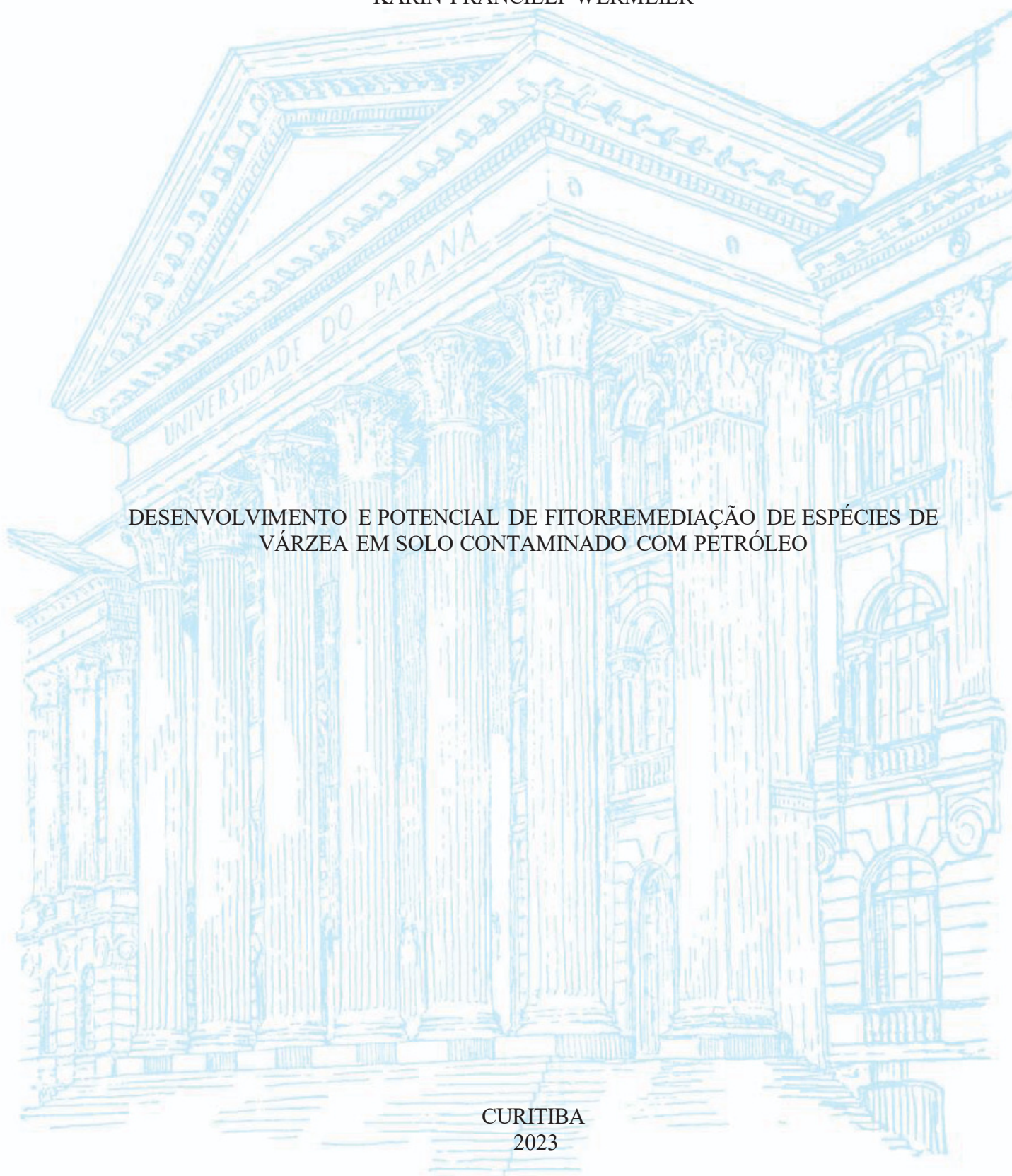


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIN FRANCIELI WERMEIER

DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
VÁRZEA EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

CURITIBA  
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIN FRANCIELI WERMEIER

DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
VÁRZEA EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, área de concentração em Morfologia e Anatomia vegetal, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Erika Amano

CURITIBA  
2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Wermeier, Karin Francieli.

Desenvolvimento e potencial de fitorremediação de espécies de várzea em solo contaminado com petróleo. / Karin Francieli Wermeier. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

Orientadora: Erika Amano.

1. Morfologia. 2. Plantas. 3. Typhaceae. 4. Cyperus. 5. Mimosa. 6. Árvores – Crescimento. 7. Solos – Contaminação. 8. Poluição por petróleo. 9. Fitorremediação. I. Amano, Erika, 1978- . II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BOTÂNICA -  
40001016004P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KARIN FRANCIELI WERMEIER** intitulada: **Desenvolvimento e potencial de fitorremediação de espécies de várzea em solo contaminado com petróleo**, sob orientação da Profa. Dra. ERIKA AMANO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 10:25:57.0

ERIKA AMANO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 11:04:16.0

RAFAEL SHINJI AKIYAMA KITAMURA

Avaliador Externo (UFPR - PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO)

Assinatura Eletrônica

28/07/2023 11:54:26.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## RESUMO

