondada-ovalada, de cor branca ou rosada (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988).

A *Canavalia ensiformis* é pouco exigente em condições de fertilidade dos solos, adapta-se a solos argilosos e arenosos, resistente a altas temperaturas e à seca e tolera relativamente bem o sombreamento. Seu crescimento inicial é rápido, e, é indicada como cobertura verde em cultura perene e no controle de invasoras (EMBRAPA, 2000). Destaca-se como adubo verde por estabelecer simbioses com rizóbios, e assim, fixar N atmosférico, com quantidade que oscilam entre 100-200 kg por hectare (MARTIN et al., 2012).

O extrato das sementes de feijão-de-porco é uma fonte alternativa potencial de nutrientes para animais, pois, contem em torno de 300 g de proteína crua e 600 g de carboidratos por cada kg de matéria seca (UDEDIBIE; CARLINI, 1998). No entanto, seu uso tem sido dificultado devido à presença de uma toxina, a concanavalina A (ConA), que é uma lectina (CARLINI; GUIMARÃES, 1981; MENDEZ et al., 2004).

Há um grande número de pesquisas com a *Canavalia ensiformis*, dentre as quais destaca-se o uso da sua semente como bioinseticida (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; DEFFERRARI et al., 2011; MULINARI et al., 2007), e como alimento animal, quando detoxificadas (LEÓN et al., 1998; D'MELLO; WALKER, 1991).

2.6 PUBLICAÇÕES SOBRE FITORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Na Figura 9 mostram-se algumas publicações realizadas entre 2002 e 2015, sobre fitorremediação de solos contaminados com combustível diesel e afins, destacando-se os resultados de % de degradação, produção de biomassa seca aérea, biomassa seca radicular, área foliar e altura.

Figura 9 – Algumas publicações, realizadas de 2002 até 2015, sobre fitorremediação de solos contaminados com combustível diesel e afins

Ano	País	Contaminante	Espécies	Tempo de experimentação (dias)	Concentração do contaminante (mg L ⁻¹)	% degradação do contaminante	Biomassa Aérea (seca)	Biomassa Radicular (seca)	Área Foliar	Altura (cm)	Fonte
2002	Finlândia	Diesel	Mistura <i>Trifolium repens</i> e <i>Pisum sativum</i>	60	5000	61 sem uso de fertilizante	< 67%	-	-	-	Palmroth, Pichte e Puhakka (2002)
2003	Escócia	Diesel	<i>Vicia sativa</i> e <i>Lolium multiflorum</i>	120	5000, 1000, 15000	98,5-100	<28-72%	> <	-	> <	Adam e Duncan (2003)
2004	México	HTP	<i>Cyperus laxus</i>	120	5000	85 só pela planta	-	-	-	-	Escalante-Espinosa et al. (2005)
2006	México	Óleo Combustível	3 Leguminosas e 3 Gramíneas	90	50000	<	> <	> <	-	<10,6-37,5	Sangabriel et al. (2006)
2006	Canadá	Diesel	<i>Bromus inermis</i> Leys.	224	13340 e 26680	NS	S	S	-	-	Dickinson e Rutherford (2006)
2007	México	Óleo Combustível	<i>Phaseolus coccineus</i>	90	50000	NS	< 53%, S	<66%, S	-	< 15,3%	Ferrera-Cerrato et al. (2007)
2007	Japão	Diesel	20 espécies	141	9800	5-66	S	-	S	-	Kaimi, Mukaidani e Tamaki (2007)
2008	China	Diesel	<i>Astragalus adsurgens</i>	730	0, 2000, 5000, 10000, 30000, 50000	62-88 HTP 57-70 FA	-	-	-	NS	Lin et al. (2008)
2008	China	Diesel	<i>Juncus roemerianus</i>	365	20000, 4000, 80000, 160000	84-100 HPAs	S	NS	-	-	Lin e Mendelssohn (2009)
2010	Irã	Petróleo	<i>F. arundinacea</i> Schreb <i>F. pratensis</i> Huds	210	4.700 HTP 8.5 HPAs	64-72 HTP 80-84 HPA	-	-	-	-	Soleimani et al. (2010)
2010	China	Petróleo	<i>Pharbitis nil</i> L	127	5000, 10000, 20000, 40000	27,63-67,42	NS	NS	-	-	Zhang et al. (2010)
2010	Austrália	Diesel	<i>Brachiaria Decumbens</i> , <i>Cymbopogon ambiguus</i> , <i>Microlaena stipoides</i>	100	10000	50-88	-	-	-	-	Gaskin e Bentham (2010)
2012	Brasil	Petróleo	<i>Glycine max</i> <i>Brachiaria brizantha</i>	60	30000	-	S	S	S	S	Aguiar et al. (2012)
2012	Rússia	Diesel	Espécies de <i>Poaceae</i> e <i>Fabaceae</i>	70	10000	32-55 Milho (55)	<63-97	<26-90	-	-	Muratova et al. (2012)
2013	Malásia Iraque	Diesel	<i>Scirpus grossus</i>	72	8700 17400	70 80,2	-	-	-	-	Al-Baldawi et al. (2013)
2014	Colômbia	Petróleo	<i>Canavalia ensiformis</i>	120	27647	57,38 HTP	-	-	NS	NS	Ramirez e Dussan (2014)
2015	Egito	Petróleo	<i>Bassia scoparia</i>	150	10000	57,7 Natural 51,1 Esterilizado	-	-	-	-	Moubasher et al. (2015)

HTP: Hidrocarbonetos Totais do Petróleo, FA: Fração aromática, NS: Não significativo ($p>0,05$), S: Significativo ($p<0,05$), <: Diminuição, >: Aumento. Obs: Nenhum trabalho avaliou número de folhas.

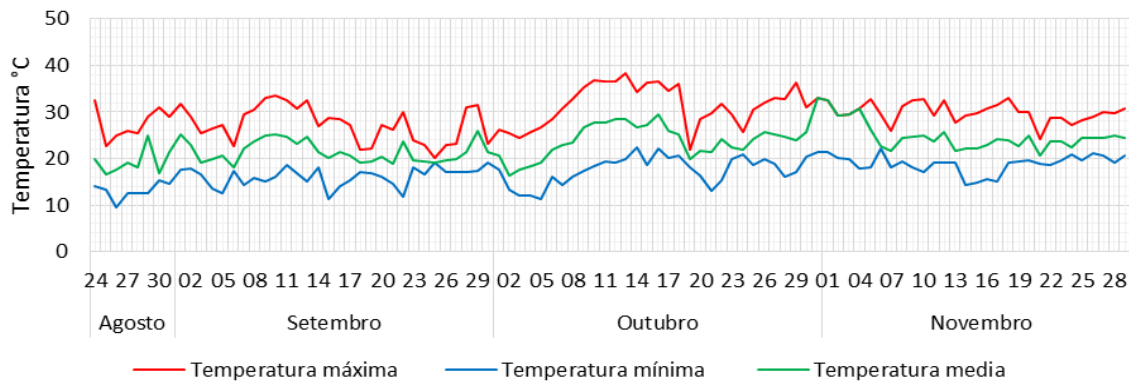
Fonte: o próprio autor

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL

Com o intuito de evitar a repetição de informações, este tópico contempla a parte de Material e Métodos comum para os três artigos.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de agosto a novembro de 2014, (sem controle de luz e temperatura). O clima da região de Londrina é classificado como subtropical úmido mesotérmico, segundo Köppen (Cfa). De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), a temperatura média no período do experimento foi de 23,08°C, sendo 29,49°C a média da máxima temperatura e 17,11°C a média da mínima (Figura 10), com umidade relativa do ar em torno de 67,00%.

Figura 10 – Variação da temperatura no período de desenvolvimento do experimento na região de Londrina



Fonte: o próprio autor

3.1 COLETA DOS MATERIAIS E CONTAMINAÇÃO DO SOLO

3.1.1 Preparo do Solo

O solo, classificado como Latossolo Vermelho argiloso, foi coletado na camada superficial de 0-20 cm em uma área de cultivo da Fazenda Escola da UEL (latitude 23° 20' 23,45" S; longitude 51° 12' 32,28" W e altitude 560 m). O solo foi exposto ao ar para secagem durante 15 dias, e depois tamisado usando peneira de 4,0 mm de abertura, que corresponde a 5 mesh da série Tyler, para obter uma amostra homogênea. Em seguida, uma porção foi esterilizada usando autoclave

vertical (Phoenix Lufenco) a temperatura de 121,00°C e pressão de 1,10 atm (aprox. 1,14 kg cm⁻²) durante 30 minutos (TREVORS, 1996). Os dois solos (controle e autoclavado) foram analisados previamente e os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização granulométrica e química dos solos antes da instalação do experimento

Análise granulométrica (g kg ⁻¹)												
Solo	Argila			Silte			Areia					
Controle	728,3			125,8			135,1					
Autoclavado	739,1			162,4			109,3					
Análise Química												
Solo	pH CaCl ₂	P mg kg ⁻¹	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Al ³⁺	Zn	Cu	Fe	Mn	H+Al cmol _c kg ⁻¹	COT %
Controle	5,39	4,60	1,12	7,38	1,34	0,00	4,52	19,21	70,36	644,85	7,76	3,35
Autoclavado	6,21	5,90	2,42	6,58	1,16	0,00	4,31	18,78	77,86	943,94	4,28	3,48

Fonte: o próprio autor

3.1.2 Preparo do B10

Foi preparado o biodiesel B10 a partir da mistura de diesel (B5 S500) e biodiesel (B100). Uma alíquota de 263,16 mL do B100 foi colocado em balão volumétrico de 5 L e o volume completado com o diesel comercial (B5). O procedimento foi repetido três vezes para a obtenção de 15 L de B10. Os combustíveis foram fornecidos pelo Laboratório de Análise de Combustíveis da UEL e pela distribuidora Ipiranga Pool Londrina. O B100 foi caracterizado inicialmente e os resultados encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização do biodiesel B100 usado no preparo do biodiesel B10

Análises	Unidade	Limite	Método		Resultado
			ABNT/ NBR	ASTM	
Aspecto	-	Anotar	Visual (1)		Limpido
Massa específica a 20°C	kg m ⁻³	850-900	7148	D1298	879,4
Ponto de fulgor	°C	Mínimo 100°C	14598	D-93	145,4
Índice de Acidez	mg KOH g ⁻¹	Máx. 0,5	14448	D-664	0,32
Estabilidade à oxidação a 110°C, min.	hora	6 h	EN 14112	-----	6,11
Teor de água, máximo	mg kg ⁻¹	200		D 6304	150
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² s ⁻¹	3,0 a 6,0		D 445	4,1

Fonte: Laboratório de análise de combustíveis da UEL

(1): LII – Límpido e isento de impurezas.

3.1.3 Contaminação do Solo com Biodiesel B10

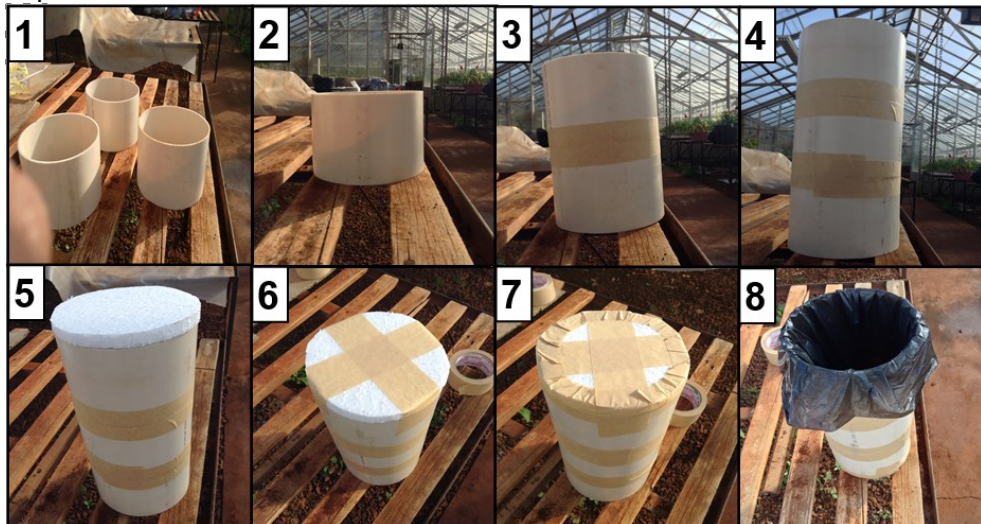
Foram contaminadas amostras de solo (controle e autoclavado) com biodiesel B10 nas proporções de 1% e 2% (m/m) para simular derramamentos de

aproximadamente 30.000 L e 60.000 L por hectare. O B10 foi misturado mecanicamente ao solo em betoneira durante 20 minutos, para permitir sua distribuição homogênea. Cada recipiente foi preenchido com 3,5 kg de solo contaminado.

3.1.4. Recipientes com Solo Contaminado

Cada recipiente foi construído pela união de três anéis de PVC, de 15 cm de diâmetro e 10 cm de altura. Os anéis foram colados com fita adesiva e a vedação do fundo feita com placa de poliestireno comercial de 1 cm de espessura. Os recipientes foram revestidos com bolsas de polietileno de baixa densidade para evitar perda de material, conforme Figura 11.

Figura 11 – Passos para a construção dos recipientes usados no experimento



Fonte: o próprio autor

Por ocasião da coleta de dados, em cada época de avaliação o solo de cada recipiente foi separado por camadas da seguinte forma: camada superior (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20 a 30 cm) de profundidade.

3.2 ESPÉCIE VEGETAL CULTIVADA

A espécie vegetal utilizada no experimento foi uma leguminosa comercial herbácea. As sementes foram fornecidas pela fazenda escola da UEL e identificadas pelo Herbário do Centro de Ciências Biológicas da UEL como *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (feijão-de-porco). Foram feitos testes de germinação,

seguindo a metodologia do MAPA (2009) para avaliar a qualidade das sementes, obtendo-se 80% de germinação.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial de 3x3 tendo como fatores 3 níveis de contaminação do solo com biodiesel B10 no solo (0%, 1%, 2% m/m); 3 tratamentos de solo (solo controle, solo autoclavado, solo cultivado com feijão-de-porco), conforme a Figura 12. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições, totalizando 240 recipientes. As análises foram feitas em 5 épocas, denominadas, dia 0, 15, 35, 55 e 75 (experimento destrutivo). Os recipientes eram trocados de posição aleatoriamente a cada 15 dias para evitar efeitos permanentes das condições ambientais do local, como luz, sombra, correntes de ar e outras que pudessem induzir variações não controladas.

Figura 12 – Esquema ilustrativo do experimento

		Fator 2: Tratamentos dos solos											
		Controle (SC)				Autoclavado (SA)				Cultivado (SP)			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Fator 1: Concentração do B10 no solo	0%	SC0	SC0	SC0	SC0	SA0	SA0	SA0	SA0	SP0	SP0	SP0	SP0
	1%	SC1	SC1	SC1	SC1	SA1	SA1	SA1	SA1	SP1	SP1	SP1	SP1
	2%	SC2	SC2	SC2	SC2	SA2	SA2	SA2	SA2	SP2	SP2	SP2	SP2

R: Repetição

3.4 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Para evaporação dos compostos mais voláteis os recipientes, devidamente preenchidos com solo contaminado, permaneceram na casa de vegetação por um período de 15 dias e mantidos úmidos com 70-80% da capacidade máxima de retenção da água do solo (MRA). Completados os 15 dias, as sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (feijão-de-porco), previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial a 1% por 5 minutos e lavadas com água destilada, foram semeadas, distribuído 5 sementes/recipientes. Após 7 dias fez-se o desbaste deixando 1 planta/recipientes. A fase experimental durou 60 dias, mantendo-se o solo sempre a umidade do solo, mediante reposição diária da água evaporada.

Coletas de amostras de solo e planta para análise foram realizadas aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias após instalação do experimento.

Por ocasião das coletas, o solo de cada recipiente foi dividido em três camadas (0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm). O solo de cada camada foi homogeneizado manualmente e, cerca de 150 g de solo foram retirados e secos à temperatura ambiente (máximo 30°C), peneirado em malha de 2 mm, e armazenado no escuro em recipientes plásticos com tampa, a temperatura de 4,0°C (BOD), até o momento das análises.

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação estatística por análise de variância (ANOVA) e quando necessário as medias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância, utilizando os *softwares ASSISTAT Assistência Estatística 7.7* (SILVA; AZEVEDO, 2002) e *Sisvar for Windows v. 5.3 (Build 77)* (FERREIRA, 2008).

4. ARTIGO A: DEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO AROMÁTICA DO BIODIESEL B10 EM SOLO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE E CULTIVADO COM *Canavalia ensiformis*.

4.1 RESUMO

Nos últimos anos, o uso generalizado do biodiesel, geralmente mistura diesel/biodiesel tem aumentado o número de acidentes envolvendo derramamentos ou vazamentos em ecossistemas aquáticos ou terrestres. A fitorremediação cada dia é mais aceita pela comunidade de cientistas como tratamento efetivo e de baixo custo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a degradação da fração aromática de biodiesel B10 mediante o tratamento fitocorretivo com *Canavalia ensiformis* em um solo contaminado artificialmente. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em recipientes contendo 3,5 kg de um Latossolo Vermelho argiloso. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Os tratamentos testados resultaram de um fatorial 3x3, em que os fatores foram 3 níveis de contaminação do solo com B10 (0%, 1% e 2%) e 3 tipos de preparo do solo (controle, autoclavado e cultivado). As amostras de solo foram coletadas em 5 épocas (0, 15, 35, 55 e 75 dias após a instalação do experimento) e em 3 camadas, superior (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20-30 cm). Foi usada a espectroscopia de fluorescência *synchronous* para determinar a degradação dos compostos aromáticos em cada camada do solo. Aos 75 dias, a degradação em todos os tratamentos na camada superior foi de 86% - 94%, na camada intermediária de 83% - 94%, e na camada inferior de 82% - 94%, sendo que nas três camadas, a menor degradação ocorreu para a contaminação de 2% de B10 no tratamento de solo autoclavado. Levando em consideração os resultados das análises estatísticas, a fitorremediação usando *Canavalia ensiformis* é uma técnica viável para remediar solos contaminados com 1% ou 2% de biodiesel B10 numa profundidade máxima de 10 cm.

4.2 ABSTRACT

Recently, widespread use of biodiesel, usually blended diesel / biodiesel has increased the number of accidents involving spills or leaks in aquatic or terrestrial ecosystems. Phytoremediation is increasingly accepted by the scientific community as effective and low-cost treatment. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the degradation of the aromatic fraction of B10 biodiesel by means of the phytocorrective treatment with *Canavalia ensiformis* in an artificially contaminated soil. The experiment was carried out in a greenhouse in containers containing 3.5 kg of a clayey Oxisol. The experimental design was a completely randomized design with 4 replicates. The treatments tested were a 3x3 factorial, in which the factors were 3 levels of soil contamination with B10 (0%, 1% and 2%) and 3 types of soil preparation (control, autoclaved and cultivated). Soil samples were collected in 5 seasons (0, 15, 35, 55 and 75 days after the experiment) and in 3 layers, upper (0-10 cm), intermediate (10-20 cm) and lower (20 -30 cm). Synchronous fluorescence spectroscopy was used to determine the degradation of aromatic compounds in each soil layer. At 75 days, degradation in all treatments in the upper layer was 86% - 94%, in the middle layer of 83% - 94%, and in the lower layer of 82% - 94%, and in the three layers, the lowest Degradation occurred for the contamination of 2% of B10 in the treatment of autoclaved soil. Taking into account the results of the statistical analysis, phytoremediation using *Canavalia ensiformis* is a viable technique to remediate soils contaminated with 1% or 2% B10 biodiesel at a maximum depth of 10 cm.

4.3. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma das fontes básicas de energia sobre as quais sustentam-se as atividades econômicas de todos os países do mundo. No entanto, é também a principal fonte dos problemas ambientais, como o aquecimento global, poluição fotoquímica, liberação de material particulado (HALL et al., 2003), e contaminação de solos e águas (ZACHARYASZ; SIEPAK; ROSADA, 2012).

A contaminação do solo pelo petróleo e seus derivados tem se convertido num problema grave. Para Wolicka et al. (2009) as principais fontes de contaminação são: instalações de campos de petróleo, refinarias de petróleo, distribuição de combustível líquido, dispositivos de armazenamento, equipamentos de transporte de produtos petrolíferos, aeroportos e perfurações ilegais em linhas de tubulação. Assim, o óleo diesel tem se convertido num dos contaminantes habituais de grandes superfícies do solo (MOLINA-BARAHONA et al., 2004).

Os combustíveis de origem fóssil como o diesel contém hidrocarbonetos, saturados e insaturados, de cadeia linear ou ramificada, além dos aromáticos, podendo ser monoaromáticos, como Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xilenos (BTEX), ou poliaromáticos como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), e, ainda, hidrocarbonetos aromáticos contendo N e S. Estes compostos orgânicos são nocivos para o meio ambiente, comprometem a saúde humana e prejudicam o desenvolvimento de plantas e animais (ZHOU; SUN; LIU, 2005).

Na busca por combustíveis oriundos de fontes limpas e renováveis, o biodiesel, que é um monoalquil éster de ácido graxo, tem se destacado (BORSATO et al., 2010), por não ser tóxico, estar livre de enxofre e compostos aromáticos, ser facilmente biodegradável, e, por aumentar a capacidade de lubrificação. Além disso, suas principais propriedades físico-químicas são comparáveis às dos combustíveis fósseis (KARAVALAKIS; STOURNAS; KARONIS, 2010).

Os combustíveis, ao entrar em contato com o solo vão se espalhar e infiltrar, no entanto, essa infiltração é limitada pelas propriedades físicas do combustível e do solo. A granulometria e composição do solo (areia, argila, silte), determina a área do espaço poroso e a sua permeabilidade. Assim, um solo arenoso permite a penetração mais rápida e mais profunda do óleo do que um solo argiloso (CHARVET, 2007). Em condições normais parte do combustível diesel é absorvido pela matéria orgânica na superfície do solo. (ADAM; DUNCAN, 2002).

Várias tecnologias estão sendo utilizadas para tratar solos contaminados com produtos petrolíferos, incluindo técnicas físicas e químicas, tais como o tratamento térmico, lavagem do solo, extração de gases ou líquidos, solidificação e estabilização ou combinações dos referidos processos. No entanto, estas técnicas são muito caras e exigem a utilização de equipamentos pesados e uma quantidade substancial de energia (KAIMI et al., 2006).

Segundo Barrutia et al. (2011) o uso de plantas e seus microrganismos associados para remediar solos contaminados com compostos orgânicos é cada vez mais aceita como tecnologia viável. Dentre estas técnicas destaca-se a fitorremediação que tem demonstrado ser eficiente para o tratamento *in situ* de solos contaminados (WANG et al., 2010). A fitorremediação define-se como a tecnologia que envolve o emprego de plantas vivas que permitem a degradação, retenção, imobilização ou redução de contaminantes ambientais a níveis não tóxicos em solos ou águas (USEPA, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar a degradação da fração aromática de diesel de petróleo contendo 10% de biodiesel, em solo contaminado artificialmente e cultivado com *Canavalia ensiformis*.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Análises das Frações Aromáticas

Para a análise das frações aromáticas usou-se a técnica de espectroscopia de fluorescência, em que a fração de biodiesel B10 foi extraída colocando-se em um tubo de ensaio 2 g da amostra e 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). Posteriormente, a mistura foi agitada por 2 minutos com agitador vórtex e logo após colocada no ultrassom por 30 minutos (COTTA; REZENDE; LANDGRAF, 2009). Finalmente, o extrato foi filtrado e analisado em espectrofluorímetro SHIMADZU – RF5301PC na modalidade *synchronous* com $\Delta\lambda = 20$ nm e varredura espectral de 270 a 450 nm. As áreas integradas dos espectros foram calculadas utilizando-se o *software Personal Fluorescence* RF5301-PC versão 1.40, tomando-se o mesmo intervalo da varredura espectral para todas as amostras.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Frações Aromáticas

Uma substância é fluorescente se a sua estrutura apresenta elétrons π , que absorvem radiação na região ultravioleta e visível do espectro eletromagnético e, após, emitem parte dessa radiação em comprimento de onda maior. Assim, quando uma amostra fluorescente é irradiada em um comprimento de onda específico, ocorre uma excitação eletrônica de um nível energético inferior para um nível superior, seguida de uma relaxação (emissão de energia), retornando ao estado fundamental. Essa energia emitida pode ser medida para avaliar a concentração do composto ou substância fluorescente.

Os compostos que apresentam fluorescência molecular são os aromáticos e os acíclicos com grupos carbonila ou com duplas ligações altamente conjugadas (SKOOG et al., 2002).

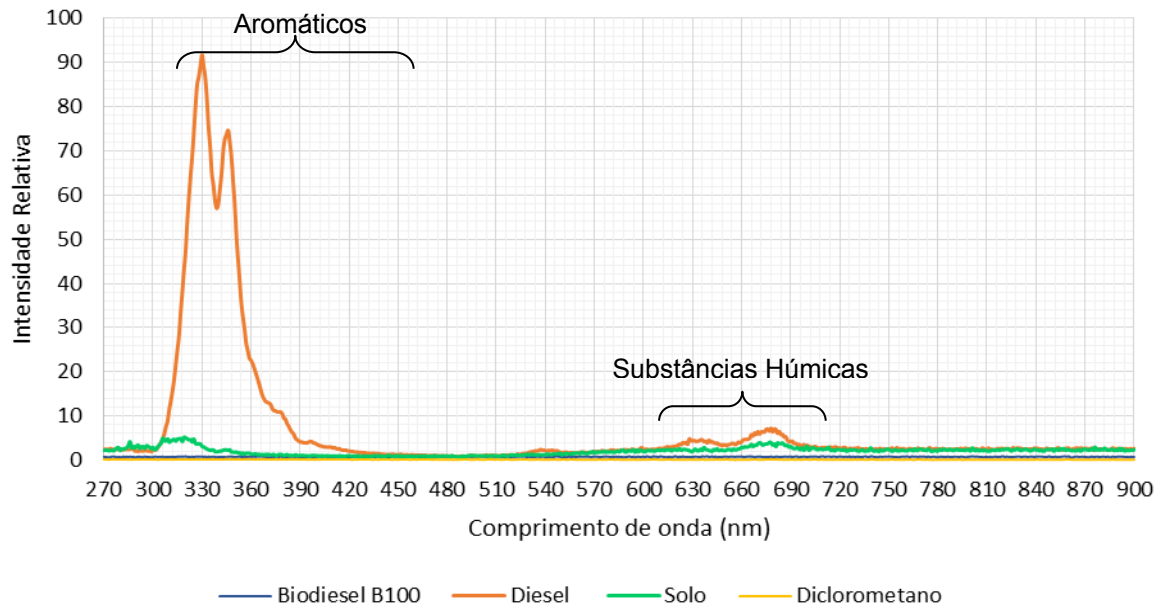
A espectrofotometria de fluorescência *synchronous* (sincronizada de excitação/emissão) é uma técnica qualitativa útil para o análise da composição aromática de uma mistura complexa de hidrocarbonetos aromáticos como o petróleo e seus derivados (WAKEHAM, 1977).

Geralmente o petróleo se divide em quatro frações: alifática, aromática, compostos polares e a fração asfaltenica (NICODEM et al., 2001), cada fração absorve e emite numa região específica do espectro eletromagnético, sendo que os aromáticos o fazem no UV-VIS, os polares no visível e os asfaltenos no visível-infravermelho próximo.

A fluorescência do diesel no solo é causada pela presença dos compostos aromáticos como os BTEX e HPAs de máximo três anéis. O B100 (biodiesel puro) não fluoresce, por não possuir compostos aromáticos, por isso, a fluorescência no B10 deve-se à fração aromática contida no diesel.

Na figura 13 estão apresentados os espectros dos combustíveis, o solo e solvente utilizados no experimento. É possível evidenciar que o diesel (derivado do petróleo), apresenta maior fluorescência entre 300 e 450 nm, por isso, foi o intervalo escolhido para cálculos das áreas e concentrações de compostos aromáticos.

Figura 13 – Espectros de fluorescência *synchronous* de diesel, biodiesel em diclorometano (1/1000 v/v), utilizado no experimento



Fonte: o próprio autor

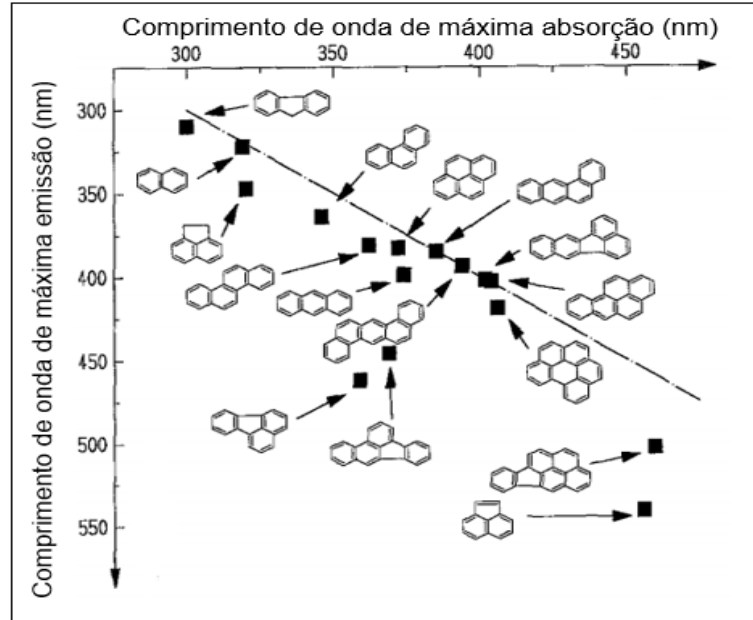
Na faixa dos comprimentos de onda entre 600 e 900 nm, há presença de uma pequena banda que indica a presença de substâncias húmicas ou matéria orgânica do solo. Essas substâncias húmicas são compostas por misturas heterogêneas de compostos orgânicos, como grupos alifáticos, aromáticos, fenólicos e quinonas, os quais são os principais fluoróforos deste material (CHEN et al., 2003).

A Figura 14 proposta por Kumke, Löhmannsröben e Roch (1995), apresenta os 16 HPAs prioritários para controle ambiental pelas agências (USEPA), os quais podem ser fotoexcitados na faixa do UV/VIS do espectro eletromagnético.

Os espectros de fluorescência sincronizada dos extratos de solo sem contaminação (0%) de B10 nos três tratamentos: solo controle, solo autoclavado e solo cultivado com *Canavalia ensiformis* na camada superior (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20-30 cm), nas 5 épocas de amostragem (0, 15, 35, 55 e 75 dias depois do início do experimento), não apresenta bandas na faixa de comprimentos de onda entre 270-450 nm, em nenhuma camada ou tratamento (Figura 15 e anexo A, pág 109). Os resultados obtidos indicam que no período do experimento o solo não continha, nem liberou nenhum grupo fluoróforo, ou seja, não havia presença de substâncias com duplas ligações conjugadas, como os compostos aromáticos (BTEX e HPAs). Os fluoróforos do solo estão presentes na matéria orgânica, composta principalmente de ácidos húmicos os quais apresentam

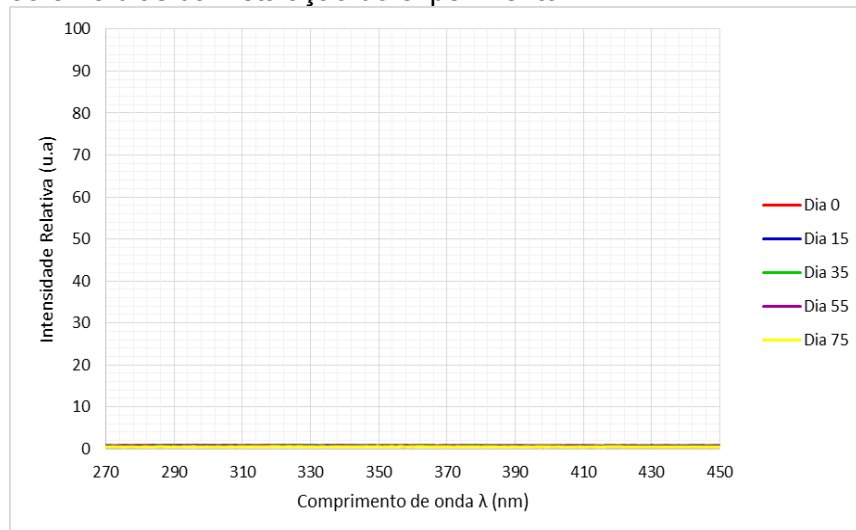
uma banda na região entre 600-900 nm, não levada em consideração nas avaliações.

Figura 14 – Correlação entre absorção e emissão de energia para diferentes HPAs



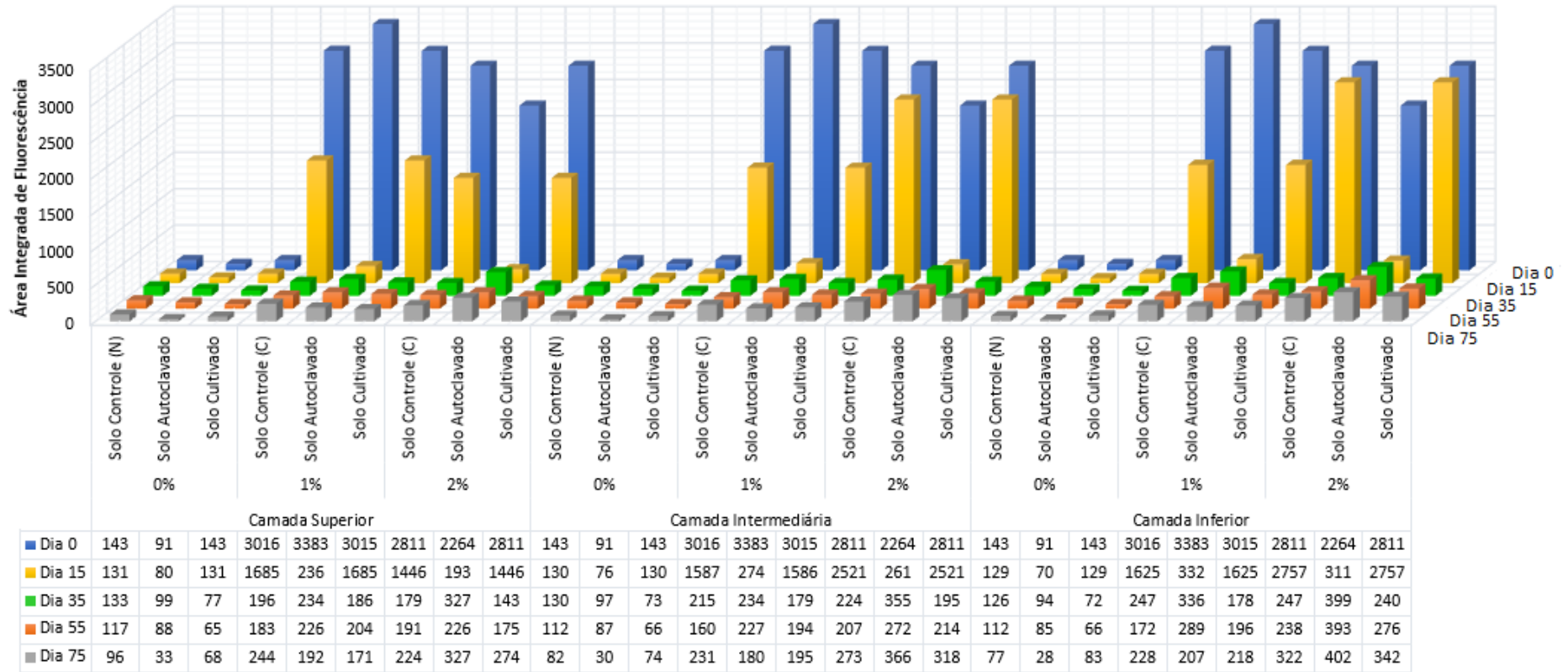
Fonte: Adaptado de Kumke, Löhmansröben e Roch (1995)

Figura 15 – Espectros de fluorescência *synchronous* para os solos sem contaminação de B10 nas três camadas, aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



A figura 16 apresenta o resultado das áreas integradas dos espectros de fluorescência de todos os tratamentos nas três profundidades, camadas superior 0-10 cm, intermediária 10-20 cm e inferior 20-30 cm, nas cinco épocas de amostragem (0, 15, 35, 55 e 75 dias).

Figura 16 – Áreas integradas dos espectros de fluorescência, para os tratamentos do solo sem contaminação e contaminado com 1% 2% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento, nas três camadas avaliadas

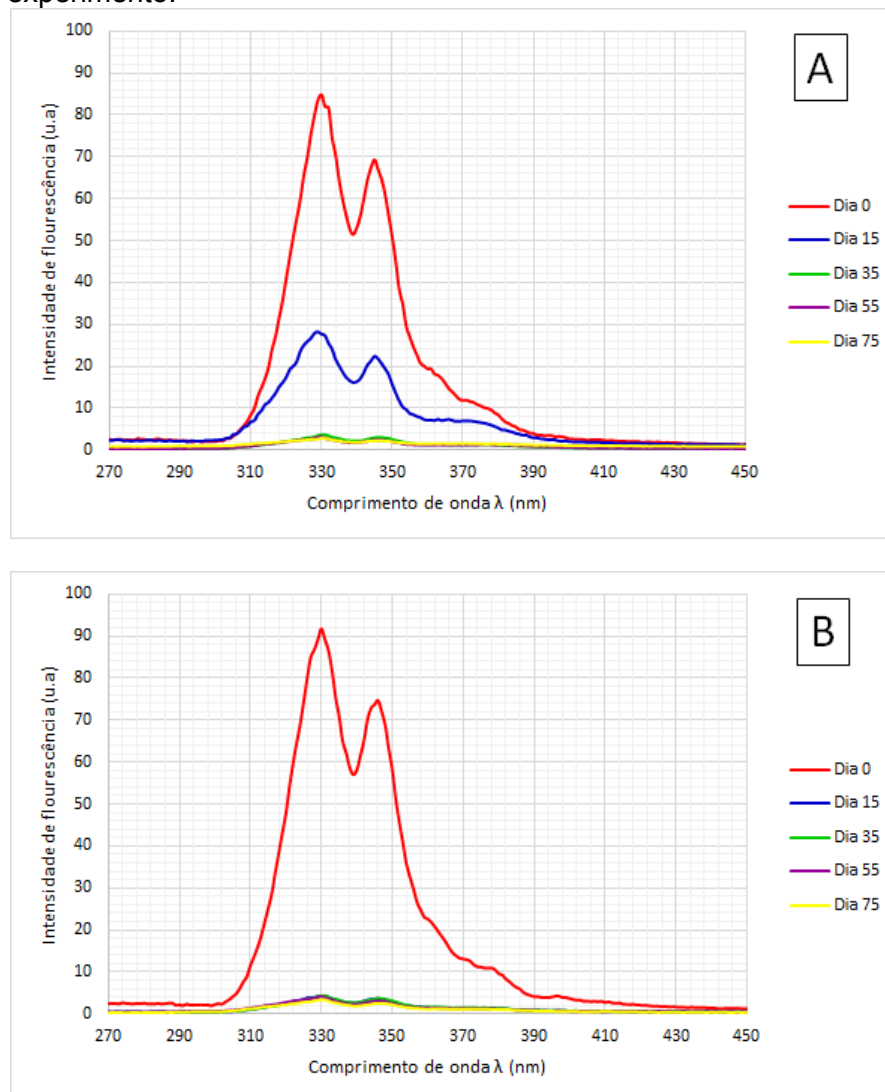


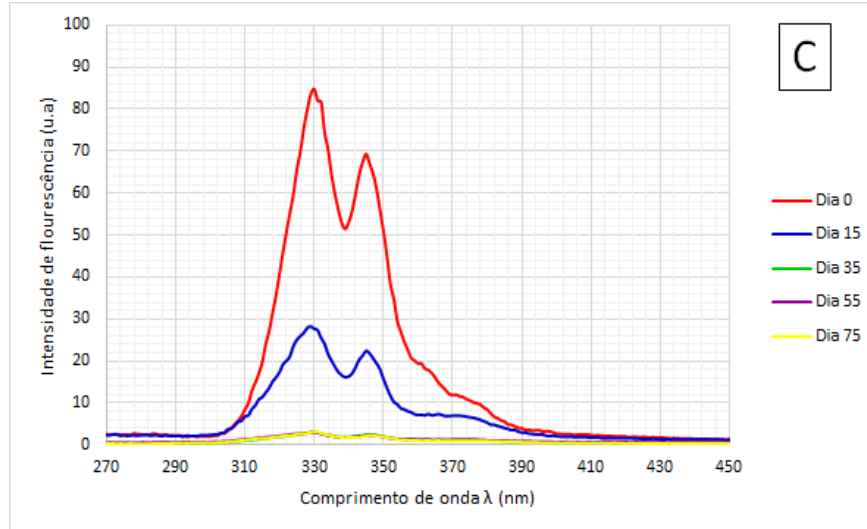
N: Natural, sem contaminação. C: Contaminado.

4.5.2 Degradação dos compostos aromáticos em solo contaminado com 1% de B10.

As Figuras 17, 18 e 19 exibem os espectros de fluorescência *synchronous* para os tratamentos contaminados com 1% de B10 nas camadas superior, intermediária e inferior, sendo possível observar que houve um decréscimo na intensidade relativa da fluorescência com o decorrer do tempo, em todos os casos.

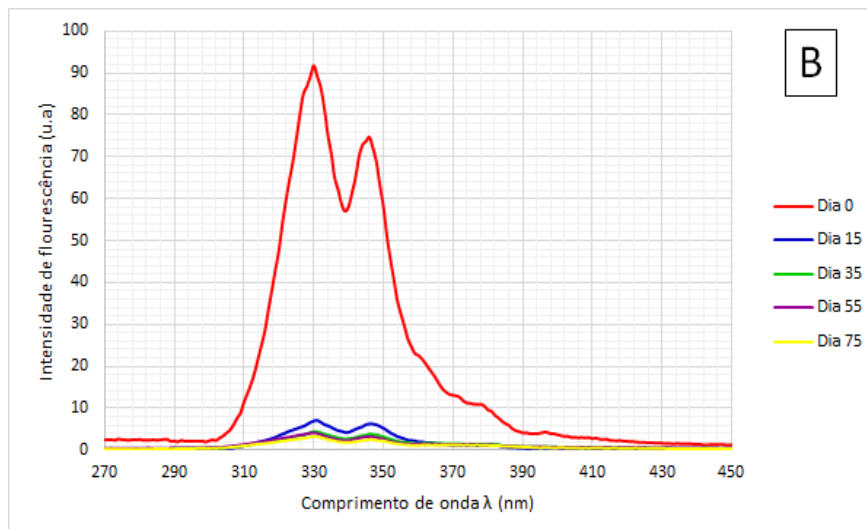
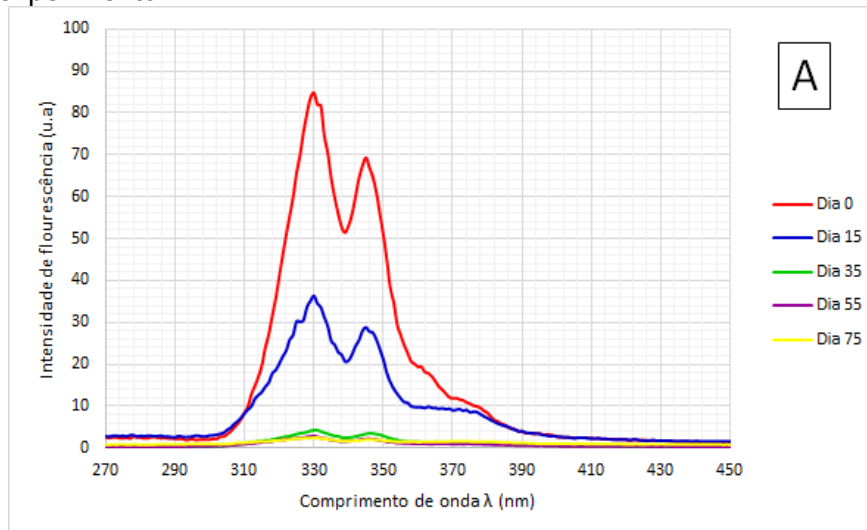
Figura 17 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 1% de B10 na camada superior (0-10 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.

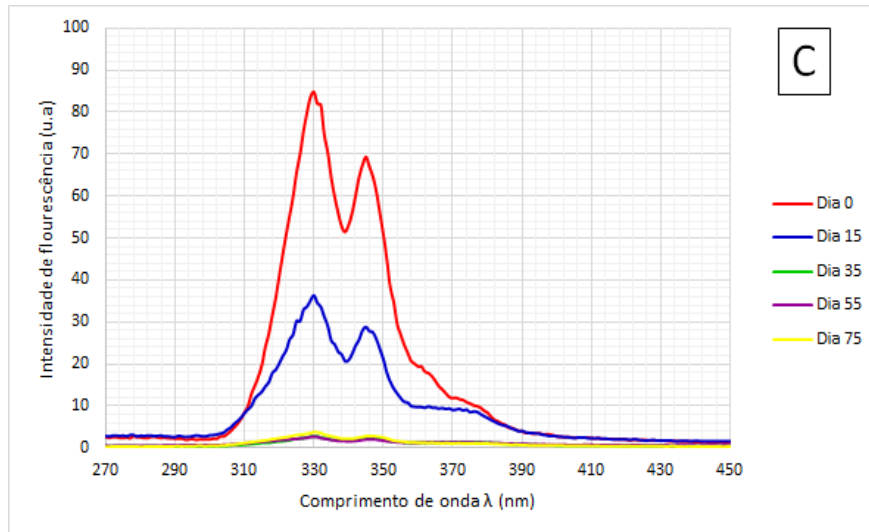




A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

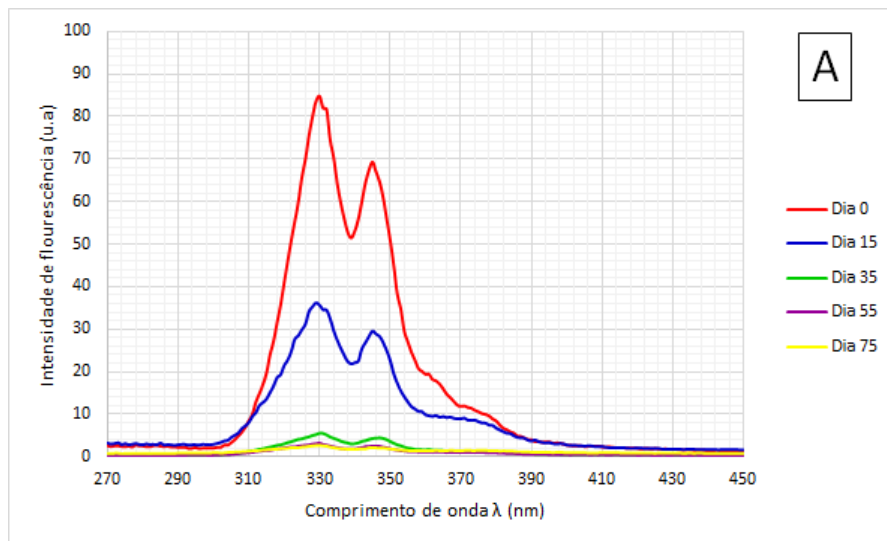
Figura 18 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 1% de B10 na camada intermediária (10-20 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.