A contaminação por petróleo é um dos impactos ambientais mais preocupantes no mundo todo, e a busca por alternativas eficientes e que não causem mais impacto para a descontaminação dos locais degradados, tem crescido nas últimas décadas. A fitorremediação vem sendo uma ferramenta promissora de remediação de áreas contaminadas, porém, ainda são necessários muitos estudos prévios para levantamento de espécies aptas e os efeitos dos contaminantes em diversos níveis nas diferentes espécies. De modo geral, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de *Mimosa oblonga*, *Cyperus virens* e *Typha dominguensis* em solo contaminado com petróleo. No primeiro e segundo capítulo analisamos as espécies *M. oblonga* e *C. virens* respectivamente, quanto à germinação, crescimento, sobrevivência, biomassa, tamanho de raiz e análise de potencial fitorremediador. No terceiro capítulo, foi avaliado se espécimes de *Typha dominguensis* que se desenvolveram em solo contaminado por petróleo podem ser afetadas quanto ao seu desenvolvimento em parâmetros anatômicos e morfológicos como tamanho e quantidade de folhas e se apresentam compostos fenólicos em suas folhas, além disso, foi avaliado o potencial de acúmulo de BETEX. Como resultado observamos que *M. oblonga* apresenta altas taxas de germinação e ausência de toxicidade nas variáveis estudadas. *C. virens* apresentou germinação significativamente baixa nos tratamentos com contaminação, assim como crescimento, tamanho de raiz e biomassa, no entanto, os indivíduos jovens apresentaram altas taxas de crescimento, e sobrevivência mesmo no solo com contaminação mais alta de petróleo. Esses achados em nosso trabalho juntamente com o fato de que ambas as espécies promoveram uma grande redução de petróleo do solo, fazem de *M. oblonga* e *C. virens* fortes opção para utilização em processos de fitorremediação. Os resultados no terceiro capítulo com *T. dominguensis* indicaram que os indivíduos que crescem no ambiente contaminado com petróleo apresentam folhas maiores, produção de compostos fenólicos e formação de aerênquimas como alteração anatômica, além de não ser uma espécie capaz de absorver o petróleo do solo, no entanto tem se desenvolvido bem no ambiente e demonstrado alta capacidade de responder positivamente ao estresse, também sendo uma boa opção para utilização em processos de recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Morfologia; *Typha dominguensis*; *Cyperus virens*; *Mimosa oblonga*; crescimento.

## ABSTRACT

Petroleum contamination is one of the most worrying environmental impacts worldwide, and the search for efficient alternatives that do not cause more impact for the decontamination of degraded sites has grown in recent decades. Phytoremediation has been a promising tool for remediation of contaminated areas, however, many previous studies are still necessary to survey suitable species and the effects of contaminants at different levels in different species. In general, the present study aimed to evaluate the development of *Mimosa oblonga*, *Cyperus virens* and *Typha dominguensis* in oil-contaminated soil. In the first and second chapter we analyzed the species *B. oblonga* and *C. virens* respectively, regarding germination, growth, survival, biomass, root size and phytoremediation potential analysis. In the third chapter, it was evaluated whether specimens of *Typha dominguensis* that developed in soil contaminated by oil can be affected in terms of their development in anatomical and morphological parameters such as size and number of leaves and if they present phenolic compounds in their leaves, in addition, it was evaluated the potential for accumulation of BETEX. As a result, we observed that *M. oblonga* presents high germination rates and absence of toxicity in the variables studied. *C. virens* showed significantly lower germination in contaminated treatments, as well as growth, root size and biomass, however, young individuals showed high growth rates, and survival even in soil with higher oil contamination. These findings in our work, together with the fact that both species promoted a great reduction of oil in the soil, make *M. oblonga* and *C. virens* strong options for use in phytoremediation processes. The results in the third chapter with *T. dominguensis* indicated that individuals growing in an environment contaminated with oil have larger leaves, production of phenolic compounds and formation of aerenchyma as an anatomical alteration, in addition to not being a species capable of absorbing oil from the soil, however, it has developed well in the environment and demonstrated a high ability to respond positively to stress, also being a good option for use in recovery processes of degraded areas.

Keywords: Morphology; *Typha dominguensis*; *Cyperus virens*; *Mimosa oblonga*; growth.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I - Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Mimosa oblonga* Benth em solo contaminado com petróleo

- Figura 1.** Plântula de *Mimosa oblonga*. A. plantula completa (CT- Cotiledone; EO – eófilo expandido; M1 – primeiro metafilo expandido; M2 – segundo metafilo visível). B. Detalhes da folha composta (primeiro metafilo) C. detalhe da folha composta (eófilo). D. sementes de *M. oblonga* ..... 43
- Figura 2.** Sementes germinadas de *Mimosa oblonga* em concentrações crescente de petróleo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2% (T2) e 4% (T4). Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ ) ..... 44
- Figura 3.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de *M. oblonga* ao longo de 10 dias após semeadura nos tratamentos sem contaminante (T0) e com concentrações crescentes de petróleo, com 2% (T2) e 4% (T4) ..... 44
- Figura 4.** Comprimento de parte aérea de *Mimosa oblonga* aos 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 120 (D) dias de crescimento, em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ ) ..... 46
- Figura 5.** Comprimento de raiz de *Mimosa oblonga* (A) e biomassa fresca (B) após 120 dias de germinação e desenvolvimento em solo não contaminado (T0) e solo contaminado com 2% (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ ) .....47
- Figura 6.** Estimativa de área foliar (EAF) do eófilo, 1º metáfilo e 2º metáfilo (A, B e C respectivamente) e quantidade de folhas (D) de *Mimosa oblonga* dos tratamentos controle, (T0) e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ ) ..... 48
- Figura 7.** Indivíduos de *Mimosa oblonga* antes do plantio do experimento II (A) e indivíduos após plantio nos vasos do experimento II (B, C e D), evidenciando a perda de algumas folhas e necrose de alguns folíolos ..... 49
- Figura 8.** Comprimento de parte aérea de *Mimosa oblonga* aos 30, 60, 90 e 120 dias de crescimento nas figuras A, B, C e D respectivamente, em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo no experimento 2. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ )..... 50
- Figura 9.** Biomassa (A) e comprimento de raiz (B) de *Mimosa oblonga* após 120 dias de experimento em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo no experimento 2. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ )..... 51

## Capítulo II - Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Cyperus virens* Michx em solo contaminado com petróleo

**Figura 1.** Resultado da germinação de *Cyperus virens* em concentrações crescente de petróleo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ..... 67

**Figura 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de *Cyperus virens* submetido a tratamento de solo não contaminado (T0) e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo .....67