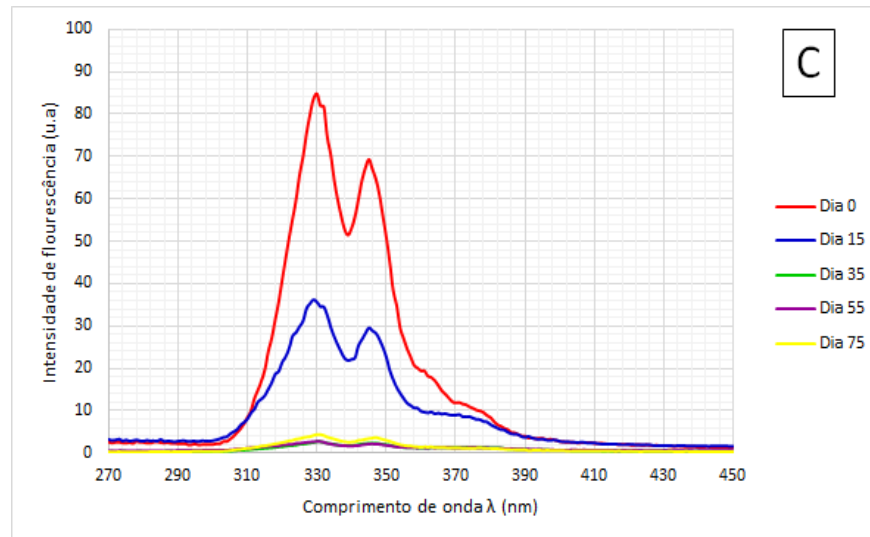
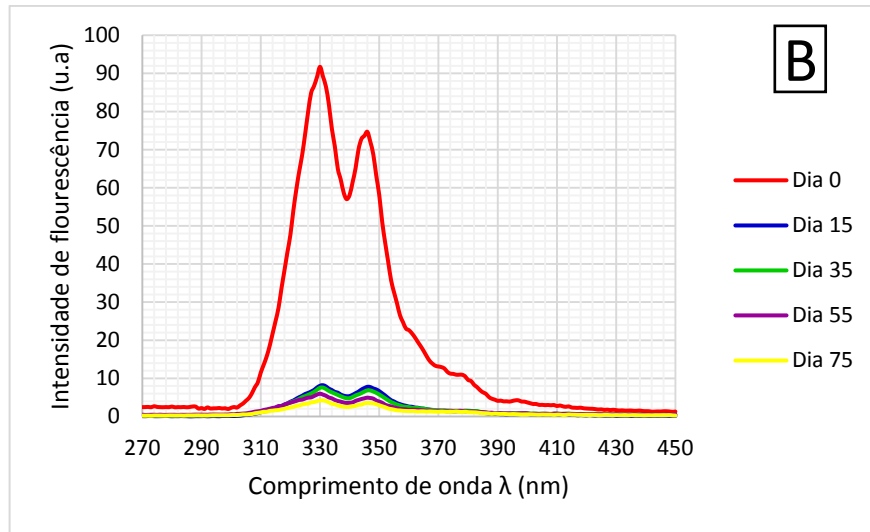




A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Figura 19 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 1% de B10 na camada inferior (20-30 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.





A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Tabela 3 – Porcentagem de degradação dos compostos aromáticos para os tratamentos de solo contaminado com 1% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento

Camada	Tipo de solo	% degradação por dia				
		Dia 0	Dia 15	Dia 35	Dia 55	Dia 75
Superior	Controle	0	44,13	93,50	93,93	91,91
	Autoclavado	0	93,02	93,08	93,32	94,32
	Cultivado	0	44,11	93,83	93,23	94,33
Intermediária	Controle	0	47,38	92,87	94,69	92,34
	Autoclavado	0	91,90	93,08	93,29	94,68
	Cultivado	0	47,40	94,06	93,57	93,53
Inferior	Controle	0	46,12	91,81	94,30	92,44
	Autoclavado	0	90,19	90,07	91,46	93,88
	Cultivado	0	46,10	94,10	93,50	92,77

Os resultados são discutidos levando em consideração a Figura 16, os espectros correspondentes às Figuras 17 a 19 e a Tabela 3, para os três tratamentos de solo (controle, autoclavado e cultivado) no solo não contaminado e contaminado com 1% de B10.

No solo controle e cultivado, 15 dias depois da contaminação, a área integrada da fluorescência diminuiu 44,13% na camada superior, 47,38% na camada intermediária e 46,12% na inferior. É possível inferir que nesse período, prevaleceu só houve uma atenuação natural, decorrente das reações fotoquímicas e bioquímicas (ação de microrganismos). Esses resultados estão de acordo com Bento et al. (2005) que avaliaram a atenuação natural da fração leve (C12-C23) e da fração pesada (C23-C40) de uma amostra de solo coletada em Long Beach e contaminada com diesel, e verificaram que depois de duas semanas a degradação foi de 55,6% e 55,9%, respectivamente.

A degradação diminuiu com a profundidade do solo, comportamento similar ao observado por Couto, Monteiro e Vasconcelos (2010), que observaram que a degradação de HTP de solos contaminados com petróleo na camada superficial (até 5 cm de profundidade) foi de 20% - 50% e na camada abaixo de 5 cm de 10% - 30%. Segundo os autores, essa diferença na degradação se dá porque na camada superficial ocorre a combinação de níveis adequados de oxigênio (propício para a degradação aeróbia) com a radiação solar necessária para a produção de fortes oxidantes fotoquímicos, como o ozônio.

No solo autoclavado a área integrada de fluorescência inicial (dia 0) foi maior em relação ao solo controle e ao solo cultivado (parte B das figuras 17, 18 e 19). Essa diferença aumento pode ser explicada pelo fato de ter ocorrido variações de propriedades físicas e químicas do solo, principalmente pela eliminação dos microrganismos, agentes ativos da degradação.

Segundo Berns et al. (2008), a autoclavagem do solo leva ao aumento da fração de argila (em razão da maior dispersão das partículas), e conseqüentemente ao aumento da área superficial. Isso possivelmente provocou também aumentos de macro e mesoporos e, portanto, maior adsorção do B10 minutos depois da contaminação. Depois de 15 dias de atenuação natural o solo autoclavado na camada superior, intermediária e inferior apresentou uma diminuição na intensidade relativa correspondente a 93,02%, 91,90% e 90,19%, respectivamente. Segundo Luthy et al. (1997) a dessorção pode ocorrer mais

rapidamente em poros de maior tamanho (meso e macroporos), devido à baixa energia de ativação, razão pela qual a degradação aos 15 dias foi maior que a observada no solo controle e no solo cultivado.

Aos 35 dias, o solo controle na camada superior teve uma degradação de 93,50%, na intermediária de 92,87% e na inferior de 91,81%, valores próximos aos encontrados por Sarkar et al. (2005) que relatam que para um solo argiloso contaminado com aproximadamente 4000 ppm de diesel houve uma redução de 89,7% dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) na quarta semana de contaminação. Aos 35 dias (20 dias após a semeadura) o solo cultivado apresentou uma degradação de 93,83% na camada superior, 94,06% na camada intermediária e 94,10% na camada inferior, valores que podem indicar que houve degradação dos componentes aromáticos do diesel pela planta ou pelos microrganismos do solo, estimulados pela presença da *Canavalia ensiformis*. O dia 55 teve um comportamento muito similar ao dia 35.

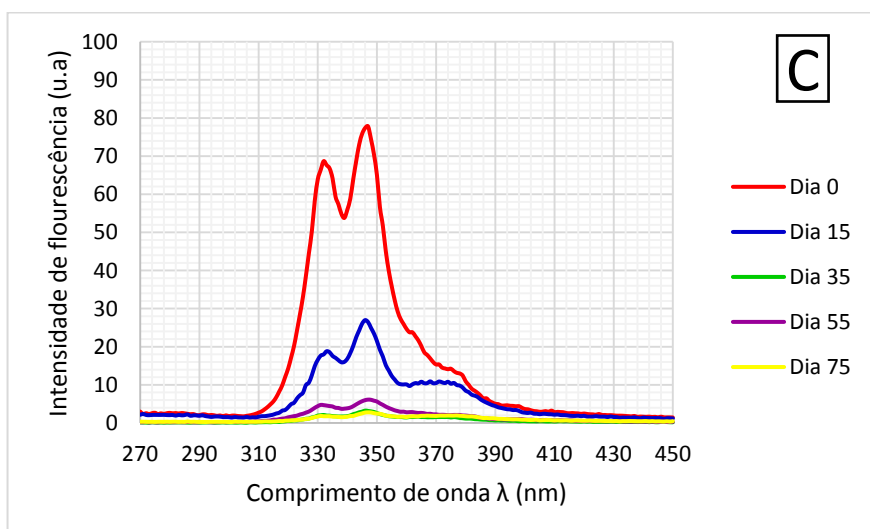
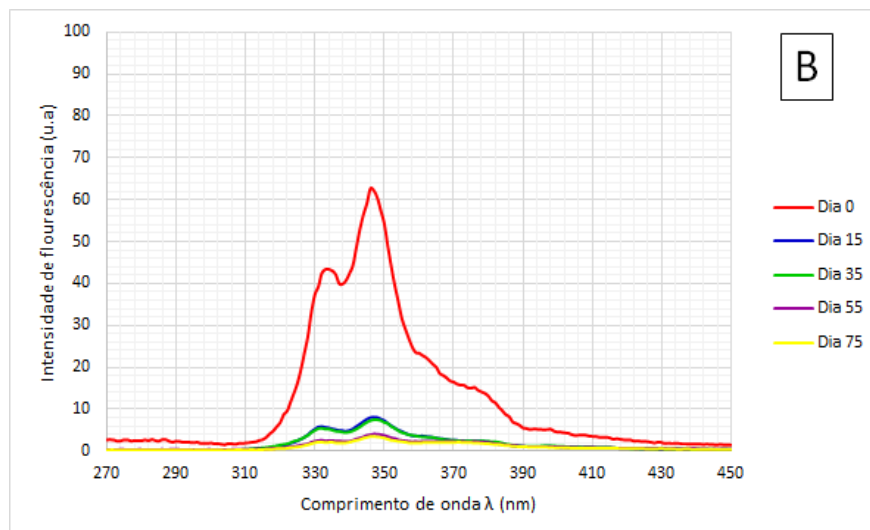
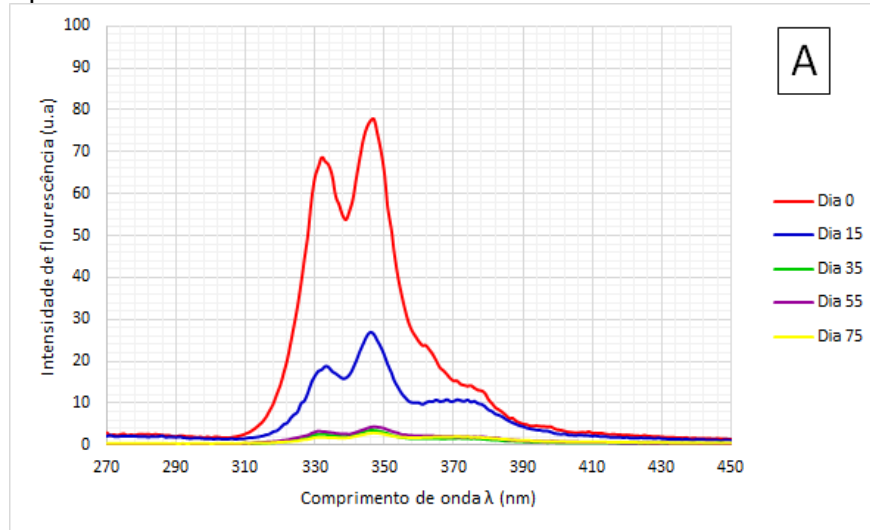
No dia 75 (final do experimento) os dados obtidos foram submetidos à avaliação estatística que discutido no item 4.5.3.

4.5.3 Degradação dos compostos aromáticos em solo contaminado com 2% de B10.

Nas Figuras 20, 21 e 22 estão apresentados os espectros de fluorescência *synchronous* para os tratamentos contaminados com 2% de B10 na camada superior, intermediária e inferior.

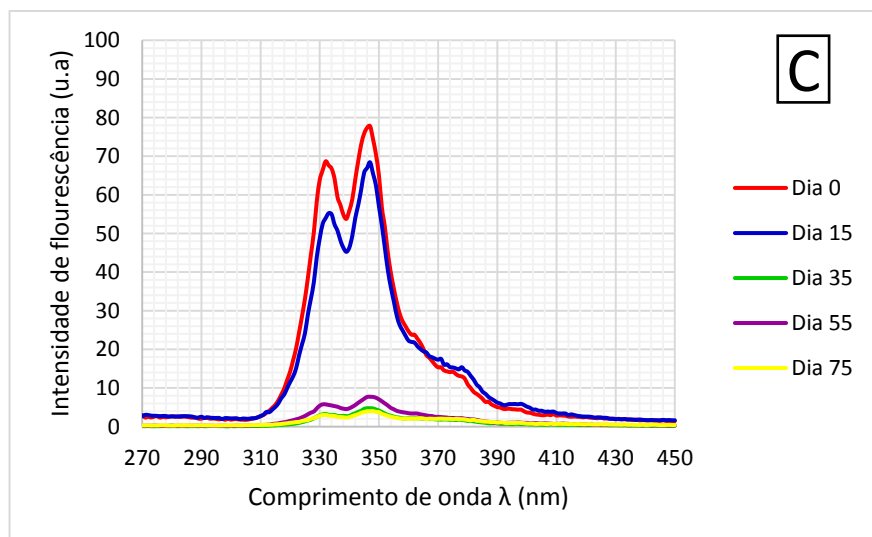
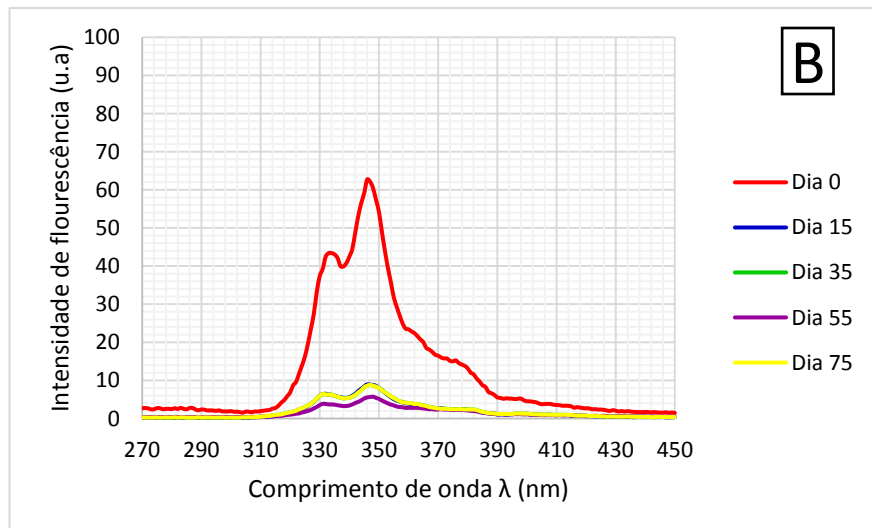
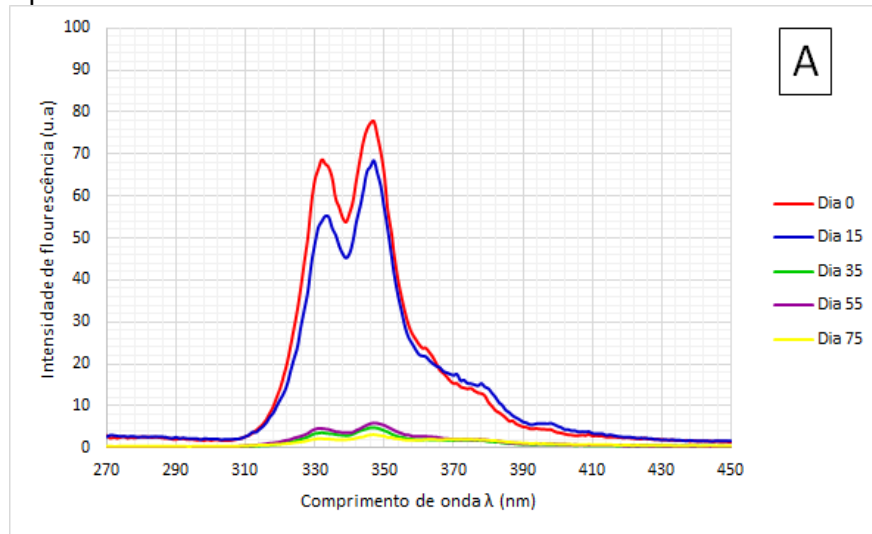
Os solos controle e cultivado apresentaram degradação média de 48,55% na camada superior, 10,31% na camada intermediária e 1,92% na camada inferior, depois de 15 dias da contaminação (parte A e C das Figuras 20, 21 e 22, e Tabela 4). Na camada superior a degradação foi favorecida pela radiação solar e pela presença de oxigênio. Porém, nas camadas intermediária e inferior, a degradação foi menor, devido à maior concentração do B10 que infiltrou no solo, impedindo a volatilização da fração alifática que é mais facilmente biodegradada (Bento et al., 2005). No solo controle, no dia 35, a concentração dos compostos aromáticos diminuiu, chegando a uma degradação de 93,63% na camada superior, 92,03% na camada intermediária e 91,21% na inferior. No solo cultivado a degradação foi de 94,91%, 93,06% e 91,46% nas camadas superior, intermediária e inferior, respectivamente.

Figura 20 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 2% de B10 na camada superior (0-10 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



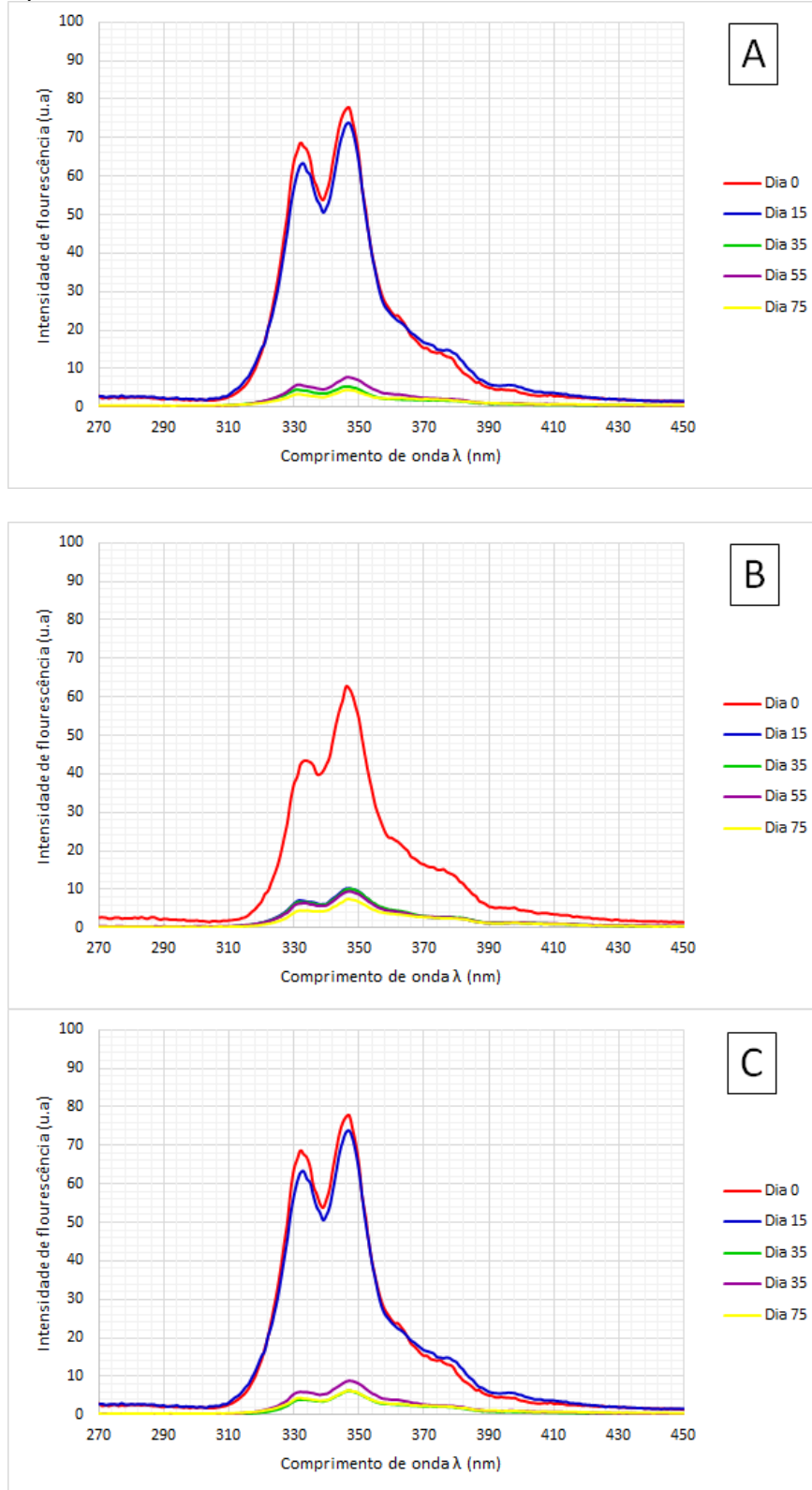
A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Figura 21 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 2% de B10 na camada intermediária (10-20 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Figura 22 – Espectros de fluorescência *synchronous* para solos contaminados com 1% de B10 na camada inferior (20-30 cm de profundidade), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Tabela 4 – Porcentagem de degradação dos compostos aromáticos para os tratamentos de solo contaminado com 2% de B10 aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento

Camada	Tipo de solo	% degradação por dia				
		Dia 0	Dia 15	Dia 35	Dia 55	Dia 75
Superior	Controle	0	48,56	93,63	93,21	92,03
	Autoclavado	0	91,48	85,56	90,02	85,56
	Cultivado	0	48,56	94,91	93,77	90,25
Intermediária	Controle	0	10,32	92,03	92,64	90,29
	Autoclavado	0	88,47	84,32	87,99	83,83
	Cultivado	0	10,32	93,06	92,39	88,69
Inferior	Controle	0	1,92	91,21	91,53	88,55
	Autoclavado	0	86,26	82,38	82,64	82,24
	Cultivado	0	1,92	91,46	90,18	87,83

Nas camadas superior e intermediária o efeito da planta aumentou levemente a degradação. É importante ressaltar que a semeadura foi feita diretamente nos recipientes e que as raízes nesta época (35 dias depois da contaminação) ainda não atingiram a camada inferior. Segundo Siciliano et al. (2003), a degradação de HTP (alifáticos e aromáticos) é mais rápida em solos com presença de vegetação que em solos estéreis ou em solos onde só há a presença de microrganismos.

No caso do solo autoclavado, a área integrada de fluorescência foi menor no início do experimento quando comparado aos solos controle e cultivado. Quinze dias após houve alta degradação, na camada superior de 91,47%, na camada intermediária de 88,47% e na camada inferior de 86,26%. Nas análises seguintes (dias 35, 55 e 75), as concentrações de HPAs mantiveram-se relativamente estáveis.

Na avaliação de 75 dias (final do experimento), a degradação para o solo controle, autoclavado e cultivado na camada superior foi de 92,03%, 85,56% e 90,25%, respectivamente, demonstrando que a fitorremediação com *Canavalia ensiformis* aumenta a degradação dos compostos aromáticos no solo contaminado com 2% de B10.

4.5.4 Análise Estatística

A partir dos resultados do Teste de Hartley (homogeneidade de variâncias ou homocedasticidade), conclui-se que as variâncias são homogêneas, e o Teste de Shapiro-Wilk (normalidade), indicou que os erros se distribuíam

normalmente, podendo realizar as análises de variâncias (ANOVA) e o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Na tabela 5 estão apresentados os resultados da análise estatística para as porcentagens de degradação dos compostos aromáticos no solo contaminado com 1% e 2% de B10 aos 75 dias para os diferentes tratamentos.

Tabela 5. Valores médios por porcentagem de degradação para a interação entre % de contaminação de B10 no solo e o tratamento do solo aos 75 dias

% contaminação de B10	Tratamento do solo		
	Controle	Autoclavado	Controle Cultivado
Camada Superior (0-10 cm) *			
1	91,92 aB	94,36 aA	94,33 aA
2	91,97 aA	85,53 bB	90,21 bA
DMS colunas: 1,91		DMS linhas: 2,32	
CV%: 1,41			
Camada Intermediária (10-20 cm) *			
1	92,33 aA	94,68 aA	93,50 aA
2	90,25 bA	83,78 bB	88,65 bA
DMS colunas: 2,02		DMS linhas: 2,45	
CV%: 1,50			
Camada Inferior (20-30 cm) *			
1	92,42 aA	93,86 aA	92,76 Aa
2	88,56 bA	82,19 bB	87,80 Ba
DMS colunas: 2,48		DMS linhas: 3,01	
CV%: 1,86			

*Significativo a 5%; ns=não significativo; DMS= diferença mínima significativa; CV= coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e cultivado).

Ao comparar as médias dos tratamentos contaminados com 1% de B10 (Tabela 5), observa-se que nas três camadas o solo controle apresentou uma degradação maior a 91%, o solo autoclavado maior a 93% e o solo cultivado maior a 92%. Meyer (2011) realizou um estudo sobre a degradação de B0 e B20 em solos sob a influência da atenuação natural e a bioaugmentação, encontrando porcentagens de degradação superiores a 90% de HTP, resultados comparáveis com os obtidos neste trabalho. Ao comparar os tratamentos, só na camada superior o solo controle foi significativamente inferior que o solo autoclavado e cultivado.

O análise estatístico nas três camadas indicou que para contaminação com 2% de biodiesel B10 o solo autoclavado foi estatisticamente inferior que o solo controle e cultivado. A comparação entre os níveis de contaminação (1% e 2%) de B10 no solo, revelou que a degradação foi favorecida

para a menor porcentagem de contaminação em todos os tratamentos e camadas, excepto o tratamento solo controle na camada superior.

Peña-Castro et al. (2006) sintetizaram as propostas de vários autores e indicaram 3 hipóteses sobre o mecanismo pelo qual a planta aumenta a degradação dos Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) no solo. A primeira é conhecida como efeito rizosfera, que indica que a penetração radicular melhora as propriedades químicas e físicas do solo mediante melhoria na aeração e na liberação de secreções radiculares ricas em nutrientes. Isso favorece a diversificação dos microorganismos, e, por conseguinte, o aumento da degradação. A segunda diz que a simbiose entre planta e bactérias cria um ambiente adequado para que os microrganismos degradem os HTPs no solo. O terceiro estabelece que a extração da água para a parte aérea e a reversão do gradiente hidráulico podem favorecer a degradação ou imobilização dos contaminantes nas raízes e na parte aérea graças às enzimas vegetais.

4.6 CONCLUSÕES

Para os dois níveis de contaminação do solo (1% e 2%) com biodiesel B10 houve degradação dos compostos aromáticos, decorrente de reações fotoquímicas e bioquímicas (ação dos microrganismos e/ou da *Canavalia ensiformis*), desde o dia 15 até o dia 75, nas três camadas do solo, superando na maioria dos casos, a faixa de 90% de degradação.

A fitorremediação usando *Canavalia ensiformis* é uma técnica viável para a degradação de compostos aromáticos em áreas contaminadas com biodiesel B10.

5 ARTIGO B: MONITORAMENTO DA FERTILIDADE DE UM SOLO CONTAMINADO COM BIODIESEL B10 CULTIVADO COM *Canavalia ensiformis*

5.1 RESUMO

A contaminação dos solos por combustíveis fósseis e biocombustíveis leva a alteração das propriedades físico-químicas do solo, limitando seu uso para a produção agrícola, residencial e lazer. Além disso, apresenta efeitos tóxicos para plantas, animais e humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da fitorremediação na fertilidade do solo contaminado com biodiesel B10. O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando recipientes contendo 3,5 kg de um Latossolo Vermelho argiloso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Foram testados 3 níveis de contaminação do solo com biodiesel B10 nas concentrações de 0%, 1% e 2% (m/m) e 3 tratamentos do solo: controle, autoclavado e cultivado correspondendo a um fatorial 3x3 com cinco épocas de avaliação 0, 15, 35, 55 e 75 dias após da instalação do experimento. As amostras de solo foram coletadas em três camadas superior (0-10 cm), intermediária (10-20 cm) e inferior (20-30 cm). Foram avaliados os macronutrientes Ca, Mg, P e K, e os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn. Também foram avaliados o pH e os teores de Al e Carbono Orgânico Total (COT). Dos macronutrientes, o mais afetado foi o fósforo, pois o aumento da porcentagem de contaminação, reduziu a disponibilidade deste nutriente. Os micronutrientes não apresentaram um comportamento bem definido. O aumento da contaminação do solo com B10 não alterou significativamente os teores trocáveis de Cu, mas, aumentou os teores de Mn e Fe, e reduziu os de Zn. Os teores de COT e o pH do solo aumentaram com a contaminação do mesmo por B10.

5.2 ABSTRACT

Soil contamination by fossil fuels and biofuels leads to changes in the physical and chemical properties of the soil, limiting its use for agricultural, residential and leisure production. In addition, it has toxic effects for plants, animals and humans. The objective of this study was to evaluate the effects of phytoremediation on soil fertility contaminated with B10 biodiesel. The experiment was carried out in greenhouse, using containers containing 3.5 kg of a clayey Oxisol. The experimental design was completely randomized with 4 replicates. Three levels of soil contamination with B10 biodiesel were tested at concentrations of 0%, 1% and 2% (m / m) and 3 treatments of the soil: control, autoclaved and cultivated, corresponding to a factorial 3x3 with five evaluation periods 0, 15, 35, 55 and 75 days after the installation of the experiment. Soil samples were collected in three upper (0-10 cm), intermediate (10-20 cm) and lower (20-30 cm) layers. The macronutrients Ca, Mg, P and K, and the Cu, Fe, Mn and Zn micronutrients were evaluated. The pH and Al and Total Organic Carbon (TOC) levels were also evaluated. Of the macronutrients, the most affected was the phosphorus, because the increase of the percentage of contamination, reduced the availability of this nutrient. Micronutrients did not show a well-defined behavior. The increase in soil contamination with B10 did not significantly change the Cu exchangeable contents, but increased the Mn and Fe contents, and reduced the Zn contents. TOC levels and soil pH increased with B10 contamination.

5.3 INTRODUÇÃO

Os derivados de petróleo são a principal fonte de energia do mundo. Contudo, durante a exploração, produção, refino, transporte e armazenamento de petróleo e produtos petrolíferos, vazamentos e derramamentos acidentais ocorrem regularmente (DAS; CHANDRAN, 2011).

Globalmente, mais de 45 milhões de toneladas de petróleo bruto e derivados (cerca de 2% da produção anual) contaminam o ambiente. As perdas de petróleo durante a produção e armazenamento chega a 5 milhões de toneladas por ano. Outros 8 milhões são perdidos durante o processamento e transporte, dessa quantidade, 3 milhões atingem o solo (WYSZKOWSKI; SIVITSKAYA, 2012 apud VINNIK; OVCHAROV, 2004).

Nos últimos anos na região de Londrina tem ocorrido vários acidentes envolvendo a contaminação de solo com óleo diesel. A título de exemplo, pode-se indicar que no dia 31 de março de 2011, aconteceu um acidente na BR-369, entre os municípios de Londrina e Cambé, em que um caminhão-tanque tombou e causou o derramamento de mais de 15 mil litros de óleo diesel (ALMEIDA, 2011). No dia 19 de Junho de 2012, na zona norte de Londrina, um vagão se rompeu durante uma manobra dentro do pátio ferroviário, derramando cerca de 40 mil litros de óleo diesel (KOMARCHESQUI, 2012). O último acidente importante ocorreu no dia 17 de dezembro de 2013, em que cerca de 25 mil litros de óleo diesel vazaram de um caminhão (trem) que tombou na PR-862, no Contorno Norte de Iporã, o diesel derramado contaminou uma área de cerca de 300 m² (GONÇALVES, 2013).

O efeito da contaminação do solo com diesel, depende do tipo e quantidade de óleo derramado, da época do ano, do tipo de solo, e da espécie vegetal e sua idade. Os solos contaminados com hidrocarbonetos, geralmente, diminuem sua capacidade de campo e apresentam menores disponibilidades de oxigênio e nutrientes. O nitrogênio é um dos nutrientes menos disponíveis no solo contaminado com diesel gerando, assim, uma restrição ao crescimento das plantas (BONA et al., 2011).

Os métodos mais comuns para o tratamento de solo contaminado com hidrocarbonetos são os físicos e químicos, podendo se destacar: a dispersão, diluição, sorção, volatilização, extração, utilização de agentes tensoativos e dispersantes e incineração. No entanto, algumas dessas técnicas implicam em transferência de poluentes do ambiente terrestre para a atmosfera, sendo

associados a efeitos ecotoxicológicos (ADEKUNLE, 2011).

Dentre as técnicas de tratamento para solos contaminados com compostos orgânicos, a fitorremediação apresenta grande potencial, por ser mais econômica e segura que os métodos físicos ou químicos convencionais (WANG et al., 2010). Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da fitorremediação na fertilidade do solo contaminado com biodiesel B10.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Análises Químicas do Solo

Para a determinação dos macro e micronutrientes foram seguidas as metodologias de extração e análises descritas em Pavan et al. (1992), realizando as seguintes extrações: *Extração com KCl 1M, para determinação de Ca, Mg e Al.* Foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL 10 g de amostra de terra fina seca ao ar (TFSA) e 100 mL de KCl 1M, agitados durante 15 minutos em mesa agitadora orbital (TECNAL TE-145) a 200 rpm, e deixado em repouso por 16 horas, para obtenção de um extrato límpido. *Extração com solução de Mehlich-1 (mistura de H_2SO_4 0,025N + HCl 0,05N), para determinação de P, K e micronutrientes (Cu, Fe, Zn e Mn),* foram transferidos 5 g de TFSA para erlenmeyer de 125 mL onde foi adicionado 50 mL de solução extratora Melich-1, agitando em mesa agitadora orbital (TECNAL TE-145) durante 5 minutos a 200 rpm, e deixado em repouso por 16 horas, para obtenção de um extrato límpido.

5.4.1.1 Macronutrientes

5.4.1.1.1 Determinação de Ca^{2+} e Mg^{2+}

25 mL do sobrenadante (extrato) foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL, onde foi adicionado 4 mL de solução tampão pH 10 e 4 gotas do indicador negro de eriocromo T e, posteriormente, titulado com solução de EDTA 0,025 N até a mudança de coloração de rosa para azul.

5.4.1.1.2 Determinação de Ca^{2+}

25 mL do sobrenadante (extrato) foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL, adicionado-se 4 mL do coquetel Ca^{2+} e 4 gotas do indicador calcon.

Procedeu-se, então, a titulação com solução de EDTA 0,025N até a mudança de coloração de rosa para roxo.

5.4.1.1.3 Determinação de K

20 mL do sobrenadante (extrato) foram transferidos para tubo de ensaio e a leitura efetuada no fotômetro de chama Micronal B262 após calibração do equipamento com a solução padrão de potássio.

5.4.1.1.4 Determinação de P

5 mL do sobrenadante (extrato) foram transferidos para tubo de ensaio, onde foram adicionados 10 mL de solução de STM (molibdato de amônio + carbonato básico de bismuto) e 10 µL de solução de ácido ascórbico (0,25 g A. ascórbico em 5 mL de água). Após de 30 minutos foi efetuada a leitura no espectrofotômetro UV FEMTO 600 plus a 630 nm.

5.4.1.2 Micronutrientes

A determinação dos micronutrientes, Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , no extrato Mehlich-1 foi realizada seguindo a metodologia descrita em EMBRAPA (1997). Cerca de 10 mL do extrato foram transferidos para tubo de ensaio e os microelementos foram determinados por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) em equipamento GBC 932 AA, devidamente calibrado.

5.4.1.3 Leitura de pH

As medidas de pH foram executadas, transferindo 10 g de TFSA para erlenmeyer de 125 mL e adicionando 25 mL de solução de CaCl_2 0,01M. Agitou-se durante 15 minutos a 200 rpm. Após 30 minutos de repouso efetuou-se a leitura em potenciômetro Oakon Acom Series (PAVAN et al., 1992).

5.4.1.4 Determinação de Al trocável (Al^{3+})

O Al^{3+} foi determinado por titulação. 10 mL do extrato foram adicionados em erlenmeyer de 125 mL e, em seguida, foram adicionadas 4 gotas de azul de bromotimol. A solução foi titulada com NaOH 0,01N.

5.4.1.5 Determinação de Carbono Orgânico Total (COT)

Para a determinação do carbono orgânico total (COT) pesou-se 0,5 g de TFSA em erlenmeyer de 250 mL, posteriormente foram adicionados 10 mL $K_2Cr_2O_7$ e 10 mL de H_2SO_4 e deixados em repouso por 30 minutos para permitir a oxidação do C. Após esta etapa foram adicionados 50 mL de água destilada, 3 mL de H_3PO_4 e 0,5 mL do indicador de difenilamina. A solução foi titulada com $FeSO_4$ 1N até a mudança de cor marrom para verde escuro.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Macronutrientes

No final do experimento (75 dias após a instalação do experimento) foram feitas análises químicas para avaliação dos macronutrientes do solo e os resultados para os diferentes tratamentos de solo nas três camadas estão apresentados na Tabela 6.

No caso do magnésio, foi observada interação significativa entre os fatores, taxa de contaminação e os tratamentos do solo nas camadas intermediária e inferior. Na camada intermediária a interação entre tratamentos só foi significativa para o solo contaminado com 2% de B10, sendo que o solo autoclavado e cultivado não diferiram entre si, mas somente quando comparado ao solo controle. A análise entre porcentagens de contaminação foi significativa para os solos autoclavado e cultivado, sendo a contaminação com 2% superior em ambos os casos. Na camada inferior, ao se comparar entre tratamentos, o solo sem contaminação e com 2% de B10 foram estatisticamente diferentes, no primeiro caso a maior concentração de Mg foi determinada para o solo controle e no segundo para o solo autolavado. O resultado do presente estudo para contaminação de solo com 2% de biodiesel B10 é semelhante ao apresentado por Ekundayo, Emede, Osayande (2001) que estudaram o crescimento do milho em solo contaminado com petróleo e observaram que após a contaminação há um aumento no teor de Mg no solo. Para o caso do solo contaminado com 1% de biodiesel B10, não houve um comportamento bem definido, resultados que contrariam aos apresentados por Osuagwu et al. (2013), que avaliaram o desenvolvimento da *Dioscorea bulbifera* em solo contaminado com petróleo em diferentes concentrações, evidenciando uma redução de 20% de Mg para o solo contaminado.

Para o cálcio a interação entre os fatores, foi significativa unicamente para a camada intermediária. Na comparação entre os tratamentos, o solo autoclavado sobressaiu para 0% (solo sem contaminação) e o solo controle para o contaminado com 1% de B10. Para 2% não houve diferenças significativas. Na comparação entre os níveis de contaminação, o solo não contaminado foi estatisticamente superior para os três tratamentos. O resultado do presente estudo difere do obtido Obire, Nwaubeta (2002) que avaliaram os efeitos nas propriedades físico-químicas do solo contaminado com 5% de diesel e determinaram que houve um aumento na concentração desse cátion após a contaminação.

Para o K^+ , nas três camadas houve interação significativa entre os dois fatores estudados. A camada superior e intermediária apresentaram o mesmo comportamento. Na análise entre fatores, o solo controle destacou-se para os três níveis de contaminação (0%, 1% e 2%). Na comparação entre as porcentagens de B10 apresentaram diferenças significativas o solo autoclavado e cultivado, sendo que o solo não contaminado foi superior em relação ao primeiro e o contaminado com 2% em relação ao segundo. Estes resultados não apresentaram comportamento bem definido, e são diferentes aos apresentados por Wyszowski, Sivitskaya (2012) que reportam um aumento proporcional do teor de K ao aumentar o nível de contaminação do solo por óleo combustível.

Os resultados apresentados em publicações sobre o comportamento do fósforo em solos contaminados com combustíveis fósseis não são homogêneos, reportando diminuição (CARAVACA; ROLDÁN, 2003; OBIRE; NWAUBETA, 2002; OSUAGWU et al., 2013), aumento (EKUNDAYO; EMEDE; OSAYANDE, 2001), ou variações não significativas (WYSZKOWSKI; SIVITSKAYA, 2012). No presente trabalho, as análises indicaram que houve variações significativas para a camada intermediária e inferior. Na camada intermediária, o solo cultivado apresentou os menores teores quando comparado com os outros dois tratamentos, que não diferiam entre si. Na camada inferior, o comportamento foi muito similar ao obtido na camada de 10-20 cm, mas, no caso do solo contaminado com 1% de B10 as diferenças não foram significativas. Além disso, nas três camadas a disponibilidade de P no solo diminuiu com o aumento da concentração de B10.

Tabela 6 – Valores médios dos macronutrientes do solo no final do experimento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando *Canavalia ensiformis*

% de contaminação de B10	Camada Superior (0-10cm)			Camada Intermediária (10-20cm)			Camada Inferior (20-30cm)		
	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado
Mg									
0	1,64	1,57	1,47	1,27 aA	0,92 bA	1,31 bA	1,83 aA	0,90 bB	1,00 aB
1	1,65	0,96	1,23	0,90 aA	1,09 bA	1,13 bA	1,33 aA	1,25 bA	1,29 aA
2	1,37	1,72	1,60	1,32 aB	1,80 aA	1,84 aA	1,61 aB	2,22 aA	1,58 aB
	CV%: 24,38			CV%: 18,05			CV%: 23,05		
Ca									
0	5,77	5,75	5,50	5,87aAB	6,05 aA	5,67 aB	5,92	5,92	5,75
1	5,57	5,65	5,59	6,02 aA	5,50 bB	5,42 abB	5,65	5,38	5,51
2	5,61	5,35	5,52	5,33 bA	5,12 cA	5,32 bA	5,17	5,09	5,21
	CV%: 3,83			CV%: 3,26			CV%: 3,40		
K									
0	1,14 aA	0,92 aB	0,67 bC	1,19 aA	0,97 aB	0,86 bB	1,30 aA	0,99 aB	0,90 bB
1	0,97 aA	0,82 abAB	0,70 bB	1,04 aA	0,89 abAB	0,83 bB	1,10 bA	0,91 aA	0,92 bA
2	1,09 aA	0,71 bB	1,02 aA	1,17 aA	0,75 bB	1,14 aA	1,19 abA	0,70 bB	1,18 aA
	CV%: 12,53			CV%: 10,01			CV%: 10,88		
P									
0	5,03	4,71	3,27	4,99 aA	4,94 aA	2,74 aB	5,02 aA	4,86 aA	2,79 aB
1	3,70	3,83	2,73	3,39 bA	3,31 bA	2,36 aB	2,65 bA	2,74 bA	2,53 aA
2	2,93	3,55	1,81	2,37 cA	2,60 cA	1,37 bB	1,71bAB	2,46 bA	1,23 bB
	CV%: 13,75			CV%: 12,06			CV%: 23,45		

Mg, Ca e K em $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$; P em mg kg^{-1} . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam a comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e cultivado). A ausência de letras indica que a interação entre os fatores não foi significativa.

5.5.2 MICRONUTRIENTES

Na tabela 7 estão os valores médios dos micronutrientes do solo no final do experimento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando *Canavalia ensiformis*. Os resultados indicam que a interação entre os fatores para cobre e ferro não foram significativos em nenhuma das tres camadas, e para o Zn e Mn, foi significativa unicamente a camada superior.

Ao comparar os tratamentos (letras maiúsculas na tabela 7), o manganês na camada superior, apresentou diferenças unicamente para 2% de B10 no solo, encontrando-se que o menor teor foi para o solo controle. Na comparação entre concentrações de B10 (letras minúsculas), houve diferenças para solo autoclavado e cultivado, sendo que nos dois tratamentos o solo com 2% foi significativamente superior. Ao comparar as médias, na camada intermediária e inferior, o solo com 2% de B10 teve a maior quantidade de Mn.

Ao comparar as médias em todos os tratamentos, nas três camadas, (exceto no solo controle na camada intermediária), a concentração de Zn no solo apresentou um comportamento inversamente proporcional, ou seja, aumentando-se a concentração de B10 reduz-se a de Zn. As interações na camada superior foram significativas e, ao comparar os tratamentos, o solo cultivado foi inferior para o solo não contaminado, diminuição que pode estar associada a absorção deste metal pela planta. Para 1 e 2% os valores indicaram que o solo autoclavado apresentou os menores teores de Zn no solo.

Os resultados para Fe, Mn e Zn, apresentados no presente trabalho são semelhantes aos reportados por Pavanelli (2007), que avaliou a disponibilidade dos micronutrientes em solo contaminado com petróleo, determinando que o teor de Fe, Mn e Zn, não apresentou diferenças significativas na presença do contaminante. No caso do Cu, o aumento da concentração de petróleo no solo, diminuiu significativamente o teor de Cu trocável.