**Figura 3.** Comprimento de parte aérea de *Cyperus virens* aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 250 dias de crescimento em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ..... 68

**Figura 4.** Comprimento de raiz e Biomassa de *Cyperus virens* ao final dos 240 dias de experimento em solo controle (T0) e contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ..... 69

**Figura 5.** Imagens de *Cyperus virens* aos 40 dias de experimento (A), 90 dias de experimento (B) e 120 dias de experimento (C) ..... 70

**Figura 6.** Comprimento de parte aérea de *Cyperus virens* aos 30, 60, 90 e 120 dias de crescimento no Experimento II em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ..... 71

**Figura 7.** Biomassa (A) e comprimento de raiz (B) e quantidade de folhas (C) de *Cyperus virens*. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ..... 72

## Capítulo III – Efeitos da contaminação por petróleo em *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae)

**Figura 1.** Imagem aérea da área atingida por petróleo na Repar, Araucária, Paraná - Brasil. Locais amostrais do estudo: A localização da área I refere-se ao local de maior concentração de petróleo da área do acidente (área contaminada); e II área controle adjacente à área contaminada. Fonte: Google Earth. .... 85

**Figura 2.** Resultado das análises morfológicas de *T. domingensis* de área não contaminada (I) e área contaminada com petróleo (II). A. Valores de P e da razão F para a análise de comparação de médias do número de folhas por indivíduo da área não contaminada e área contaminada. B. Gráfico da média do comprimento da folha das cinco folhas maiores por indivíduo nas áreas CT (contaminada com petróleo) e NC (não contaminada). C. Valores de P e da razão F para a análise de comparação de médias do comprimento, da folha, das cinco folhas maiores de cada indivíduo das áreas de maior concentração de petróleo e de menor concentração. D. Gráfico da

média do comprimento da folha das cinco folhas maiores por indivíduo nas áreas CT (contaminada com petróleo) e NC (não contaminada).....	86
<b>Figura 3.</b> Imagens de raízes de <i>T. domingensis</i> em solo contaminado (A, C e E) e não contaminado (B, D e F) de modo comparativo, evidenciando o aerênquima formado nas raízes do local contaminado (C e E). Barras de escala: A, B, E e F 200µm; C e D 500µm. ....	88
<b>Figura 4.</b> Imagens de folhas de <i>T. domingensis</i> após teste histoquímico com cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos. A. Folha de local contaminado evidenciando a presença de compostos fenólicos na epiderme. B. Folha de local não contaminado. Barras de escala: 200µm .....	89
<b>Figura 5.</b> Resultados do teste de cromatografia gasosa para detecção de compostos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno) em folhas de <i>T. domingensis</i> . A. Sobreposição das amostras de local não contaminado (em rosa) com amostras de local contaminado (em preto). B. Resultado negativo para padrões BTEX. ....	90
<b>Figura 6.</b> Imagem da porção distal de raiz de <i>T. domingensis</i> coletada em um local com contaminação de petróleo observada com microscopia de fluorescência, evidenciando apenas a autofluorescência das paredes celulares na região do cilindro vascular, sem evidências de absorção se compostos xenobióticos. Barras de escala: A. 500µm; B. 200µm. ....	90

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo I - Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Mimosa oblonga* Benth em solo contaminado com petróleo**

**Tabela 1** Etapas de desenvolvimento de *Mimosa oblonga* em relação ao tempo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4). Considerado quando 70% dos indivíduos concluíram cada etapa do desenvolvimento até 120 dias ..... 45

**Tabela 2** Concentração inicial e final de petróleo nos tratamentos com contaminação crescente de 2 (T2) e 4% (T4), comparativamente em vasos cultivados com *Mimosa oblonga* e não .....52

### **Capítulo II - Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Cyperus virens* em solo contaminado com petróleo**

**Tabela 1.** Concentração inicial e final de petróleo nos tratamentos com contaminação crescente de 2 (T2) e 4% (T4), comparativamente em vasos cultivados com *Cyperus virens* e não cultivados .....73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	13
<b>3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO E HISTÓRICO.....	15
4.2 EFEITO DO PETRÓLEO NO AMBIENTE.....	17
4.3 EFEITO DO PETRÓLEO NAS PLANTAS .....	18
4.4 FITORREMEDIAÇÃO .....	21
4.5 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	23
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>39</b>
<b>GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE <i>MIMOSA OBLONGA</i> BENTH EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO ..</b>	<b>39</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
2.1 EXPERIMENTO I - ANÁLISE DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>M.</i> <i>OBLONGA</i> EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO. ....	41
2.2 EXPERIMENTO II - DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE INDIVÍDUOS JOVENS DE <i>M.</i> <i>OBLONGA</i> EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO. ....	42
2.3 ANÁLISE DE REDUÇÃO DE PETRÓLEO.....	43
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
3.1 EXPERIMENTO 1 - ANÁLISE DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>M.</i> <i>OBLONGA</i> EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO. ....	43
3.2 EXPERIMENTO 2 - DESENVOLVIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE INDIVÍDUOS JOVENS DE <i>M.</i> <i>OBLONGA</i> EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO. ....	49
3.3 ANÁLISE DE REDUÇÃO DE PETRÓLEO.....	51
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>63</b>
<b>GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE <i>CYPERUS VIRENS</i> MICHX EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO .....</b>	<b>63</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
2.1 EXPERIMENTO I – ANÁLISE DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>C. VIRENS</i> .....	64
2.2 EXPERIMENTO II – ANÁLISE DE DESENVOLVIMENTO DE INDIVÍDUOS JOVENS DE <i>C. VIRENS</i> .....	65
2.3 ANÁLISE DE REDUÇÃO DE PETRÓLEO DO SOLO .....	66
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	66
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
3.1 EXPERIMENTO I – ANÁLISE DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>C. VIRENS</i> .....	66
3.2 EXPERIMENTO II – ANÁLISE DE DESENVOLVIMENTO DE INDIVÍDUOS JOVENS DE <i>C. VIRENS</i> .....	69
3.3 REDUÇÃO DE PETRÓLEO DO SOLO .....	72
<b>4 DISCUSSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>81</b>
<b>EFEITOS DA POLUIÇÃO POR PETRÓLEO EM <i>TYPHA DOMINGENSIS</i> PERS. (TYPHACEAE) .....</b>	<b>81</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
2.1 ÁREA DE ESTUDO .....	83
2.2 AMOSTRAS VEGETAIS, ANÁLISE MORFOLÓGICA E ANATÔMICA .....	83
2.3 ANÁLISE DE ABSORÇÃO DE PETRÓLEO .....	84
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	84
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

É uma preocupação mundial a contaminação por petróleo decorrente dos crescentes avanços da industrialização global dos últimos anos, que ocasionam eventos de derramamentos, que geralmente ocorrem como resultado da extração, manuseio, produção, utilização e transporte de petróleo bruto (VARJANI *et al.*, 2017). A liberação desse composto petroquímico contamina extensas aéreas e ecossistemas diversos, tanto terrestre quanto aquático. E se tratando de um composto altamente tóxico para o meio ambiente, os acidentes com petróleo necessitam de uma atenção especial para controle e mitigação de impactos (BANKS *et al.*, 2005; OSSE *et al.*, 2018).

Nas plantas o do petróleo geralmente causa efeitos negativos, como baixas taxas de germinação, crescimento e rendimento, alterações morfológicas e anatômicas e até a morte (ADAM *et al.*, 2002; MERKL *et al.*, 2005; SHAHSAVARI *et al.*, 2013, XIE *et al.*, 2017). Naturalmente os efeitos variam de acordo com a composição, concentração, espécie vegetal presente, idade das plantas e tempo de exposição no local afetado (ADAM *et al.*, 2002; BAEK *et al.*, 2004; MERKL *et al.*, 2005; NAIDOO, 2010; ZENGEL *et al.*, 2015). No entanto, mesmo com tais adversidades, algumas plantas toleram a contaminação por petróleo, conseguindo se responder de maneira positiva ao estresse, e se estabelecer com sucesso na revegetação de locais contaminados por meio da dinâmica natural do ecossistema, podendo ser utilizadas em processos de remediação de contaminação.

A remediação de locais contaminados com petróleo tem sido estudada a décadas, e vem ganhando importância inclusive por conta dos altos gastos para a atenuação de contaminação, que pode chegar a bilhões de dólares em todo o mundo (KUIPER *et al.*, 2004, STROUD *et al.*, 2007; API, 2018). Ao mesmo tempo em que estudos sobre os efeitos do petróleo são realizados, há ainda esforços significativos para o desenvolvimento de tecnologias que possam recuperar os ambientes degradados (XIE *et al.*, 2018), principalmente tecnologias eficientes e mais baratas.

Fitorremediação é uma tecnologia verde, eficiente e de baixo custo de remediação biológica, na qual algumas plantas podem ser utilizadas para reduzir, remover, imobilizar ou promover a redução de diferentes tipos de contaminantes do solo e água (ANTONIADIS *et al.*, 2017). O processo de fitorremediação é diferente em cada espécie, e varia de acordo com o tipo de contaminante e a concentração da contaminação, além de depender diretamente da seleção de espécies de plantas que possam crescer e se estabelecer no meio contaminado (WANG *et al.*, 2009). No caso de compostos xenobióticos, como o petróleo, o processo de fitorremediação

pode envolver tanto a secreção de enzimas específicas que degradam o poluente, quanto a interação planta-microrganismos, onde os exsudatos radiculares ricos em nutrientes fornecem nitrogênio e carbono, estimulam toda a comunidade microbiana degradadora de hidrocarbonetos de petróleo (WELLER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013) Além disso, de uma forma de troca mútua, alguns microrganismos podem inclusive fornecer nutrientes e hormônios de crescimento, favorecendo o crescimento das plantas, e ao mesmo tempo, aumentando a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos (ALARU *et al.*, 2014; REMIGI *et al.*, 2016; JEREZ *et al.*, 2016; Saadani *et al.*, 2016)

A identificação de espécies representativas de todo ecossistema, principalmente espécies nativas, que podem ser utilizadas com sucesso em processos de fitorremediação de petróleo é um dos pontos mais importantes na atualidade, visando mitigar os impactos de contaminações, restaurando a função do ecossistema por meio de crescimento e proteção do solo (COVRE, 2020). Para identificar estas espécies, é necessário estudos e testes de fitorremediação principalmente com plantas que apresentam ocorrência natural em locais contaminados, visando compreender os mecanismos utilizados por elas, bem como se possuem um potencial de reduzir a quantidade de petróleo do solo.

No ano de 2000 na Refinaria Getúlio Vargas - PETROBRAS (Repar) no Estado do Paraná, ocorreu a ruptura de duto, onde aproximadamente 4 milhões de litros de óleo foi derramado, afetando uma área de 2,5 km<sup>2</sup>. O acidente foi considerado um dos maiores derramamentos de óleo ocorrido em água doce brasileira (SILVA, 2009). No decorrer dos anos alguns estudos foram realizados no local para analisar o comportamento natural da revegetação após o acidente, e três levantamentos de composição florística do local foram realizados (FUMPAR, 2001; BARDELLI DA SILVA, 2014; SOUSA, 2020). Como resultado há uma linha do tempo das modificações florísticas da área afetada, com espécies que cresceram e se estabeleceram de forma natural na área degradada, no entanto não se sabe ainda se essas plantas possuem potencial fitorremediador e quais os efeitos do petróleo nessas espécies.