Tabela 7 – Valores médios dos micronutrientes do solo no final do tratamento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando *Canavalia ensiformis*

% de contaminação de B10	Camada Superior (0-10cm)			Camada Intermediária (10-20cm)			Camada Inferior (20-30cm)		
	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Cultivado
Mn									
0	226,25 aA	236,75 bA	185,00 bA	181,00	218,00	202,00	238,75	230,75	212,00
1	182,00 aA	225,75 bA	209,50 bA	171,50	201,25	265,50	253,75	298,50	354,50
2	208,25 aB	424,75 aA	424,75 aA	387,75	593,00	567,00	487,00	613,25	529,00
	CV%: 29,82			CV%: 16,23			CV%: 21,18		
Fe									
0	54,64	57,86	82,38	57,74	57,25	104,52	79,10	53,85	100,82
1	56,23	65,04	101,12	62,92	87,28	148,68	125,93	164,02	165,04
2	126,26	152,44	225,98	186,12	261,46	255,82	255,51	330,94	266,32
	CV%: 41,67			CV%: 36,93			CV%: 32,79		
Zn									
0	4,17 aA	3,08 aB	3,23 aB	3,96	2,69	3,29	4,22	2,86	3,29
1	2,86 bA	2,04 bB	2,48 bAB	2,80	2,10	2,55	3,02	1,91	2,61
2	2,28 cA	1,56 cB	2,38 bA	2,84	1,26	2,21	2,66	1,40	2,12
	CV%: 10,24			CV%: 12,33			CV%: 16,91		
Cu									
0	16,90	15,83	15,22	16,78	14,74	16,25	18,07	14,88	16,21
1	13,41	12,90	13,78	13,54	14,24	15,72	16,78	16,36	18,28
2	14,10	15,09	16,54	16,72	16,05	18,07	18,29	18,92	19,68
	CV%: 10,11			CV%: 13,53			CV%: 16,17		

Mn, Fe, Zn e Cu em $\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam a comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e cultivado). A ausência de letras indica que a interação entre os fatores não foi significativa.

5.5.3 pH

Os resultados da variação do pH são apresentados na tabela 8. Só na camada intermediária (10-20 cm) as interações entre fatores porcentagem de contaminação e tratamentos, foram significativas. A comparação entre tratamentos mostrou que somente para o solo sem contaminação (0%) a autoclavagem foi inferior aos outros dois tratamentos, na comparação entre os níveis de contaminação de B10, sendo o solo contaminado com 2% superior. Nas três camadas e em todos os tratamentos, o aumento de concentração de biodiesel B10 aumentou também o valor do pH do solo.

Internacionalmente, adota-se a faixa de pH entre 6.0 – 6.5 como a mais adequada para o desenvolvimento da maioria das culturas (Figura 23). No Brasil, a faixa ideal está entre 5,7 – 6,0 (NOVAIS et al., 2007). Os resultados do presente trabalho indicam que o pH dos solos não contaminados em todos os tratamentos e camadas variou de 4,88 a 5,37 podendo classifica-los como muito ácidos, estando ligeiramente abaixo do nível ideal. Nessa faixa de pH há uma maior disponibilidade de micronutrientes (exceto o B) e de alumínio (NOVAIS et al., 2007), entretanto pode ocorrer redução dos teores de macronutrientes Ca, Mg, K, N, S e P. Ao comparar os resultados, e levando em consideração que o aumento da taxa de contaminação com B10, aumentou o pH do solo, deveria ocorrer aumentos nos teores de P disponível, mas experimentalmente ocorreu diminuição. O Ca, Mg e K, tiveram comportamentos oscilantes, mas dentro da considerada adequada. Os micronutrientes apresentaram comportamentos desuniformes, uma vez que, as concentrações de Mn e Fe aumentaram com as taxas de contaminação com B10, em quanto o Zn diminuiu e o Cu não apresentou uma tendência definida.

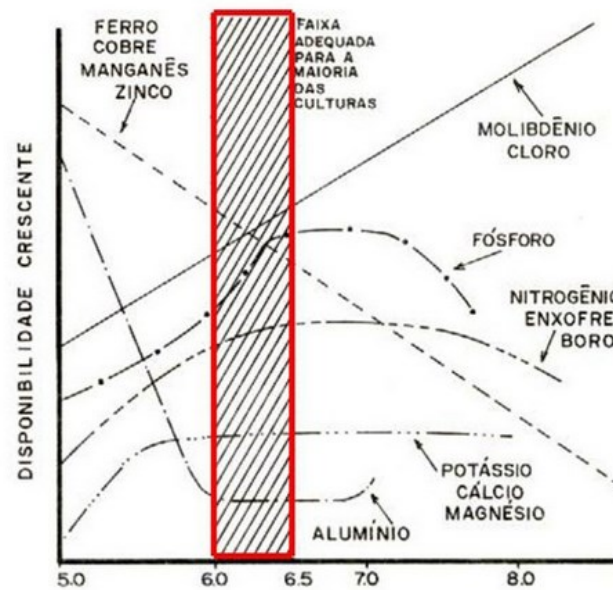
Os resultados obtidos para o pH do solo no presente trabalho assemelham-se aos apresentados por Andrade (2007), Pavanelli (2007) e Osuagwu et al. (2013).

Tabela 8 – Valores médios de carbono orgânico total (COT) e pH do solo no final do tratamento de fitorremediação de solo contaminado com biodiesel B10 usando *Canavalia ensiformis*

% de contaminação de B10	Camada Superior (0-10cm)			Camada Intermediária (10-20cm)			Camada Inferior (20-30cm)		
	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo C. Plantado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo C. Plantado	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo C. Plantado
COT									
0	1,69	1,90	1,67	1,48	1,88	1,85	1,79 cA	1,71 cA	1,73 cA
1	2,43	2,24	2,45	2,20	2,31	2,57	2,29 bB	2,41 bB	2,74 bA
2	3,15	3,03	3,27	3,01	3,01	3,11	3,13 aA	3,11 aA	3,25 aA
	CV%: 7,46			CV%: 11,15			CV%: 6,08		
pH									
0	5,37	5,14	5,37	5,23 bA	4,88 cB	5,28 bA	5,20	5,09	5,36
1	5,52	5,56	5,55	5,46 abA	5,30 bA	5,44 bA	5,43	5,38	5,60
2	5,70	5,77	5,78	5,71 aA	5,92 aA	5,87 aA	5,78	6,02	5,95
	CV%: 2,35			CV%: 2,60			CV%: 2,39		

COT em % e pH em solução de CaCl₂. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam a comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e cultivado). A ausência de letras indica que a interação entre os fatores não foi significativa.

Figura 23 – Disponibilidade de nutrientes e de Al de acordo com o pH do solo



Fonte: Malavolta (1979)

5.5.4 Carbono orgânico total (COT)

Na camada superior e intermediária as interações entre tipo de solo e % de contaminação de B10 não foram significativas ($p > 0,05$) para COT. Na camada inferior, os resultados para os tratamentos sem contaminação (0%) e contaminado com 2% não mostraram diferenças significativas, mas, para o solo autoclavado destacou-se o solo cultivado (Tabela 6).

A adição de biodiesel B10 no solo incrementou o teor de C para todas as camadas e tratamentos de solo. Efeito que se justifica em razão do biodiesel B10 apresentar cerca de 90% de sua composição como hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Resultados que assemelham-se aos encontrados por Ekundayo, Emede e Osayande (2001) para solo contaminado com petróleo e cultivado com milho. Wyzkowski e Sivitskaya (2012), avaliaram as mudanças no conteúdo de carbono orgânico para solos contaminados com várias concentrações de óleo combustível, determinando que houve uma correlação positiva ($r^2 = 0,97$) entre a taxa de contaminação e o C orgânico do solo.

5.6 CONCLUSÕES

A contaminação de biodiesel B10 no solo influenciou na sua fertilidade.

Entre os macronutrientes, o mais afetado foi o fósforo, cuja disponibilidade diminuiu com o aumento da porcentagem de contaminação.

O aumento da contaminação do solo por B10 não alterou significativamente os teores trocáveis de Cu, mas, aumentou os teores de Mn e Fe, e reduziu os teores de Zn.

O teor de C orgânico total e o pH do solo aumentaram com a contaminação de biodiesel B10.

6. ARTIGO C: DESENVOLVIMENTO DA *Canavalia ensiformis* EM SOLO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE COM BODIESEL B10.

6.1 RESUMO

O biodiesel B10 é uma complexa mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, além de ésteres de ácidos graxos de cadeias longas, e em elevadas concentrações tem efeito tóxico para as plantas. Porém, em concentrações baixas, pode ser tolerado e inclusive degradado no solo por diversas maneiras como fotodegradação, biorremediação e fitorremediação. O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito de contaminação de solo com biodiesel B10 na nutrição, crescimento e produção de biomassa da *Canavalia ensiformis*. O experimento foi realizado em casa de vegetação (departamento de agronomia, UEL, Londrina, PR), utilizando recipientes contendo 3,5 kg de um Latossolo Vermelho argiloso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Foram testados 3 níveis de contaminação do solo com biodiesel B10 nas concentrações de 0%, 1% e 2% (m/m) com três épocas de avaliação 20, 40 e 60 dias após da semeadura. As variáveis avaliadas foram: teores foliares dos macronutrientes Ca, Mg, K, P e N e teores foliares dos micronutrientes Cu, Fe, Zn e Mn. Além disso, avaliou-se também a produção de biomassa seca aérea e radicular, altura, número de folhas e área foliar. Nos parâmetros biométricos, foi observado redução significativa na produção de biomassa seca da parte aérea e das raízes, altura das plantas, número de folhas e área foliar nos solos contaminados com 1% e 2% de B10. Quanto à nutrição da *Canavalia ensiformis* foi afetada significativamente pela contaminação do solo com B10, reduzindo a absorção de P, K e Zn.

6.2 ABSTRACT

B10 biodiesel is a complex blend of aliphatic and aromatic hydrocarbons as well as long chain fatty acid esters, and at high concentrations has a toxic effect on plants. However, in low concentrations, it can be tolerated and even degraded in the soil by several ways such as photodegradation, bioremediation and phytoremediation. The present study had as objective to verify the effect of contamination of soil with B10 biodiesel in the nutrition, growth and biomass production of *Canavalia ensiformis*. The experiment was carried out in a greenhouse (Department of Agronomy, UEL, Londrina, PR), using containers containing 3.5 kg of a clayey Oxisol. The experimental design was completely randomized with 4 replicates. Three levels of soil contamination with B10 biodiesel were tested at concentrations of 0%, 1% and 2% (m / m) with three evaluation periods at 20, 40 and 60 days after sowing. The evaluated variables were: leaf contents of the macronutrients Ca, Mg, K, P and N and foliar contents of the Cu, Fe, Zn and Mn micronutrients. In addition, aerial and root dry biomass production, height, number of leaves and leaf area were also evaluated. In the biometric parameters, a significant reduction in dry biomass production of shoots and roots, plant height, number of leaves and leaf area in soil contaminated with 1% and 2% of B10 was observed. Nutrition of *Canavalia ensiformis* was significantly affected by soil contamination with B10, reducing the absorption of P, K and Zn.

6.3. INTRODUÇÃO

Os combustíveis derivados de petróleo são uma das fontes mais importantes de energia na vida moderna. Devido ao volume produzido diariamente, estes ocupam um lugar de destaque dentre os compostos orgânicos contaminantes do solo (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000). Nos últimos anos, tem-se adotado a mistura de diesel de origem fóssil com biodiesel, em diferentes proporções que variam de 2% a 50%. Acredita-se que esta medida seja ambientalmente favorável, não só para redução da emissão de gases de efeito estufa e material particulado, mas, também, por favorecer a degradação dos seus componentes (TAYLOR; JONES, 2001).

Para Sangabriel et al. (2006) os hidrocarbonetos provocam efeitos negativos nas plantas de dois tipos: (a) pelo contato direto, gerando a desintegração da membrana das células e a morte da mesma, diminuindo o intercâmbio gasoso, e inibindo a germinação da semente; e, (b) pela alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Existem vários trabalhos que relatam baixo desenvolvimento das plantas em solos contaminados com hidrocarbonetos, tais como, redução da área foliar, da produção de biomassa, alteração no formato e divisão das células das raízes, dentre outras. Mas, também existem registros de maior comprimento e maior ramificação radicular (BONA et al., 2011).

Segundo Aguiar et al. (2012), existem vários grupos de plantas com potencial para fitorremediar solos contaminados com hidrocarbonetos, entre essas estão as gramíneas, leguminosas, hortaliças, espécies de porte arbóreo, e diversas outras monocotiledôneas e dicotiledôneas.

As leguminosas geralmente apresentam sistema radicular pouco ramificado, mas profundo, o que permite a sua atuação sobre contaminantes nas camadas mais profundas do solo (KIRK et al., 2002), este tipo de planta vive em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbios, formando nódulos nas raízes, que absorvem o nitrogênio do ar, permitindo assim que as bactérias sintetizem substâncias nitrogenadas que posteriormente serão utilizadas pela planta, em compensação a planta fornece açúcares e outros compostos orgânicos às bactérias (KERBAUY, 2004).

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito de contaminação de solo com biodiesel B10 na nutrição, crescimento e produção de biomassa da *Canavalia ensiformis*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Delineamento Experimental

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições. Foram testados 3 níveis de contaminação do solo com biodiesel B10 nas concentrações de 0%, 1% e 2% (m/m) com três épocas de avaliação 20, 40 e 60 dias após da sementeira. Os recipientes foram trocados de posição aleatoriamente a cada 15 dias para evitar efeitos permanentes das condições ambientais do local, como luz, sombra, correntes de ar e outras que pudessem induzir variações não controladas.

6.4.2 Desenvolvimento do Experimento

Inicialmente, após a montagem do experimento, para a evaporação dos compostos mais voláteis, os recipientes, devidamente preenchidos, permaneceram na casa de vegetação por um período de 15 dias mantidos com umidade equivalente a 70-80% da capacidade máxima de retenção de água do solo. Completados os 15 dias, as sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (feijão-deporco), previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial a 1% por 5 minutos e lavadas com água destilada, foram semeadas. Após a sementeira, o experimento foi conduzido por 60 dias, mantendo-se a umidade do solo mediante reposição diária de água evapotranspirada. Em cada época de avaliação as plantas foram colhidas, separando-se a parte aérea das raízes, e secas a 55°C em estufa com circulação e renovação de ar (MARCONi MA 035) até massa constante (SILVA et al., 2002) e, pesadas para obtenção da biomassa seca. As folhas foram trituradas em Micro Moinho Tipo Willye Tecnal - TE648, passadas em peneira de abertura de 1 mm de malha, homogeneizadas e armazenadas para análise.

6.4.3 Avaliações Biométricas

6.4.3.1 Produção de biomassa seca aérea

Em cada época avaliada a parte aérea da planta foi cortada à altura do solo, em seguida lavada com água corrente, água deionizada, seca em estufa com circulação e renovação de ar (MARCONi MA 035) a 55°C, até massa constante (CARNEIRO; REISSMANN; MARQUES, 2006), e, pesada.

6.4.3.2 Produção de biomassa seca radicular

As raízes foram coletadas dos recipientes e lavadas com água de torneira com ajuda de uma peneira de 1 mm de abertura. Uma vez lavadas foram secas em estufa com circulação e renovação de ar (MARCONi MA 035) a 55°C até massa constante, e, determinada a massa seca.

6.4.3.3 Altura da planta e número de folhas

A altura da planta foi medida com o uso de uma régua milimétrica. A determinação do número de folhas foi feita por contagem.

6.4.3.4 Área foliar

As medidas de área foliar foram feitas utilizando equipamento Area meter – SR n° LAM 1018. Model L. I 3.100 –, Licor – USA, passando individualmente cada folha.

6.4.4 Análises Químicas dos Tecidos Vegetais

As análises foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Myazawa et al. (2009). Para determinação dos macronutrientes K, Ca, Mg e P e dos micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn foi realizada digestão nitro-perclórica mediante a transferência de 0,50 g de matéria seca para tubo de digestão. Adicionou-se em seguida 6,0 mL da solução digestora preparada pela mistura de 800 mL de HNO₃ (65%) com 200 mL de HClO₄ (72%). Os tubos foram colocados em bloco digestor, com temperatura inicial de 50°C, aumentada gradativamente até atingir 160°C e deixados nessa temperatura até que não houvesse mais desprendimento de NO₂. Então, a temperatura foi aumentada para 210°C e deixada constante até que iniciasse o desprendimento de gás branco indicando o final da digestão. Depois o extrato foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com água destilada.

6.4.4.1 Macronutrientes

6.4.4.1.1 Determinação de Ca^{2+} e Mg^{2+}

Para análise de Ca e de Mg foi adicionado a um tubo de ensaio 0,1 mL do digerido e 4,9 mL de solução de óxido de lantânio. Após agitação, a determinação de cada elemento foi feita por espectroscopia de absorção atômica de chama em equipamento GBC 932 AA.

6.4.4.1.2 Determinação de K

A determinação de K foi realizado adicionado-se a um tubo de ensaio 1,0 mL do digerido e 9,0 mL de solução de ácido perclórico, após agitação da mistura o K determinado por fotometria de chama em fotômetro Micronal B262.

6.4.4.1.3 Determinação de P

Para determinação do P, foi transferido 5,0 mL do digerido para tubos de ensaio, adicionando-se em seguida 10,0 mL de solução STM (molibdato de amônio + carbonato básico de bismuto) e 10,0 μL solução de ácido ascórbico 5%. Após 30 minutos foi efetuada a leitura no espectrofotômetro UV FEMTO 600 plus a 630 nm, devidamente calibrado.

6.4.4.1.4 Determinação de S

Em erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 10,0 mL do digerido, adicionando-se 1,0 mL de HCl 6N (contendo 20 ppm de S). Posteriormente, acrescentou-se 500 mg de cristais de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e deixou-se em repouso por 1 minuto. Após, procedeu-se a agitação manual por 30 segundos e imediatamente procedeu-se a leitura no espectrofotômetro UV-VIS a 420 nm.

6.4.4.1.5 Determinação de N

Foram transferidos 0,1 g da matéria seca para tubos digestores, adicionando-se em seguida 7 mL de mistura digestora (175 mL de água destilada, 5,47 g de $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou 3,6 g de Na_2SeO_3 ; 21,39 g de ou 48,5 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; 4,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 200 mL de H_2SO_4 concentrado). Os tubos foram colocados em bloco digestor, e em seguida aquecido gradualmente (40°C a cada 30 minutos) até a temperatura de 350°C, mantendo-se esta temperatura até

que o digerido se tornasse translúcido com coloração esverdeada. Posteriormente, o digerido foi submetido a destilação (destilador micro Kjeldahl) recebendo o destilado uma mistura de ácido bórico + indicador misto (20 g de ácido bórico em 1 L de água destilada + 20 de mL solução alcoólica de verde de bromocresol a 0,1% e 6 mL de solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1%). Posteriormente, o destilado foi titulado com uma solução de H_2SO_4 0,05 N. Com base no consumo do ácido sulfúrico calculou-se o teor de nitrogênio foliar (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

6.4.4.2 Micronutrientes

Para a determinação dos micronutrientes Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , no tecido vegetal, 5 mL do digerido foi transferido para tubo de ensaio e efetuada a leitura por Espectrofotometria de Absorção Atômica em equipamento GBC 932 AA, calibrado.

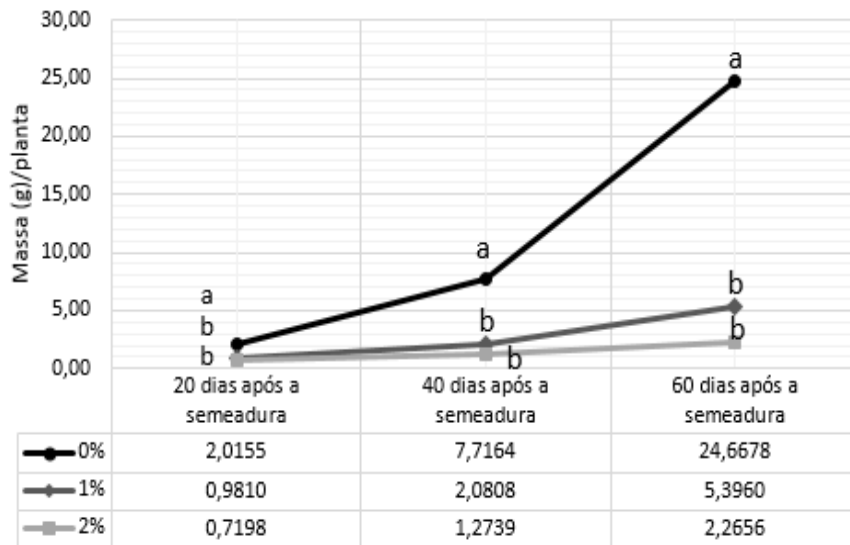
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Avaliações Biométricas

6.5.1.1 Produção de biomassa seca aérea

Para todas as épocas de avaliação, a produção de biomassa apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, sendo sempre superior no solo não contaminado. Nos solos contaminados com 1% e 2% de B10 não foram observadas diferenças significativas, para nenhuma das épocas de avaliação (Figura 24).

Figura 24 – Produção de biomassa seca da parte aérea da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias

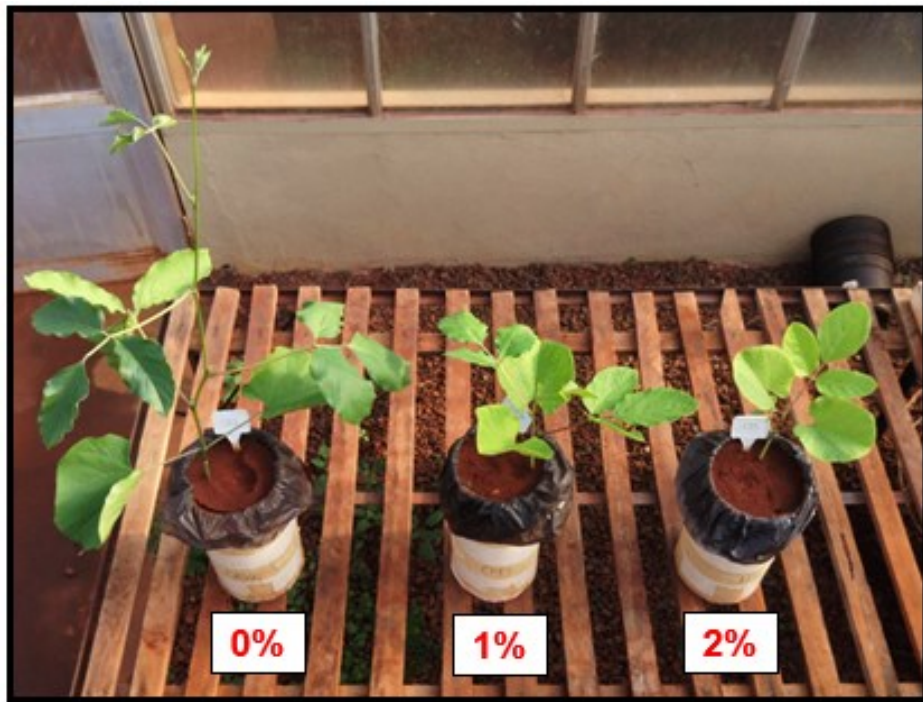


Médias seguidas pela mesma letra para cada época de avaliação nos diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Na avaliação final feita aos 60 dias da semeadura, nos solos contaminados com 1% e 2% de B10 as reduções na produção de biomassa foram de 78,12% e 90,82% respectivamente, resultados que se assemelham aos encontrados por Redondo-Gómez, Petenello e Feldman (2014) que avaliaram a tolerância de *Spartina argentinensis* em solos contaminados com diesel. Os autores relatam redução de 65%, 89% e 92% para solos contaminados com 1%, 2% e 3%, respectivamente. Muratova et al. (2012) avaliaram a capacidade fitorremediadora de diversas plantas do gênero *Poaceae* e *Fabaceae* para remediar solos contaminados com 1% de diesel de petróleo, encontrando redução na produção de biomassa aérea entre 63%-97%.

A Figura 25 apresenta uma fotografia representando a produção de biomassa seca da *Canavalia ensiformis*, 40 dias após a semeadura para solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10.

Figura 25 – Ilustração da produção de biomassa aérea da *Canavalia ensiformis* no dia 40 para o solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10



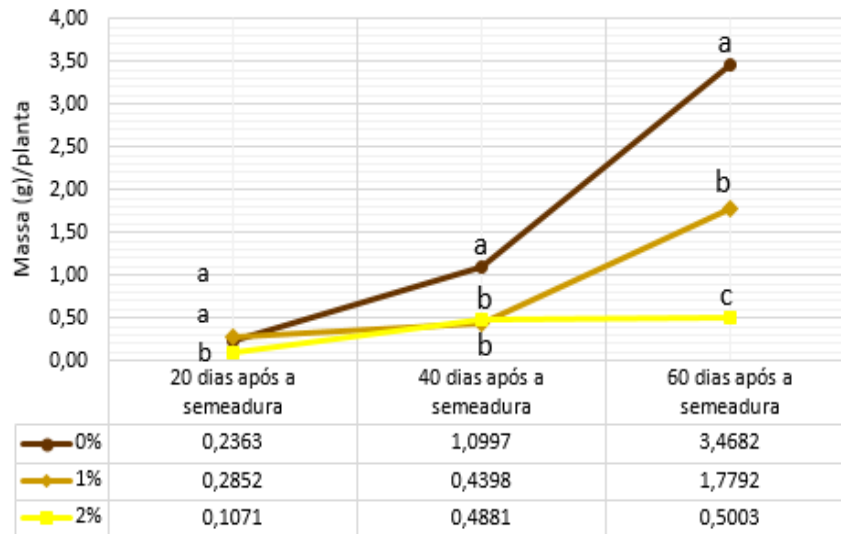
Fonte: o próprio autor

Diversos autores têm relatado que os hidrocarbonetos afetam negativamente o crescimento da planta (ADAM, DUNCAN, 2003; FERRERA-CERRATO et al., 2007; VOUILLAMOZ, MILKE, 2001). Esse efeito negativo pode ser atribuído a vários fatores: 1) a contaminação do solo pelo óleo diesel provoca condições anaeróbias e hidrófobas, reduzindo a absorção dos nutrientes e o desenvolvimento das raízes (KIRK et al., 2005; VWIOKO; FASHEMI, 2005), e, o estresse do sistema radicular pode diminuir o crescimento da parte aérea afetando a produção de biomassa (AGUIAR et al., 2012). 2) a diminuição do teor de N e P no solo, (no caso do N, pelo aumento da imobilização desse nutriente pelos microrganismos) (BARAN; BIELINSKA; WOJEIKOWSKA-KAPUSTA, 2002). 3) os hidrocarbonetos de baixo peso molecular e os aromáticos causam um efeito fitotóxico nas plantas (CHAÎNEAU; MOREL; OUDOT, 1997).

6.5.1.2 Produção de biomassa radicular

Os resultados da produção de biomassa seca radicular para os diferentes tratamentos estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Produção de biomassa seca radicular da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias.



Médias seguidas pela mesma letra para cada época de avaliação nos diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

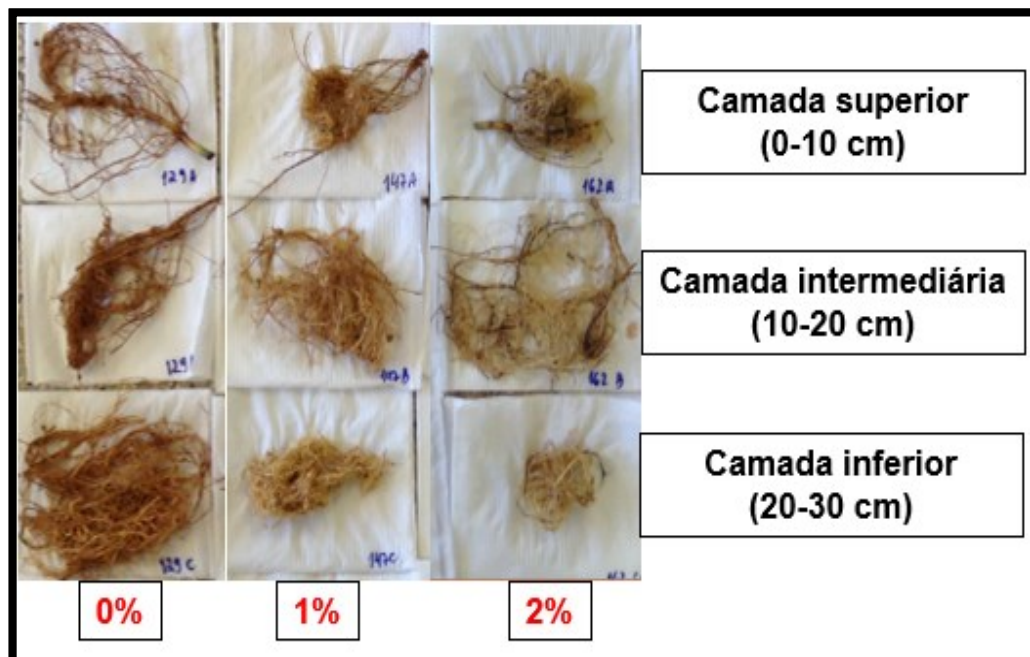
De acordo com a figura 26 observa-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nas três épocas de avaliação. Na avaliação feita aos 20 dias após a semeadura, não foram observadas diferenças significativas para produção de matéria seca radicular entre solos não contaminados e cotaminados com 1% de biodiesel B10, mas, foram superiores em relação ao solo contaminado com 2%. Na avaliação feita aos 40 dias após a semeadura, a produção de biomassa radicular no solo sem contaminado de B10 foi estatisticamente superior em relação o solo contaminado com concentrações de 1% e 2% de B10, entre os solos contaminados não foram observadas diferenças significativas. Na avaliação final feita aos 60 dias após a semeadura, o tratamento sem contaminação foi significativamente superior, para o solo contaminado com 1% de B10 a biomassa radicular diminuiu 48,70% e para 2% 85,57%. Esses resultados são comparáveis com os determinados por Ferrera-Cerrato et al. (2007), que verificaram diminuição da produção de biomassa radicular de 66% durante o cultivo de *Phaseolus coccineus* em solos contaminados com óleo combustível (50000 mg kg^{-1}). Os resultados do presente estudo também são semelhantes aos apresentados por Muratova et al. (2012), que observou diminuição da biomassa radicular entre 26% e 90% para oito espécies vegetais do gênero *Poaceae* e *Fabaceae* cultivadas em solos contaminados com 1% de diesel.

Chen et al. (2013), encontraram que para solos contaminados com 2000 mg kg⁻¹ e 4000 mg kg⁻¹ de diesel (0,2% e 0,4%) o comprimento total das raízes da *Acorus tatarinowii* diminuiu 47% e 84.2%, respectivamente.

As raízes das plantas desempenham um papel importante na remoção de hidrocarbonetos de petróleo no solo. O incremento radicular pode aumentar o volume da rizosfera, aumentando o número de microrganismos que promovem a degradação dos contaminates (CHEN et al., 2013).

Na Figura 27 esta apresentada a produção de biomassa radicular nos tratamentos segundo a profundidade.

Figura 27 – Ilustração da produção de biomassa radicular da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10



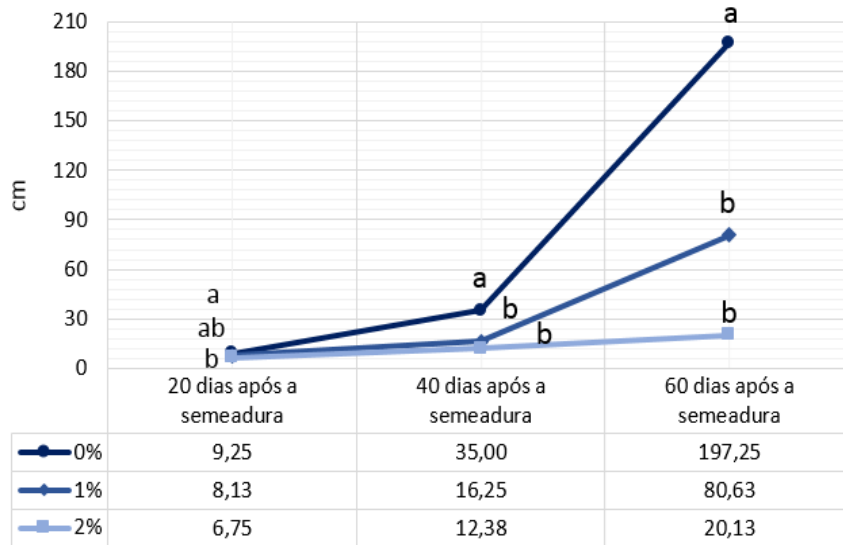
Fonte: o próprio autor

6.5.1.3 Altura

Foram observadas diferenças significativas para a altura da *Canavalia ensiformis*, em solos sem contaminação (0%) e contaminados com 1% e 2% de B10 para todas as épocas de avaliação (Figura 28). No solo sem contaminação ocorreu maior crescimento da planta. Na avaliação feitas aos 40 e 60 dias após a semeadura, os tratamentos 1% e 2% não diferem estatisticamente entre si, mas, são menores em relação ao solo não contaminado. No final do experimento

(60 dias após a semeadura) a redução da altura da planta foi de 59,12% e de 89,79% nos solos contaminados com 1% e 2% de biodiesel B10 respetivamente.

Figura 28 – Altura da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias

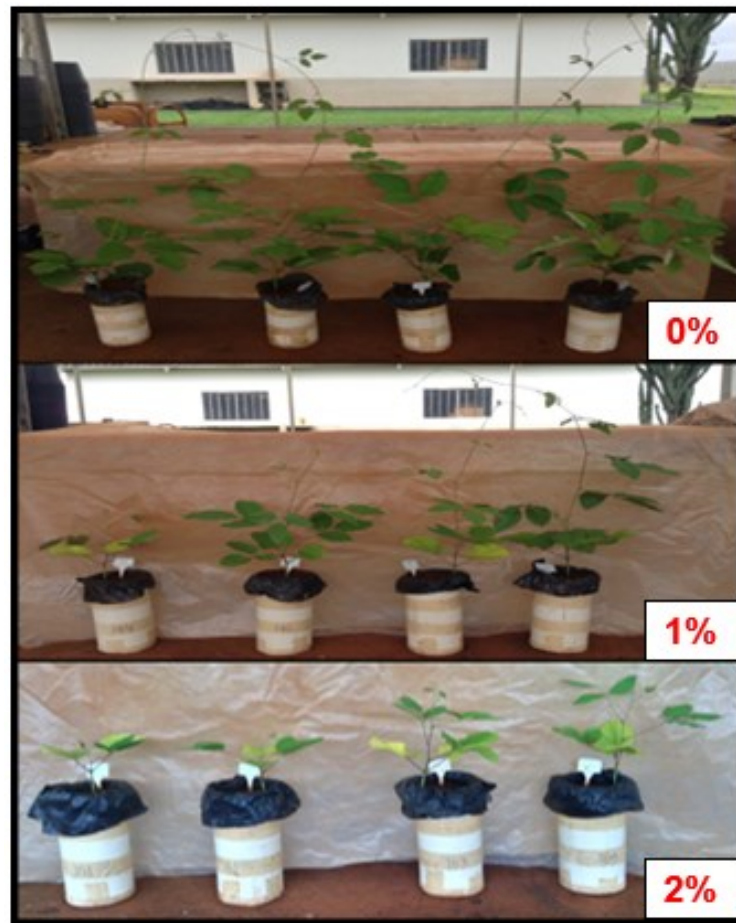


Médias seguidas pela mesma letra para cada época de avaliação nos diferentes tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos no presente estudo são equivalentes áqueles apresentados por Sangabriel et al. (2006), que observaram que a altura de 4 especies vegetais semeadas em solo contaminado com óleo combustível (50000 mg kg⁻¹) foi reduzida entre 10.6% e 37.5%. Porem, os resultados de altura da planta diferem aos encontrados por Ramirez e Dussan (2014) que avaliaram a fitorremediação de lodos contaminados com petróleo usando *Canavalia ensiformis*, chegando a conclusão que não houve diferenças significativas na altura da planta para os diferntes tratamentos.

Na Figura 29 pode-se observar a variação do comprimento da parte aérea na época final de avaliação do experimento (dia 60 após a semeadura) para solos sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10.

Figura 29 – Ilustração da altura da *Canavalia ensiformis* cultivada para o solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de biodiesel B10 aos 60 dias após a semeadura

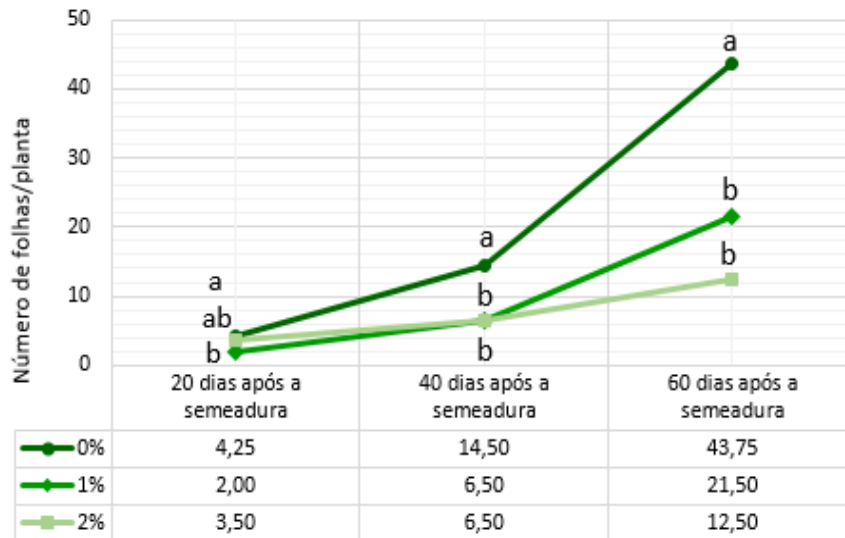


Fonte: o próprio autor

6.5.1.4 Número de folhas

A variação do número de folhas nas plantas cultivadas foi estatisticamente significativo nas diferentes taxas de contaminação do solo com B10, independentemente da época de avaliação. Na avaliação feita aos 40 e 60 dias após a semeadura, o número de folhas das plantas cultivadas sem presença do contaminante (0%) foi maior em relação aos outros dois tratamentos, que não diferiam entre si (Figura 30). Ao final do experimento, a redução do número de folhas para o solo contaminado com 1% de biodiesel B10 foi de 50,85% e para 2% de 71,42%. Os resultados do presente trabalho são análogos aos apresentados por Osuagwu et al. (2013), que avaliaram o efeito da contaminação do solo por petróleo nos parâmetros de crescimento da *Dioscorea bulbifera*. Os autores observaram que conforme aumentava a concentração de petróleo no solo, diminuía o número de folhas.

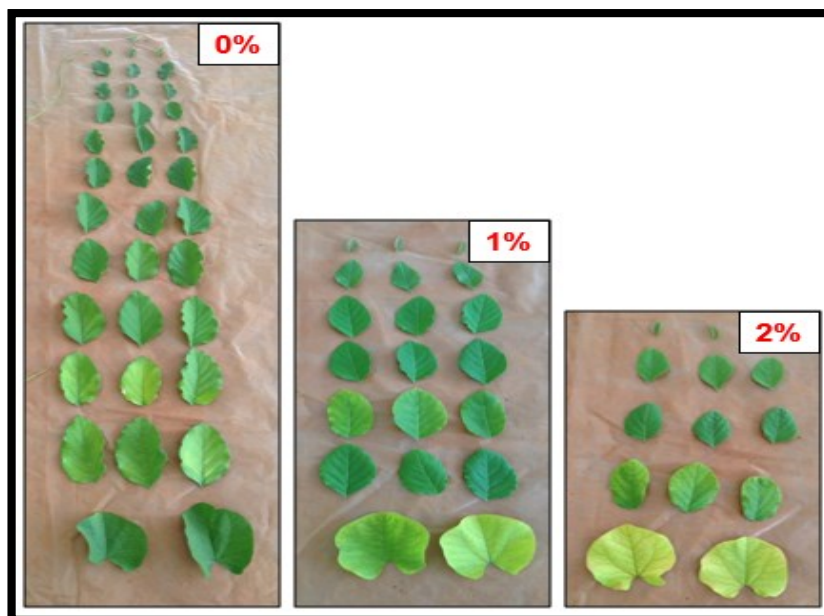
Figura 30 – Número de folhas da *Canavalia ensiformis* cultivada em solos sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias



Médias seguidas pela mesma letra para cada época de avaliação nos diferentes tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Na Figura 31 observa-se o número de folhas em relação com a concentração de B10 no solo. Devido à possível transpiração de alguns compostos tóxicos, como os hidrocarbonetos de baixo peso molecular, as folhas exibem uma coloração amarelada, característica do efeito tóxico do diesel (WILTSE et al., 1998).

Figura 31 – Ilustração do número de folhas da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminado com 1% e 2% de B10 durante 60 dias

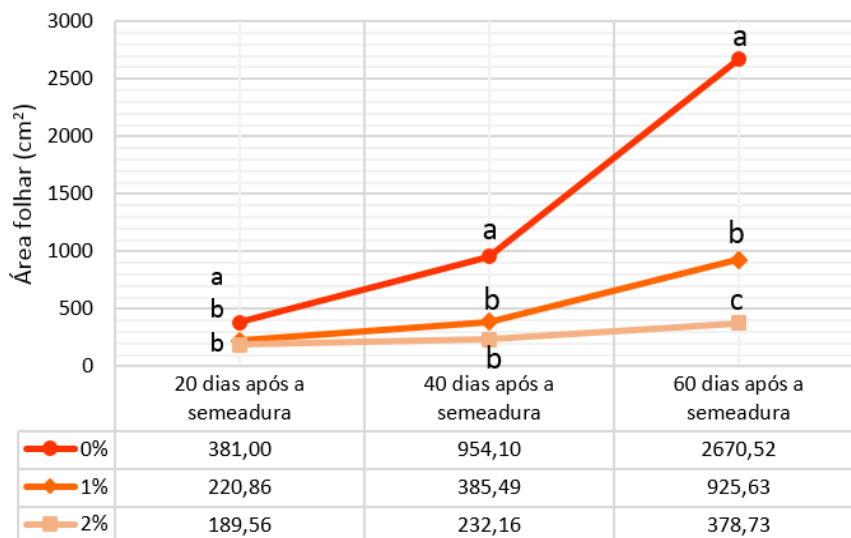


Fonte: o próprio autor

6.5.1.5 Área foliar

As variações da área foliar da *Canavalia ensiformis*, cultivada em solos com e sem contaminação com B10 podem ser observadas na Figura 32. Para as três épocas de avaliação foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para área foliar. Nas épocas de avaliação aos 20 e 40 dias após a semeadura, nos solos contaminados com 1% e 2% de biodiesel B10, as áreas foliares foram significativamente inferiores em relação ao solo não contaminado (0%). No final do experimento, 60 dias após a semeadura, os resultados indicam que conforme aumenta a concentração de B10 no solo, diminuí a área foliar. Para 1% a diminuição foi de 65,34% e para 2% de 85,82%. Os resultados deste estudo diferem aos encontrados por Ramirez e Dussan (2014), pois os autores determinaram que não há variação significativa na área foliar da *Canavalia ensiformis*, durante a fitorremediação de lodos contaminados com petróleo. Porém, os resultados do presente estudo são semelhantes aos reportados por Aguiar et al. (2012), os autores encontraram diferenças significativas para a área foliar da *Glycine max* e *Brachiaria brizantha* na fitorremediação de solos contaminados por petróleo.

Figura 32 – Área foliar da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo sem contaminação e contaminados com 1% e 2% de B10 durante 60 dias



Médias seguidas pela mesma letra para cada época de avaliação nos diferentes tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.5.2 Análises Químicas dos Tecidos Vegetais

6.5.2.1 Macronutrientes

Durante o desenvolvimento do experimento foi avaliada a nutrição da planta em três épocas, 20, 40 e 60 dias depois da semeadura. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das análises químicas para: N, P, K, Ca, Mg e S no tecido foliar da *Canavalia ensiformis* para os diferentes tratamentos testados.

Para o caso do Ca e Mg, os resultados indicam que estes macronutrientes não foram afetados quando a *Canavalia ensiformis* foi cultivada em solos contaminados com 1% ou 2% de biodiesel B10, nas três épocas avaliadas, 20, 40 e 60 dias após semeadura. Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos apresentados por Gazzoni et al. (2010), que avaliaram o processo de absorção dos macro e micronutrientes da *Thypha latifolia* em água contaminada com diesel e biodiesel B2, e verificaram que a absorção de Ca pela planta não variou significativamente nos diferentes tratamentos. No caso do Mg, os resultados diferem, pois no experimento desenvolvido por esses autores, ocorreu uma diminuição de 52,63% na absorção desse macronutriente em águas contaminadas com diesel B2 ao se comparar com o controle, sem contaminação.

Os teores de potássio (K) no tecido foliar da *Canavalia ensiformis* variaram significativamente nas avaliações feitas aos 20 e 60 dias após a semeadura. Aos 20 dias os teores foliares de K foram maiores para o solo sem contaminação, e no dia 60 para o solo com 2% de B10. Os resultados obtidos aos 20 dias são semelhantes com aqueles apresentados por Rivera-Cruz, Maldonado-Chávez e Trujillo-Narcía (2012) para *Brachiaria mutica* e *Leucaena leucocephala*, que verificaram que absorção de K é maior em solos contaminados com hidrocarbonetos. Aos 60 dias, os resultados obtidos indicaram que o teor de K no tecido foliar é menor em solos contaminados com biodiesel B10, resultado que difere ao apresentado por Wyszowski, Wyszowska e Ziółkowska (2004), que verificaram que a absorção de K é diretamente proporcional à porcentagem de contaminação de hidrocarbonetos no solo.