Essas espécies que apresentam crescimento natural na área degradada da REPAR são importantes para serem investigadas, e podem acrescentar em conhecimentos a respeito dos mecanismos utilizados para sobrevivência das plantas em um ambiente contaminado. Dessa forma, neste estudo avaliamos *Cyperus virens*, *Mimosa oblonga* e *Typha domingensis* que além de serem espécies com muita abundância na área degradada da REPAR, são espécies nativas, e além de avaliá-las em diferentes níveis de petróleo, analisamos ainda se possuem potencial de reduzir o grau de contaminação do solo, contribuindo para o equilíbrio do ambiente.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as espécies *Cyperus virens*, *Mimosa oblonga* e *Typha dominguensis* diante da contaminação por petróleo, além de avaliar o potencial dessas espécies em reduzir a quantidade de petróleo do solo.

### 2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a. Avaliar a germinação, crescimento inicial e sobrevivência de *M. oblonga* e *C. virens* em concentrações crescentes de petróleo.
- b. Avaliar crescimento e desenvolvimento de indivíduos jovens de *C. virens* e *M. oblonga* em concentrações crescentes de petróleo.
- c. Analisar a redução da quantidade de petróleo do solo após o cultivo de *C. virens* e *M. oblonga*.
- d. Avaliar as alterações anatômicas e morfológicas de *T. dominguensis* no ambiente contaminado com petróleo.
- e. Avaliar se *T. dominguensis* é capaz de absorver BTEX do solo.

### 3 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação é composta por três capítulos:

O capítulo I “Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Mimosa oblonga* Benth em solo contaminado com petróleo” trata-se da avaliação de *M. oblonga* desde seu desenvolvimento inicial a partir da germinação, até a avaliação de indivíduos jovens em substrato contaminado com 2% e 4% de petróleo, em experimentos distintos, além da análise de degradação de hidrocarbonetos totais do solo em ambos os experimentos utilizando cromatografia gasosa.

No capítulo II “Germinação, desenvolvimento e potencial de fitorremediação de *Cyperus virens* Michx em solo contaminado com petróleo” utilizamos a mesma abordagem do primeiro capítulo, mas neste segundo capítulo avaliamos a espécie *C. virens*.

No capítulo III “Efeitos da poluição por petróleo em folhas e raízes de *Typha domingensis* Pers. (TYPHACEAE)” é apresentado um estudo realizado na área de acidente da Repar, onde foi avaliada a espécie *T. dominguensis* do local de maior concentração de petróleo comparada à indivíduos de um ambiente controle adjacente. Avaliamos aspectos morfológicos, anatômicos, histológicos e capacidade de absorção de petróleo utilizando método de cromatografia para determinação de ausência ou presença de hidrocarbonetos BTEX nas folhas e análise de fluorescência para detecção de compostos xenobióticos nas raízes. O capítulo foi submetido à revista Acta Botanica Brasilica (ISSN1677-941X).

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO E HISTÓRICO

A área de estudo está localizada na extensão da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), na região metropolitana de Curitiba no município de Araucária, PR, nas coordenadas 25°34'02,5'' S e 49°20'53,5'' W, em uma altitude média de 920 m.

Em 16 de julho de 2000, ocorreu a ruptura do oleoduto Ospar, localizado em uma área adjacente da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR). Esta ruptura causou um dos maiores acidentes ecológicos do Brasil, onde houve o derramamento de cerca de 4 milhões de litros de petróleo cru (FUNPAR, 2013). O óleo escoou do ponto da ruptura e passou pela encosta do córrego Arroio Saldanha afetando diretamente a bacia do Rio Barigui, o principal afluente do Rio Iguaçu, percorrendo cerca de 40km a jusante. No Ponto Zero, o petróleo contaminou terrenos com diferentes características geológicas de diversas formas: (a) totalmente livre, no caso das encostas, (b) completamente canalizado pelo arroio Saldanha, (c) afetado por represamentos que criaram verdadeiras piscinas, e (d) extravasando o canal deste arroio e contaminando os banhados ao longo do mesmo (MELO *et al.*, 2006).

Os maiores impactos foram vistos próximo aos 2,25 km de extensão do córrego Arroio Saldanha, onde o óleo foi inicialmente drenado desde uma nascente até sua foz, na margem direita do Rio Barigui. Solo, água e comunidades bióticas foram intensamente contaminados. Dos 4 milhões de litros de óleo derramados, cerca de 800 mil litros evaporaram, 2,2 milhões de litros ficaram na área interna da refinaria e 1 milhão de litros foram para os rios Barigui e Iguaçu. Do total derramado foram recuperados aproximadamente 2,85 milhões de litros. Já, os litros restantes, que não foi possível recolher, percolaram pela drenagem dos terrenos adjacentes e o maior volume deste ficou retido ao longo do arroio Saldanha, principalmente na várzea formada junto ao rio Barigui (FUNPAR, 2013).

Cerca de 2.000 pessoas foram mobilizadas para conter a poluição na época e diferentes técnicas foram aplicadas para avaliação e remediação ao longo dos anos. As comunidades vegetacionais foram impactadas de diversas maneiras, tanto pela contaminação direta do óleo, quando pelas ações de controle e remoção do poluente, onde foi utilizado maquinário para contenção. Foram ainda instaladas manilhas para inundação controlada do banhado, como forma de remediação, e todos esses sucessíveis acontecimentos pós poluição transformou o Ponto Zero um campo experimental, pois mesmo após 19 anos do derramamento, em um último levantamento realizado, foi verificado que o óleo ainda persiste de forma heterogênea no solo da várzea da REPAR (SOUSA, 2020).

No decorrer dos anos foram realizados alguns estudos, e destacamos aqui os levantamentos florísticos da área afetada após o acidente, e as coletas para determinação de concentração de petróleo no decorrer dos anos.

O primeiro levantamento florístico na área de várzea da Repar foi em 2001, um ano após o acidente, realizado pela FUNPAR. Mesmo muito recente após o acidente, foi registrado um total de 30 espécies, 18 gêneros e 10 famílias, sendo as mais abundantes Cyperaceae (10 spp.), Asteraceae e Poaceae (5 spp. cada) (FUNPAR, 2001). As espécies mais abundantes foram *Heteranthera reniformis* Ruiz & Pav (28,65%) *Cyperus virens* Michx (8,66%), *Cyperus lanceolatus* Poir. (7,77%), *Cyperus hermaphroditus* (Jacq.) Standl. (7,74%) e *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britton (7,68%), totalizando juntas 60,5% do total.