Tabela 9 – Valores médios (três repetições) para teores de macronutrientes da biomassa foliar de *Canavalia ensiformis* para diferentes concentrações de contaminação do solo com B10

% de contaminação com B10	20 dias após Semeadura	40 dias após semeadura	60 dias após semeadura
---------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

N (g/planta)			
0	5,13 a	4,81 a	2,56 a
1	3,53 b	3,11 b	3,12 a
2	1,70 c	1,86 c	2,51 a
% CV	13,12	10,44	27,25
DMS	0,89	0,67	1,47
P (g/planta)			
0	1,25 b	1,75 a	1,30 ab
1	1,50 b	1,45 ab	1,54 a
2	2,31 a	1,02 b	0,82 b
% CV	16,33	16,24	29,76
DMS	0,54	0,45	0,72
K (g/planta)			
0	3,89 a	2,98	1,98 b
1	2,70 b	3,86	2,67 ab
2	2,40 b	2,91	3,29 a
% CV	15,09	15,12	16,65
DMS	0,89	0,97	0,87
Ca (g/planta)			
0	38,50	33,21	36,00
1	40,66	30,14	24,76
2	37,94	34,93	26,99
% CV	11,65	29,99	21,12
DMS	8,98	19,40	12,20
Mg (g/planta)			
0	3,52	2,51	2,26
1	3,40	2,42	2,09
2	3,28	3,09	2,28
% CV	16,70	22,91	19,41
DMS	1,12	1,20	0,85
S (g/planta)			
0	2,24 b	2,82 b	1,63
1	4,80 a	3,85 a	2,55
2	4,78 a	1,58 c	1,72
% CV	12,35	13,60	25,02
DMS	0,96	0,74	0,97

MS: Massa seca. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

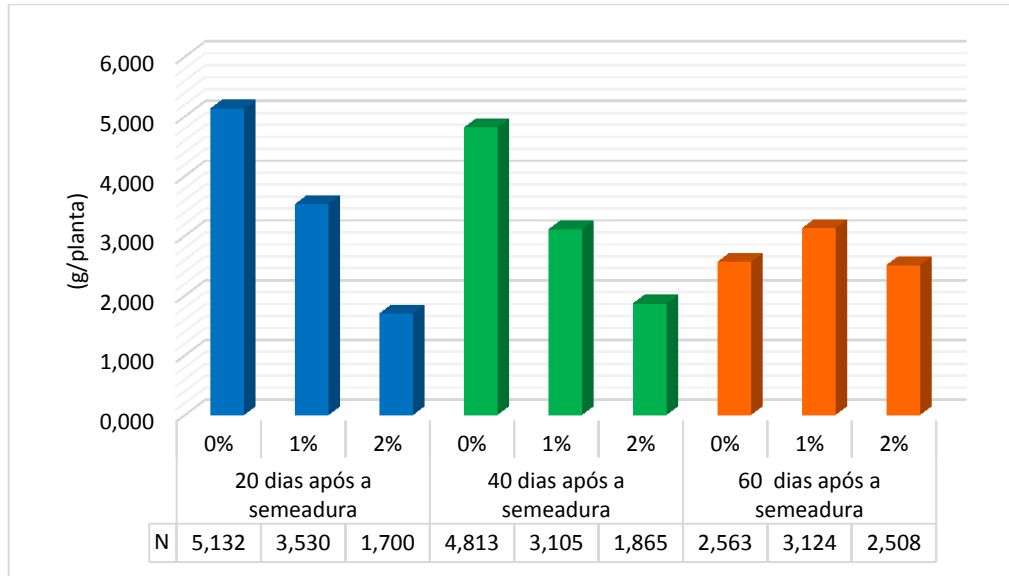
O fósforo (P) não apresentou comportamento uniforme, pois aos 20 dias após a semeadura a concentração de P no tecido vegetal foi superior para o tratamento com 2% de B10 no solo, em relação ao controle. Aos 40 e 60 dias aconteceu o inverso, ou seja, os teores foliares de P no solo contaminado com 2% foi significativamente inferior ao solo controle e contaminado com 1%. O resultado do teor foliar de P aos 20 dias é semelhante ao reportado por Wyszowski, Wyszowska e Ziółkowska (2004). Os resultados nas três épocas avaliadas, diferem dos resultados apresentados por Rivera-Cruz, Maldonado-Chávez e Trujillo-Narcía (2012), que estudaram o processo de nutrição da *Brachiaria mutica* e *Leucaena*

leucocephala em solos contaminados com petróleo, concluindo que depois de 180 dias, a acumulação de P no tecido foliar não variou significativamente.

Os resultados para os teores foliares de enxofre (S), indicam que houve diferenças significativas entre os tratamentos para 20 e 40 dias após a semeadura, sendo favorecida para a contaminação com 1% de B10. Para o caso deste macronutriente é importante levar em consideração que o diesel de petróleo era S500, ou seja, continha 500 ppm de S. Quando o consumo de dióxido de enxofre excede um determinado limite causa toxicidade, provocando uma severa redução no crescimento da planta (RENNENBERG, 1984).

A absorção de nitrogênio (N) foi significativa aos 20 e 40 dias após a semeadura, diminuindo conforme aumentava a porcentagem de contaminação de B10 no solo. Aos 20 dias a diminuição foi de 31,21% e de 66,87% para solo contaminado com 1% e 2% de B10, respectivamente. Aos 40 dias, os resultados foram similares, para 1% foi de 35,47% e para 2% de 61,25%. Aos 60 dias após a semeadura não houve diferença significativa para os três tratamentos (Figura 33). Os resultados a 20 e 40 dias coincidem com os apresentados por Wyszkowski, Wyszkowski e Ziólkowska (2004), que trabalharam com tremoço amarelo em várias concentrações de diesel num solo argiloso e 76 dias de tratamento. Estes resultados, podem ser explicados porque a contaminação de solo por hidrocarbonetos de petróleo amplia a relação C:N no solo e leva ao aumento da imobilização de N pelos microrganismos, reduzindo a quantidade disponível para absorção pelas plantas (XU; JOHNSON, 1997).

Figura 33 – Teores foliares médios de absorção de N pela *Canavalia ensiformis* para solos contaminados com B10 em três épocas de avaliação.



Médias seguidas pela mesma letra na mesma época não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.5.2.2 Micronutrientes

Na Tabela 10 estão apresentados os teores foliares médios dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn, da *Canavalia ensiformis* para diferentes concentrações de B10 no solo.

O teor foliar de ferro avaliado aos 20 dias foi maior no solo não contaminado, porém aumentou com a idade da planta. Para o solo sem contaminação aumentou 2,82 vezes, para 1% de B10 4,56 vezes e para 2% 4,67 vezes. Isso indica que conforme aumentava a idade da planta aumenta o teor de ferro na planta.

O teor foliar de cobre não apresentou diferenças significativas nos dias 20 e 60 após a semeadura, já no dia 40 destacou-se a concentração de 1%. Com o passar do tempo ocorreu o contrário em comparação ao Fe, diminuindo consideravelmente sua concentração, para o tratamento de 2% no dia 60, ficou abaixo do limite de quantificação do equipamento.

O teor foliar de manganês apresentou altos coeficientes de variação devido à alta concentração, apresentando significância somente para o dia 20 após a semeadura. Nas três etapas de avaliação a contaminação de solo por B10, apresentou um aumento na concentração de Mn no tecido foliar.

Tabela 10 – Teores foliares médios (de três repetições) para micronutrientes em *Canavalia ensiformis* para diferentes níveis de contaminação do solo com B10

% de contaminação	20 dias após	40 dias após	60 dias após
-------------------	--------------	--------------	--------------

com B10	semeadura	semeadura	Semeadura
Fe (mg kg⁻¹)			
0	363,92 a	493,53	1026,12
1	252,95 b	469,70	1152,98
2	258,84 b	447,76	1209,58
% CV	16,11	11,49	12,12
DMS	92,87	106,75	0,27
Cu (mg kg⁻¹)			
0	6,34	5,49 ab	0,28
1	6,49	6,79 a	0,08
2	6,30	1,25 b	0,00
% CV	60,32	57,27	28,12
DMS	7,60	5,10	0,65
Mn (mg kg⁻¹)			
0	118,40 b	107,40	148,13
1	376,02 a	310,04	310,33
2	180,28 ab	177,32	286,47
% CV	50,57	69,99	50,81
DMS	224,64	274,04	249,16
Zn (mg kg⁻¹)			
0	22,14	20,10	7,66 b
1	34,04	22,16	7,16 b
2	34,62	25,46	12,25 a
% CV	27,98	21,20	23,94
DMS	16,73	9,45	4,26

Fe, Cu, Mn, Zn, em mg kg⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O teor foliar de Zn, observou-se efeito significativo no dia 60 após a semeadura para a concentração de 2% de B10 no solo destacando-se em relação às outras duas concentrações.

Os resultados do presente estudo para o teor foliar de Cu e Mg são análogos aos resultados apresentados por Martí et al. (2009), esses pesquisadores determinaram que a adição de lodo de petróleo durante o desenvolvimento da alfalfa aumentou a concentração de Fe e Mn 1,2 vezes no tecido foliar, o Zn, que era o elemento mais poluente no lodo, aumentou 1,6 vezes e o Cu não variou significativamente.

Os resultados dos teores foliares dos micronutrientes do presente estudo diferem dos apresentados por Ekundayo, Emede e Osayande (2001), que avaliaram os efeitos do derrame de petróleo no crescimento e produção de milho (*Zea mays L.*) em solos da Nigéria, encontrando que não houve diferenças nas concentrações de micronutrientes na biomassa foliar.

6.6 CONCLUSÕES

A produção de biomassa seca da parte aérea e das raízes, a altura, o número de folhas e área foliar da *Canavalia ensiformis* reduzem significativamente com aumento da contaminação dos solos com 1% e 2% de biodiesel B10.

A nutrição da *Canavalia ensiformis* é afetada pela contaminação do solo com biodiesel de B10.

A contaminação do solo com biodiesel B10 reduz os teores foliares de P, K e Zn da *Canavalia ensiformis*.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A. M. A; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F; ALVAREZ, V. H; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v.1. p.299-351.
- ADAM, G; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370, jan. 2002.
- ADAM, G. DUNCAN, H. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa L.*) plants. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, n. 1, p. 123-130, mar. 2003.
- ADEKUNLE, I. M. Bioremediation of soils contaminated with nigerian petroleum products using composted municipal wastes. **Bioremediation Journal**, v. 15, n. 4, p. 230-241. 2011.
- AGUIAR, C. R. C. et al. Fitorremediação de solos contaminados por petróleo. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 3-9. 2012.
- AL-BALDAWI, I. A. et al. A phytotoxicity test of bulrush (*Scirpus grossus*) grown with diesel contamination in a free-flow reed bed system, **Journal of Hazardous Materials**, v. 252-253, p. 64-69, maio. 2013.
- ALCÂNTARA, P; BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1988. 163 p.
- ALMEIDA, P. Técnicos retiram diesel derramado no Ribeirão Cambé, em Londrina. **Jornal odiaro.com**, Londrina. 01 abr. 2011. Disponível em: <<http://londrina.odiaro.com/londrina/noticia/406052/tecnicos-retiram-diesel-derramado-no-ribeirao-cambe-em-londrina/>> Acesso em: 25 jan. 2015.
- ANCONA, D. B; GUERRERO, L. C; HERNÁNDEZ, E. C. Acetylation and Characterization of *Canavalia ensiformis* Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 378-382, fev. 1997.
- ANDRADE, J. A; AGUSTO, F; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p.17-43, set. 2010.
- ANDRADE, J. C. M; TAVARES, S. R. L; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de textos, 2007. 176p.
- ANDRADE, M. M. **Utilização da turfa sphag sorb no tratamento de solo contaminado com petróleo: avaliação físico-química e espectroscópica**. 2007. 85 fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ANDREONI, V. et al. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 401-412, nov. 2004.

BARAN, S; BIELINSKA, E. J; WOJEIKOWSKA-KAPUSTA, J. The formation of enzymatic activity of soil contaminated by petroleum products. **Acta Agrophiscica**, v. 70, p. 9-19. 2002.

BARRUTIA, O. et al. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 19, p. 4087-4093, set. 2011.

BENTO, M. F. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, jun. 2005.

BERNS, A. E. et al. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. **European Journal of Soil Science**, v. 59, n. 3, p. 540-550, jun. 2008.

BONA, C. et al. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha da plântulas *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Acta botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 2, p. 277-285, abr-jun. 2011.

BORSATO, D. et al. Aplicação do delineamento simplex-centroide no estudo da cinética da oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes sintéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p.1726-1731. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA / DND / CLAV, 1992. 365p.

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry 3rd edition. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 293-465. 2007.

CARAVACA, F; ROLDÁN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, v. 117, n. 1-2, p. 53-61, nov. 2003.

CARLINI, C. R; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1512-1539, nov. 2002.

CARLINI, C. R; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from Concanavalin A, **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667-675. 1981.

CARNEIRO, C; REISSMANN, C. B; MARQUES, R. Comparação de métodos de análise química de K, Ca, Mg e Al, em folhas de erva-mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil). **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 113-122, abr-jun 2006.

- CASTELO-GRANDE, T; AUGUSTO, P. A; BARBOSA, D. **Técnicas de descontaminação de solos: uma revisão**. 2015. Disponível em: <<http://professor.ucg.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/12941/material/tecnicas%20de%20descontamina%C3%A7%C3%A3o%20do%20solo-%20apostila.pdf>> Acesso em: 04 fev. 2015.
- CHAGAS-SPINELLI, A. C. et al. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. **Journal of Environmental Management**, v. 113, p. 510-516, dez. 2012.
- CHAÎNEAU, C. H; MOREL J. L; OUDOT, J. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, n. 6, p.1478–1483, nov. 1997.
- CHANDRAN, P; DAS, N. Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. **Biodegradation**, v. 22, n. 6, p. 1181–1189, abr. 2011.
- CHAPELLE, F.H. **Ground-Water Microbiology and Geochemistry**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993. 424 p.
- CHARVET, R. **Germinação, desenvolvimento e morfoanatomia de *Mimosa pilulifera* Benth (leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado**. 2007. 87 fls. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.
- CHEN, J. et al. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, v. 50, n. 5, p. 639-647, fev. 2003
- CHEN, L. et al. Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. **Plant and Soil**, v. 368, n. 1-2, p. 355-363, jul. 2013.
- CORRER, C. et al. Aplicação in situ de surfactantes em solo contaminado com petróleo e tratamento da água residual com agente oxidante. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4., 2007, Campinas. **Anais** Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0352-2.pdf>. Acesso em: 15 abril. 2014.
- COTTA, J. A. O; REZENDE, M. O. O; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2026-2033. out. 2009.
- COUTO, M. N; MONTEIRO, E; VASCONCELOS, M. T. Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Environmental Science and Research Poluição**, v. 17, n. 7, p. 1339-1346, ago. 2010.

CRUZ, G. F; MARSAIOLI, A. J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1628-1634. 2012.

D'MELLO, J. P. F; WALKER, A. G. Detoxification of jack beans (*Canavalia ensiformis*): studies with young chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 33, n. 1-2, p. 117-127, abr. 1991.

DABROWSKA, D; KOT-WASIK, A; NAMIEŚNIK, J. The Importance of Degradation in the Fate of Selected Organic Compounds in the Environment. Part II. Photodegradation and Biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, n. 6, p. 617-626. 2004.

DAS, N; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13. 2011.

DEFERRARI, M. S. et al. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 388-399, jun. 2011.

DICKINSON, S. J; RUTHERFORD, P. M. Utilization of biosolids during the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, n. 4, p. 982-991, maio, 2006.

EKUNDAYO, E. O; EMEDE, T. O; OSAYANDE, D.I. Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zea mays L.*) in soils of midwestern Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 313-324. 2001.

EMBRAPA. **Feijão-de-porco: leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo**. Recomendações técnicas n° 12. Altamira, 2000.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPACNPS, 1997. 212p.

ESCALANTE-ESPINOSA, E. et al. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere**, v. 59, n. 3, p. 405-413, abr. 2005.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**. Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, J. et al. **Caracterização Espectroscópica da Matéria Orgânica do Solo**. Circular Técnica. São Carlos: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, v. 24, p. 1-3, out. 2004.

FERRERA-CERRATO, R. et al. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. **Agrociencia**, v. 41, n. 8, p. 817-826, nov-dez. 2007.

FINE, P; GRABER, E. R; YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. **Soil Technology**, v. 10, n. 2, p. 133-153, fev. 1997.

FRANKEL, E. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n.1-2, p. 1-22. 1980.

FRITSCH, W; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms. In: KLEIN, J. **Environmental Processes- Soil Decontamination**. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 145-164.

GASKIN, S. E; BENTHAM, R. H. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 17, p. 3683-3688, ago. 2010.

GAYLARDE, C. C; BELLINASSO, M. L; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GAZZONI, B. F. et al. Tratamento de água residual contendo diesel de petróleo e B2 utilizando *Thypha latifolia*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p.1-11. 2010.

GONÇALVES, J. Cerca de 25 mil litros de óleo diesel vazaram em acidente. **Jornal de Londrina**, Londrina. 17 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.jornaldelondrina.com.br/londrina/conteudo.phtml?tl=1&id=1433998&tit=Cerca-de-25-mil-litros-de-oleo-diesel-vazaram-em-acidente>>. Acesso em: 25 jan. 2015.

HALL, C. et al. Hydrocarbons and the evolution of human culture. **Nature**, v. 426, p. 318-322, nov. 2003.

IBAMA. **Relatório de acidentes ambientais 2013**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/category/36-p?download=9348%3Arelatorio-acidentes-ambientais-registrados-pelo-ibama-em-2013>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

INMET. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Estações convencionais – gráficos**. 2014. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf>. Acesso em: 03 dez. 2014.

JUWARKAR, A. A; SINGH, S. K; MUDHOO, A. A comprehensive overview of elements in bioremediation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 9, n. 3, p. 215-288, 2010.

KAIMI, E et al. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, n. 1-2, p. 110-119, jan. 2006.

KAIMI, E; MUKAIDANI, T; TAMAKI, M. Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Plant Production Science**, v. 10, n. 2, p. 211-218. 2007.

KARAVALAKIS, G; STOURNAS, S; KARONIS, D. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2483–2489. 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KHAN, F. I; HUSAIN, T; HEJAZI; R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 71, n. 2, p. 95-122, abr. 2004.

KIRK, J. et al. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. **Bioremediation Journal**, v. 6, n. 1, p. 57-63, 2002.

KIRK, J. L. et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. , n. 3, p. 455-465, fev. 2005.

KOMARCHESQUI, B. Acidente com trem causa vazamento de óleo no Ribeirão Lindoia. **Jornal de Londrina**, Londrina. 20 jun. 2012. Disponível em: <
<http://www.jornaldelondrina.com.br/londrina/conteudo.phtml?tl=1&id=1267222&tit=Acidente-com-trem-causa-vazamento-de-oleo-no-Ribeirao-Lindoia> > Acesso em: 25 jan. 2015.

KUMKE, M. U; LÖHMANNSRÖBEN, H. G; ROCH, T. Fluorescence spectroscopy of polynuclear aromatic compounds in environmental monitoring. **Journal of Fluorescence**, v. 5, p. 139–153, 1995.

LAPINSKIENĖ, A; MARTINKUS , P; RĚBŽDAITÉ, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 432-437, ago. 2006.

LEITE, R. **Degradação ambiental de óleo diesel aditivado e em mistura com biodiesel**. 2007. 67 fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

LEÓN, A. et al. Detoxification of jackbean (*Canavalia ensiformis L.*) with pilot scale roasting.: II: Nutritional value for poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, n. 3-4, p. 231-242, ago. 1998.

LIN, Q; MENDELSSOHN, I. A. Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. **Ecological Engineering**, v. 35, n. 1, p. 85-91, jan. 2009.

LIN, X. et al. Evaluation of Plant–Microorganism Synergy for the Remediation of Diesel Fuel Contaminated Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 19-24, jul. 2008.

LOBO, I. P; FERREIRA, S. L. C; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1596-1608. 2009.

LOPES, W. A; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera, **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516. 1996.

LUTHY, R. G. et al. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 12, p. 3341-3347, nov. 1997

MA, F; HANNA, M. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, out. 1999.

MAIA, E. C; et al. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 9, p. 1750-1755, set. 2011.

MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronomia Ceres, 1979. 255 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas – princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARQUES, M; AGUIAR, C. R. C; SILVA, J. J. L. S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 1-11, jan-fev. 2011.

MARTÍ, M. C. et al. Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1-3, p. 879-885, nov. 2009.

MARTIN, G. M. A. et al. Respuesta de la *Canavalia ensiformis* a la inoculación micorrízica con *Glomus cubense* (cepa INCAM-4), su efecto de permanencia en el cultivo del maíz,. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 33, n. 2, p. 20-28, abr-jun. 2012.

McCONKEY, B. J. et al. Natural sunlight induced photooxidation of naphthalene in aqueous solution. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 136, n. 1-4, p. 347-359, maio. 2002.

MEGHARAJ, M. et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, v. 37, p. 1362-1375, 2011.

MEHER, L. C; SAGAR, D. V; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, jun. 2006.

MÉNDEZ, A. et al. La Concanavalina A reduce la Energía metabolizable verdadera del maíz. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 22, n. 3, abr. 2004. Disponível em :<http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692004000300004&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 05 fev. 2015.

- MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. 146 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.
- MOLINA-BARAHONA, L. et al. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n. 2, p. 165-175, out. 2004.
- MORAIS, D. L. et al. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 343-349, jan. 2012.
- MOUBASHER, H. A. et al. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 98, p. 113-120, mar. 2015
- MUDGE, S. M; PEREIRA, G. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 5, n. 5-6, p. 353-355, out. 1999.
- MULINARI, F. et al. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042-2050, out. 2007.
- MURATOVA, A. Y. et al. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. **Applied Soil Ecology**, v. 56, p. 51–57, maio. 2012.
- MYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. F. S.; MELO, W. J. Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C.(Ed.) **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. p. 235-396. 2009.
- NICODEM, D. E. et al. Photochemistry of petroleum. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 26, p. 219-238. 2001.
- NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2007. 1016 p.
- OBIRE, O; NWAUBETA, O. Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physicochemical and bacteriological characteristics. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 6, n. 1, p. 39-44, jun. 2002.
- OGBO, E. M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 250-253, jan. 2008.

OSUAGWU, A. N. et al. Effect of Crude Oil Pollution on Growth Parameters, Chlorophyll Content and Bulbils Yield in Air Potato (*Dioscorea bulbifera* L.). **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 37-42, abr. 2013.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1497-1500, fev. 2009.

PALMROTH, M. R. T; PICHTEL, J; PUHAKKA, J. A. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 3, p. 221-228, set. 2002.

PAVAN, M. et al. **Manual de análise química de solo e controle de qualidade**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1992. 39 p.

PAVANELLI, A. G. **Fitorremediação de solo contaminado com petróleo utilizando *Typha latifolia***. 2007. 77 fls. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

PEÑA-CASTRO, J. M. et al. Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. **TERRA Latinoamericana**, v. 24, n. 4, p. 529-539, out-dez. 2006.

PEREIRA, A. D. N. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773. maio. 2000.

PEZESHKI, S. R. et al. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 2, p. 129-139, maio. 2000.

PIETROLETTI, M. et al. Preliminary evaluation of hydrocarbon removal power of *Caulerpa racemosa* in seawater by means of infrared and visible spectroscopic measurements. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 77, n. 3, p. 673-679, out. 2010.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p.15-39, jun. 2005.