Em 2012 um outro estudo foi realizado por Bardelli-da-Silva (2014), que registou 46 espécies pertencentes a 37 gêneros e 25 famílias, destacando como de maior riqueza Asteraceae (11 spp.), Cyperaceae (4 spp.), Poaceae e Polygonaceae (3 spp. cada). As espécies mais abundantes foram *Typha domingensis* Pers. (17,68%), *Hymenachne pernambucensis* (Spreng.) Zuloaga (12,28%), *Mimosa oblonga* Benth. var. *oblonga* (11,25%), *Mikania micrantha* Kunth (8,36%) e *Schoenoplectus californicus* (C. A. Mey.) Soják (5,58%), totalizando 55,15% da cobertura.

Em 2019, o estudo mais recente, realizado por Souza (2020), foi registrado 42 espécies, reunidas em 33 gêneros e 23 famílias, dentre as quais apresentaram maior riqueza Asteraceae (7 spp.), Onagraceae e Rubiaceae (4 spp. cada), Poaceae, Polygonaceae e Solanaceae (3 spp. cada). As espécies mais abundantes foram *Typha domingensis* Pers. (16,26%), *Mimosa oblonga* Benth. var. *oblonga* (13,16%), *Hymenachne pernambucensis* (Spreng.) Zuloaga (11,41%), *Mikania micrantha* Kunth (9,11%) e *Neocabreria serrulata* (DC.) R. M. King & H. Rob. (9,04%), totalizando 58,98%.

As únicas espécies registradas nos três levantamentos foram *Hymenachne pernambucensis* (Spreng.) Zuloaga, *Ludwigia elegans* (Cambess.) H. Hara, *Ludwigia sericea* (Cambess) H. Hara, *Polygonum persicaria* L., e *Typha domingensis* Pers.

As modificações florísticas mais evidentes no passar dos anos foi o aumento de riqueza geral e a redução da abundância da família *Cyperaceae*, sendo elas as mais frequentes na área no primeiro levantamento realizado em 2001.

A determinação de concentração de petróleo mais próxima da data do acidente foi do ano de 2003 e 2004 em campanhas realizadas por Melo (2006). Os resultados da concentração de petróleo tiveram variações entre 511,70 e 151.039,00 mg/kg de solo.

Em 2012 e em 2019 os estudos apontaram uma queda considerável na concentração de petróleo da área contaminada, com variações entre 183,84 e 6.444,62 mg/kg de solo.

Importante ressaltar que a legislação brasileira não tem valores de risco definidos para o petróleo, não sendo possível avaliar o risco de acordo com a concentração tampouco valores de intervenção, no entanto, de acordo com o órgão de proteção ambiental do estado de São Paulo (CETESB), os valores de intervenção em áreas contaminadas com hidrocarbonetos totais de petróleo no solo são de 1.000 mg/kg, valor este determinado pelos riscos potenciais diretos ou indiretos à saúde humana.

#### 4.2 EFEITO DO PETRÓLEO NO AMBIENTE

As atividades antrópicas e os agentes relacionados a elas, levam à contaminação de extensas áreas e do meio ambiente em todo o mundo, e é hoje um dos principais problemas enfrentados pela sociedade. Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) é um desses agentes antropogênicos que contaminam os ecossistemas aquáticos e terrestres durante seu uso, produção, uso operacional e transporte (MUKHERJEE *et al.*, 2017) causando consequências desastrosas a animais, humanos, plantas e microorganismos.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos de origem porfirinas metálicas, ácidos e compostos organometálicos, sendo os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) considerado o mais toxico de derramamentos de óleo, sendo o principal contribuinte de mutagenicidade e teratogenicidade em humanos (VAN HAMME *et al.*, 2003; HARITASH *et al.*, 2009). A contaminação por petróleo é considerada de grande risco não apenas aos seres humanos, mas para animais e todo o meio ambiente (Cocârță *et al.*, 2017)

Na água, a presença de contaminação por HTP pode influenciar pH, temperatura, oxigênio dissolvido, sólidos totais e turbidez, além do acúmulo de xenobioticos (OGOKO, 2016; ALI, 2019). Teores baixos de oxigênio dissolvido bloqueia a superfície aquática e a degradação microbiana, induzindo assim a eutrofização (BOROWIK *et al.*, 2019)

No solo o petróleo altera as propriedades químicas, incluindo a condutividade, teores de matéria orgânica, aumento da quantidade de carbono orgânico, diminuição do pH, aumento de ácidos orgânicos, enquanto os teores intercambiáveis de Fe e Mg aumentam, assim como a disponibilidade de fósforo (NG *et al.*, 2014). Na superfície forma uma camada impermeável que impede a circulação livre da água e as trocas gasosas entre solo e ar. Além de sufocar plantas, o solo se torna anaeróbico para atividades metabólicas e o número de bactérias tendem a diminuir (STRECHE, 2014). Além disso, os HPAs acabam sendo absorvidos pela matéria

orgânica do solo, causando toxicidade aos microrganismos e plantas, afetando o ciclo de nutrientes do solo e causando um desequilíbrio dos microrganismos das funções do ecossistema (CHEN, 2018; WEI *et al.*, 2020). Então, a ação deste contaminante não só altera toda a estrutura e composição de flora e fauna, mas afeta todas as funções ecológicas do solo como um todo.

Os riscos ecológicos derivados deste contaminante é pauta de preocupação mundial. Os HTPs têm forte toxicidade carcinogênica e teratogênica, e 16 deles são classificados como poluentes prioritários de controle propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).