PRINCE, R. C; HAITMANEK, C; COYLE, C. L. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, n. 8, p. 1446-1451, abr. 2008.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul-ago. 2006.

RAMIREZ, D; DUSSAN, J. Landfarmed oil sludge as a carbon source for *Canavalia ensiformis* during phytoremediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 1197-1206, abr. 2014.

REDONDO-GÓMEZ, S; PETENELLO, M. C; FELDMAN, S. R. Growth, nutrient status, and photosynthetic response to diesel-contaminated soil of a cordgrass, *Spartina argentinensis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, n. 1-2, p. 34-38, jan. 2014.

REGINATTO, C. et al. Biorremediação de um solo argiloso contaminado com uma mistura de diesel e biodiesel através da bioventilação. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 1, jan-jun. 2012.

REID, B. J; JONES, K, C; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments-a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 1, p. 103-112, abr. 2000.

RENNENBERG, H. The fate of excess sulfur in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 121-153, jun. 1984.

RIVERA-CRUZ, M. C; MALDONADO-CHÁVEZ, E; TRUJILLO-NARCÍA, A. Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and on soil and plant macronutrients. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 2, p. S30-39. 2012.

SANGABRIEL, W. et al. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 22, n.2, p. 63-73. 2006.

SARKAR, D. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 1, p. 187-195, jul. 2005

SHUTTLEWORTH, K. L; CERNIGLIA, E. Environmental Aspects of PAH Biodegradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 54, p. 291-302, jul, 1995.

SICILIANO, S. D. et al. Changes in Microbial Community Composition and Function during a Polyaromatic Hydrocarbon Phytoremediation Field Trial. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 483-489, jan. 2003.

SILVA, F. A. S; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78. 2002.

SILVA, S. R. S. et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SKOOG, D; HOLLER, F; NIEMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookaman, 2002. 805 p.

SLOBODANKA, P. et al. Phytoremediation capacity of poplar (*Populus spp.*) And willow (*Salix spp.*) Clones in relation to photosynthesis. **Archives of Biological Sciences**, v. 61, n. 2, p. 239-247. 2009.

SOLEIMANI, M. et al. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p.1084-1090, nov. 2010.

SUAREZ, P. A. Z; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 2068-2071. 2007.

TAYLOR, L. T; JONES, D. M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. **Chemosphere**, v. 44, n. 5, p. 1131-1136, ago. 2001.

TRAMONTINI, L. **Microrremediação de um solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel**. 2013. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

TREVORS, J. T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 1-2, p. 53-59, jul. 1996.

UDEDIBIE, A. B. I; CARLINI, C. R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds – A review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 74, n. 2, p. 95-106, ago. 1998.

USEPA - UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Introduction to phytoremediation**. Ohio, 2000. 105 p.

USEPA. **Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide**. 1994. Disponível em:
<<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/2000KG7K.PDF?Dockey=2000KG7K.PDF>>. Acesso em: 03 fev. 2015.

VINNIK V.V; OVCHAROV S.N. Samoochishchenie pochv, agriazniennyh syroj neftju v prisutstvii miestnyh form dozhdievyh cherviej. **Aktualnye Problemy Biologii, Mediciny i Ekologii**, v. 1, p. 409-410. 2004.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VOUILLAMOZ, J; MILKE, M. W. Effect of compost in phytoremediation of diesel-contaminated soils. **Water Science & Technology**, v. 43, n. 2, p. 291-295. 2001.

VWIOKO, D. E; FASHEMI, D. S. Growth Response of *Ricinus communis* L (Castor Oil) in Spent Lubricating Oil Polluted Soil. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management**, v. 9, n. 2, p. 73-79. 2005.

WAKEHAM, S. G. Synchronous Fluorescence Spectroscopy and Its Application to Indigenous and Petroleum-Derived Hydrocarbons in Lacustrine Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 3, p. 272-276, mar. 1977.

WANG, J. et al. Phytoremediation potential of *Cyperus rotundus* for diesel contaminated wetland. **J Shanghai Univ, Shanghai**, v. 14, n. 5, p. 326-331. 2010.

WANG, J. et al. Growth response and phytoremediation ability of Reed for diesel contamination. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 68-74, nov. 2011.

WILSON, S. C; JONES, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Environmental Pollution**, v. 81, p. 229-249. 1993.

WILTSE, C. C. et al. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among Alfalfa genotypes. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, n. 1, p. 169-173, jan. 1998.

WOLICKA, D. et al. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3221-3227, jul. 2009.

WYSZKOWSKI, M; SIVITSKAYA V. Changes in the content of organic carbon and available forms of macronutrients in soil under the influence of soil contamination with fuel oil and application of different substances. **Journal of Elementology**, v. 17, n. 1, p. 139-148. 2012.

WYSZKOWSKI, M; WYSZKOWSKA, J; ZIÓLKOWSKA, A. Effect of soil contamination with diesel oil on yellow lupine yield and macroelements content. **Plant Soil Environment**, v. 50, n. 5, p. 218-226. 2004.

XU, J. G; JOHNSON, R. L. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. **Canadian Journal Of Soil Science**, v. 77, n. 3, p. 453-458. 1997.

ZACHARYASZ, P; SIEPAK, J; ROSADA, J. Petroleum-Contaminated Soil and Water Analysis and Biodegradation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 5, p. 1467-1480. 2012.

ZHANG, Y. et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, ago. 2003.

ZHANG, Z. et al. Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of *Pharbitis nil* L. and its microbial community. **Science of the Environment**, v. 408, n. 22, p. 5600-5605, out. 2010

ZHOU, E; CRAWFORD, R. L. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, v. 6, n. 2, p. 127-140, jun. 1995.

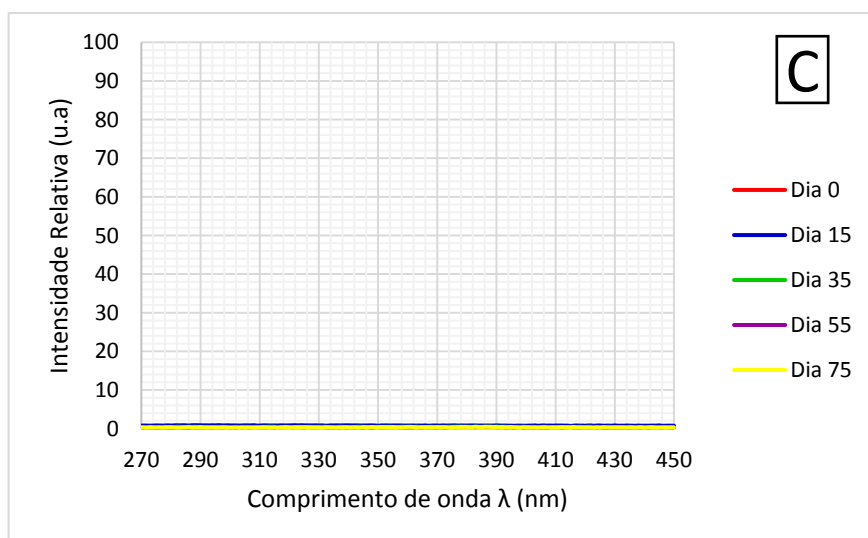
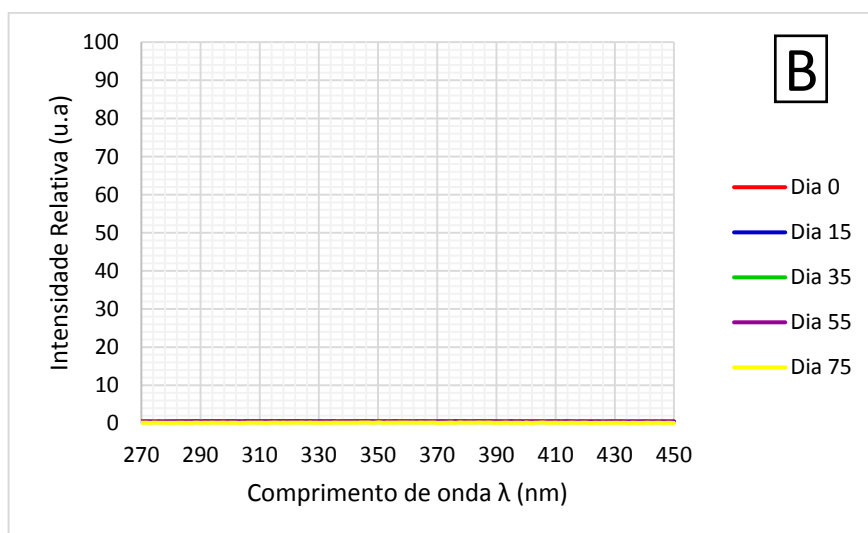
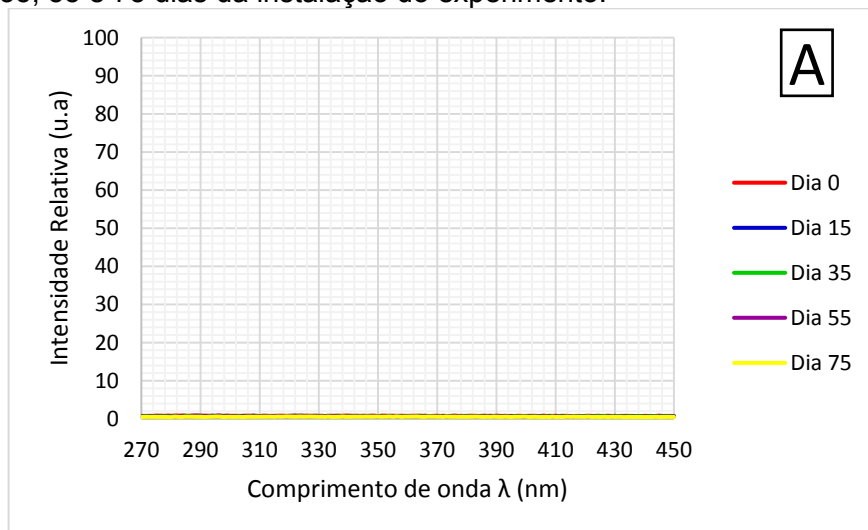
ZHOU, Q; SUN, F; LIU, R. Joint chemical flushing of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. **Environment International**, v. 31, n. 6, p. 835-839, ago. 2005.

ZHU, L; LU, L; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils, **Frontiers of Environmental Science e Engineering in China**, v. 4, n. 4, p. 373-386, dez. 2010.

ANEXOS

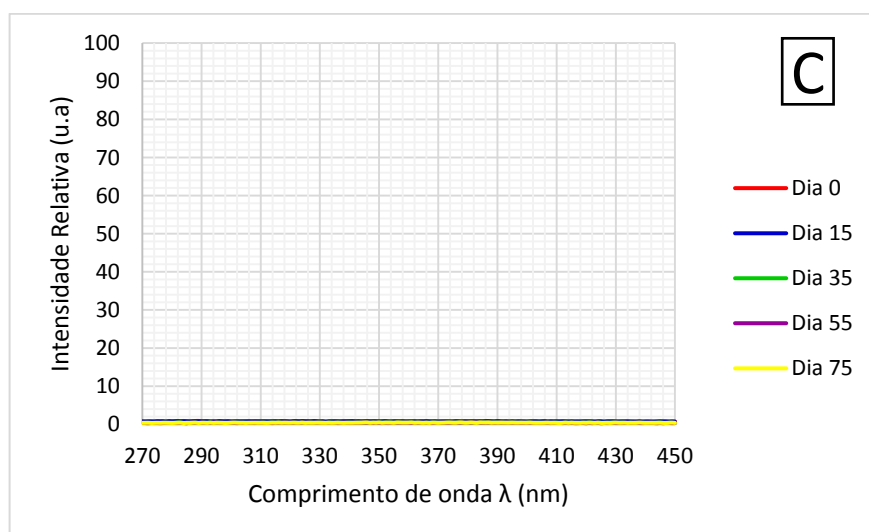
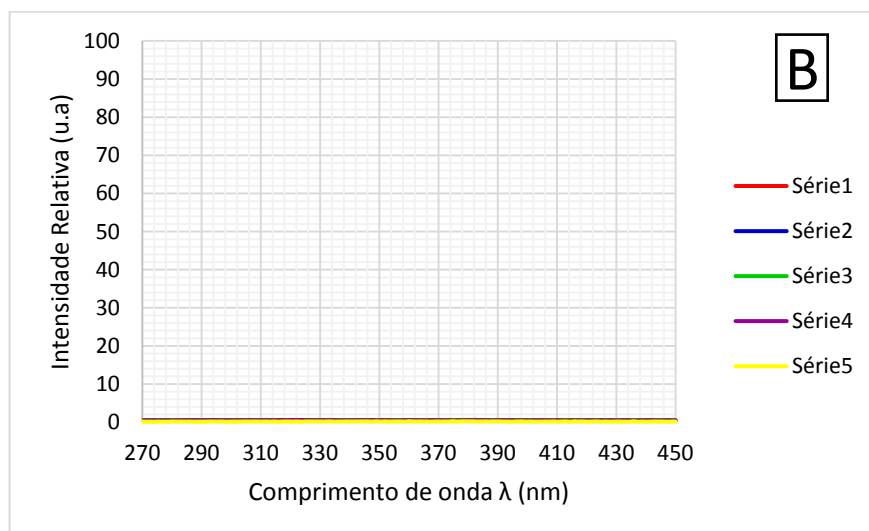
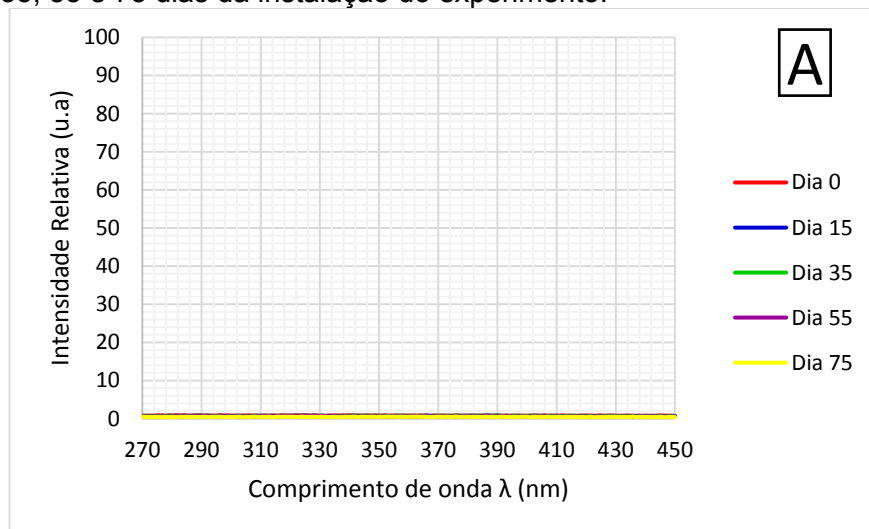
ANEXO A

Espectros de fluorescência *synchronous* para os solos sem contaminação de B10 na camada superficial (0-10 cm), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



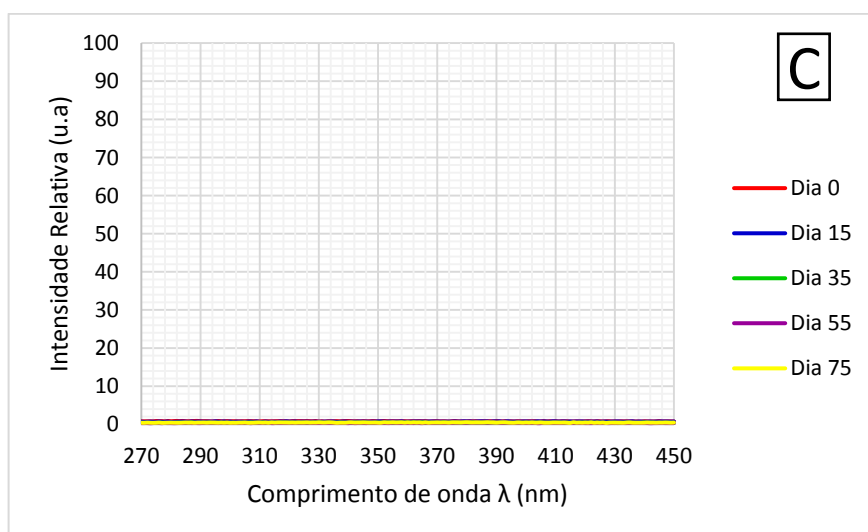
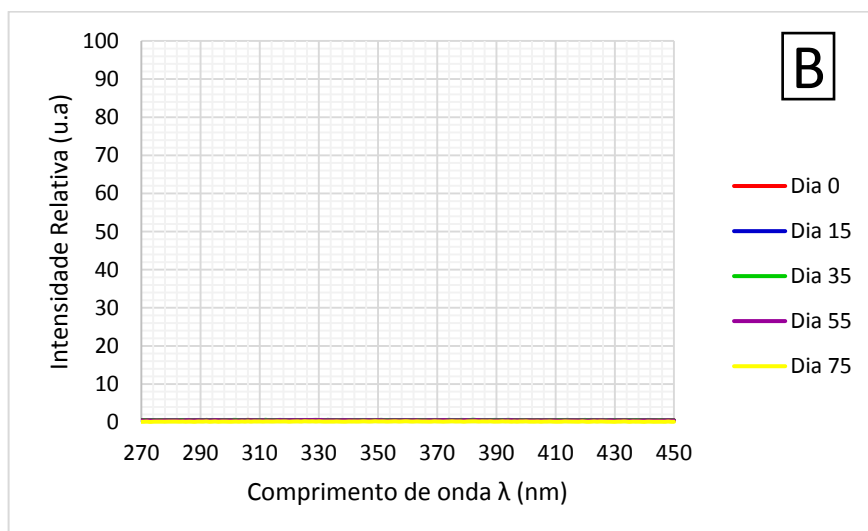
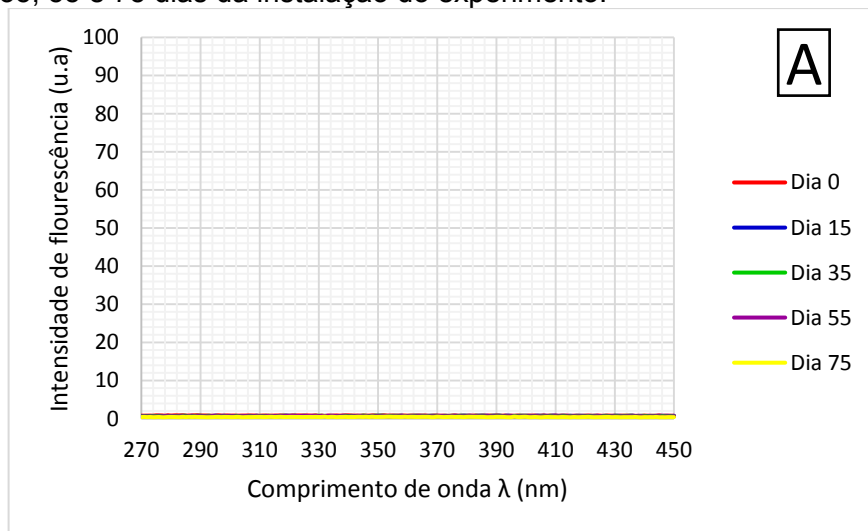
A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Espectros de fluorescência *synchronous* para os solos sem contaminação de B10 na camada superficial (10-20 cm), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

Espectros de fluorescência *synchronous* para os solos sem contaminação de B10 na camada superficial (20-30 cm), aos 0, 15, 35, 55 e 75 dias da instalação do experimento.



A: Solo controle; B: Solo autoclavado; C: Solo cultivado

ANEXO B

Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos no início do experimento

% contaminação de B10	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Controle Plantado
Camada Superior (0-10 cm)			
0	143 bA	91 cA	143 bA
1	3016 aB	3383 aA	3015 aB
2	2811 aA	2264 bB	2811 aA
CV%: 6,94			
Camada Intermediária (10-20 cm)			
0	143 bA	91 cA	143 bA
1	3016 aB	3383 aA	3016 aB
2	2811 aA	2267 bB	2811 aA
CV%: 6,94			
Camada Inferior (20-30 cm)			
0	143 bA	91 cA	143 bA
1	3016 aB	3383 aA	3016 aB
2	2811 aA	2267 bB	2811 aA
CV%: 6,94			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e controle plantado).

Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos aos 15 dias

% contaminação de B10	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Controle Plantado
Camada Superior (0-10 cm)			
0	131 cA	80 aA	131 cA
1	1685 aA	236 aB	1685 aA
2	1446 aA	193 aB	1446 bA
CV%:15,53			
Camada Intermediária (10-20 cm)			
0	130 cA	76 aA	130 cA
1	1587 bA	274 aB	1586 bA
2	2521 aA	261 aB	2521 aA
CV%:25,39			
Camada Inferior (20-30 cm)			
0	129 cA	70 bA	129 cA
1	1625 bA	332 aB	1625 bA
2	2757 aA	311 aB	2757 aA
CV%: 7,17			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e controle plantado).

Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos aos 35 dias

% contaminação de B10	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Controle Plantado
Camada Superior (0-10 cm)			
0	133 bA	99 cB	77 cB
1	196 aB	234 bA	186 aB
2	179 aB	327 aA	143 bC
CV%: 9,58			
Camada Intermediária (10-20 cm)			
0	130 bA	97 cAB	73 bB
1	215 aAB	234 bA	179 aB
2	224 aB	355 aA	195 aB
CV%:15,73			
Camada Inferior (20-30 cm)			
0	126 bA	94 cAB	72 cB
1	247 aB	336 bA	178 bC
2	247 aB	399 aA	240 aB
CV%:13,03			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e controle plantado).

Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos aos 55 dias

% contaminação de B10	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Controle Plantado
Camada Superior (0-10 cm)			
0	117 bA	88bB	65 cB
1	183 aB	226 aA	204 aAB
2	191 aB	226 aA	175 bB
CV%: 9,04			
Camada Intermediária (10-20 cm)			
0	112 cA	87 cAB	66 bB
1	160 bB	227 bA	194 aAB
2	207 aB	272 aA	214 aB
CV%:12,28			
Camada Inferior (20-30 cm)			
0	112 cA	85 cA	66 cA
1	172 bB	289 bA	196 bB
2	238 aB	393 aA	276 aB
CV%:13,79			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e controle plantado).

Valores médios da área integrada de fluorescência para a interação entre a concentração do B10 no solo e os tratamentos aos 75 dias

% contaminação de B10	Solo Controle	Solo Autoclavado	Solo Controle Plantado
Camada Superior (0-10 cm)			
0	96 bA	33 cB	63 cAB
1	244 aA	192 bAB	171 bB
2	224 aB	327 aA	274 aAB
	CV%: 18,55		
Camada Intermediária (10-20 cm)			
0	82 bA	30 cA	74 cA
1	231 aA	180 bA	195 bA
2	273 aB	366 aA	318 aAB
	CV%: 18,15		
Camada Inferior (20-30 cm)*			
0	77	28	83
1	228	207	218
2	322	402	342
	CV%: 21,19		

*Não foi aplicado o teste de Tukey por que o F de interação entre os tratamentos e a porcentagem de contaminação não foi significativa. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. As letras minúsculas indicam comparação entre as porcentagens de contaminação e as maiúsculas entre os tratamentos (solos controle, autoclavado e controle plantado).