Alguns mecanismos de remediação podem ser utilizados para remoção do petróleo, como lixiviação, evaporação e degradação por microrganismos nativos do solo, no entanto a eficiência desses mecanismos está diretamente ligada à concentração e composição do petróleo (BRASSINGTON *et al.*, 2007). No entanto, os diferentes métodos não apresentam resultados consistentes quando a área possui grande profundidade e um solo argiloso (STRECHE *et al.*, 2014). O desenvolvimento de tecnologias eficazes e estratégias de restauração para superar essa poluição antropogênica são, portanto, de grande importância, mas permanecem desafiadores.

#### 4.3 EFEITO DO PETRÓLEO NAS PLANTAS

Em algumas espécies, o efeito do petróleo vai desde a redução da germinação, da taxa de crescimento e até a morte. O grau de efeito varia com a composição, espécie e concentração do contaminante (ZAVALA-CRUZ *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2008; SHAHSAVARI *et al.*, 2013).

Para algumas sementes que germinam em um ambiente contaminado com petróleo, além da redução da germinação, outros sintomas são comumente visualizados na etapa de germinação, como estresse oxidativo, transferência de contaminação para o embrião, inibição de alongamento da raiz, indisponibilidade nutricional, redução de fotossíntese e respiração, estômatos reduzidos, inibição de formação de folhas, lesões e deformações (UDO *et al.*, 1975; ADAM *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2013; KAUR *et al.*, 2017). Esses efeitos ocorrem por conta do estresse ambiental causado pelo petróleo, que leva a falta de oxigênio, restrições hídricas nutricionais e energéticas. (DIMITROW *et al.*, 2000)

Os compostos hidromórficos presentes no petróleo criam um ambiente hidrofóbico, com uma alta capacidade de limitação da absorção de água pelas plantas, enquanto os componentes de baixo peso molecular pode acabar penetrando nas células resultando em colapso celular.

(SHAHSAVARI *et al.*, 2013). A limitação hídrica por si só já seria suficiente para causar a morte de plantas, porém é apenas um dos diferentes estresses causados por este contaminante.

O desenvolvimento das plantas pode ser afetado ainda pelas alterações nas propriedades físicas do solo (compactação e redução da retenção de água), nas propriedades químicas do solo (alterações de pH, salinidade e fertilidade) e nas alterações biológicas (toxicidade aos organismos do solo).

A contaminação por petróleo pode gerar ainda inúmeras alterações fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e anatômicas nas plantas. Dentre as alterações podemos destacar a diminuição de biomassa e clorofila, peroxidação lipídica gerada por espécies reativas de oxigênio, danos a membrana e quebra de proteínas (KIM *et al.*, 2004 ; WANG *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2013; HAGHOLLAHI *et al.*, 2016). Muitos desses aspectos podem ser utilizados para avaliar a tolerância e sensibilidade de plantas ao estresse.

Em nível morfológico, é muito comum encontrar em outros estudos a alteração no comprimento da planta, espessura de caule, quantidade de folhas, necroses e volume de parte aérea e de raiz, causados principalmente pela diminuição de disponibilidade de água e nutrientes (GOGOSZ *et al.*, 2010; PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2018a; DA SILVA E MARANHO, 2021). Já na anatomia, as alterações vão desde caule, folha até raízes, causando alterações no tamanho e quantidade de células, compactação e desestruturação celular (BONA *et al.*, 2011) e de modo geral, há muitos estudos que trazem os efeitos nocivos do petróleo em várias espécies (Quadro 1)

**Quadro 1.** Estudos recentes sobre alguns efeitos causados pela contaminação por petróleo nas plantas.

<b>Espécie</b>	<b>Concentração de HTP</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referência</b>
<i>Cedrela odorata</i> , <i>Haematoxylum campechianum</i> , <i>Swietenia macrophylla</i> e <i>Tabebuia rosea</i>	18.940, 44.000 e 57.000 mg kg <sup>-1</sup> )	O petróleo estimulou e aumentou a taxa de germinação de <i>S. macrophylla</i> e <i>C. odorata</i> , acelerou a germinação de <i>T. rosea</i> e não afetou a germinação de <i>H. campechianum</i> . Altura e biomassa reduziram em todas as espécies na presença do petróleo. <i>C. odorata</i> e <i>T. rósea</i> apresentaram alta mortalidade diante da contaminação pelo petróleo.	Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Adams Schroeder, R.H. <i>et al.</i> (2013).

<i>Amorpha fruticosa</i>	0 g kg <sup>-1</sup> (como controle), 5, 10, 15 e 20 g kg <sup>-1</sup>	Diminuição das taxas fotossintéticas, a condutância estomática e a taxa de transpiração. Declínio dos teores de clorofila a clorofila b e clorofila total.	Han, G., Cui, B.X., Zhang, X.X. <i>et al.</i> (2016).
<i>Mirabilis jalapa</i>	(2%, p / p ) por 24 h	Alteração da oxidação e desintoxicação, organização da parede celular, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, transporte e processo de proteína alterações do metabolismo que resultar na produção e secreção de carboidratos de baixo peso molecular, aminoácidos e proteínas funcionais.	Chen, S., Ma, H., Guo, Z. <i>et al.</i> (2017).
<i>Cedrela odorata</i> , <i>Haematoxylum</i> , <i>campechianum</i> , <i>Swietenia macrophylla</i> e <i>Tabebuia rosea</i>	18.000 mg, 31.700 mg e 47.100 mg kg <sup>-1</sup> )	Diminuição de altura e biomassa, degradação de 32,5% de petróleo <i>pela H. campechianum</i> , alta taxa de sobrevivência e vigor.	Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Adams, R.H. <i>et al.</i> (2017)
<i>Medicago sativa</i> e <i>Setaria uiridis</i>	Cinco níveis entre 0 e 2,0% ( p / p )	Redução de biomassas vegetais total, aérea e subterrânea. Promoção na emergência de <i>Setaria uiridis</i> .	Xie, W., Zhang, Y., Li, R. <i>et al.</i> (2017)
<i>Medicago sativa</i> e grama cerda	1,0%	Consórcio entre as duas espécies melhorou a degradação de petróleo, crescimento dos indivíduos e comunidade microbiana.	XIE, Wenjun <i>et al.</i> (2018).
Serapilheira de <i>Bothriochloa ischaemum</i>	4,5%	A contaminação por petróleo inibiu significativamente a decomposição geral e a liberação de nutrientes.	Zhang, X., Liu, Z. (2019).
<i>Vigna radiata</i>	5 g kg <sup>-1</sup>	Minimizou significativamente o comprimento da raiz e da parte aérea da planta em além de minimizar a atividade fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e conteúdo de clorofila.	Ali <i>et al.</i> (2020).
<i>Laguncularia racemosa</i>	10 g kg <sup>-1</sup>	Reduziu a biomassa vegetal em 83,6% induziu o estresse oxidativo.	Moradi <i>et al.</i> (2020).
<i>Sorghum bicolor</i> e <i>Sinapis alba</i>	15 g kg <sup>-1</sup>	Diminuição da taxa de germinação, do comprimento da raiz e a altura da parte aérea da planta.	Hawrot-Paw <i>et al.</i> (2020).
<i>Oryza sativa</i> , <i>Sorghum</i> , <i>Tagetes</i> , e	10 g kg <sup>-1</sup>	Reduziu a biomassa seca de todas as espécies.	Ruley <i>et al.</i> (2020).

---

*Hyparrhenia rufa*

---

<i>Rhizophora mangle</i> L	10540,33 mg/g- 1	Deformações nas folhas e aparecimento de novos brotos tanto nos experimentos	VERÂNE <i>et al.</i> , (2020).
<i>Medicago, festuca</i> e <i>Lolium multiflorum</i>	0,0 a 2,0 g kg <sup>-1</sup>	Inibição do crescimento, biomassa, clorofila, e propriedades químicas do solo. Aumento de enzimas antioxidantes.	YUAN, Longmiao <i>et al.</i> (2023)

---

\*HTP: Hidrocarbonetos totais de petróleo.

Por fim, um ambiente contaminado por petróleo torna-se inóspito para o crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de plantas, tanto pela redução de nutrientes quanto pelo comprometimento da capacidade das plantas em absorver nutrientes essenciais para a sua sobrevivência. Os efeitos podem ser fitotóxicos diretos em contato com a planta ou indiretos através do solo, e enquanto alguns efeitos são imediatos, outros são cumulativos e demoram mais para aparecer, permitindo que algumas espécies inclusive, desenvolvam alguns mecanismos de adaptação à contaminação (ANOLIEFO *et al.*, 2003; DA SILVA CORREA *et al.*, 2022).

#### 4.4 FITORREMEDIAÇÃO

Fitorremediação é uma tecnologia sustentável, eficaz e de baixo custo onde é utilizada plantas tolerantes na descontaminação de ambientes poluídos. É uma tecnologia que utiliza os processos naturais das plantas e sua flora microbiana para sequestrar poluentes orgânicos e inorgânicos em qualquer tipo de substrato, sendo um processo promissor e amplamente estudado.

Os gastos para descontaminação ambiental chegam nos bilhões de dólares, e como os processos naturais e biológicos são basicamente, alimentados por energia solar, a fitorremediação passa a ser mais barata comparada a outros processos que utilizem maquinários, engenharia e outros tipos de tratamento. (GLASS, 1999; TSAO, 2003; API, 2018).

A fitorremediação por si só se trata então, da utilização de plantas para descontaminar um ambiente, e a partir deste termo, há algumas técnicas específicas dependendo da estratégia e capacidade das plantas utilizadas (Quadro 2).

**Tabela 2.** Técnicas de fitorremediação

<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>
<i>Fitofiltração</i>	Absorção de poluentes pelas raízes em água contaminada
<i>Fitoextração</i>	Acúmulo de poluentes na biomassa vegetal
<i>Fitostabilização</i>	Limitando a mobilidade e biodisponibilidade de poluentes no solo pelas raízes das plantas
<i>Fitodegradação</i>	Degradação do poluente por enzimas vegetais dentro de tecidos vegetais
<i>Fitovolatilização</i>	Conversão de poluentes para a forma volátil e sua posterior liberação para a atmosfera
<i>Rizodegradação</i>	Degradação de poluentes na rizosfera por microrganismos
<i>Fitodesalinização</i>	Remoção do excesso de sais de solos salinos por halófitas

A fitorremediação de compostos orgânicos pode incluir vias de degradação, absorção, acúmulo e promoção do aumento de atividades na região da rizosfera (NEWMAN *et al.*, 2004). Esse aumento da atividade na rizosfera é promovido pelas plantas, e leva ao aumento de reservatório de carbono orgânico no solo, melhorando assim a atividade metabólica dos microrganismos e promovendo na região da rizosfera a degradação de compostos como o petróleo, processo este conhecido como rizodegradação.

A absorção de HTP pelas plantas representa uma fração muito baixa ou até inexistente (FISMES *et al.*, 2004). A degradação parte da diversidade microbiana do solo, que permite múltiplas vias de degradação, onde os diversos tipos de contaminantes são utilizados como fonte de carbono (CHAÎNEAU *et al.*, 1995), e essa degradação leva à atenuação do poluente ou o transforma em um intermediário na formação de outros metabolitos (HARITASH e KAUSHIK *et al.*, 2009), ou seja, a redução de HTP do solo depende diretamente da relação entre microrganismos e plantas.

Naturalmente, os processos que ocorrem no interior e na região da rizosfera de uma planta variam de acordo com a espécie e o tipo de poluente. Normalmente espécies nativas são as mais utilizadas, pois demonstram já uma capacidade natural às condições ambientais por estarem já bem adaptadas e aclimatadas, e reforçando a não propagação de espécies exóticas. Além disso, outros requisitos também são importantes, como: grande biomassa, sementes com boa capacidade de germinação, resiliência a ambientes pobres, crescimento rápido e raízes profundas (PENG *et al.*, 2009).

Muitas são as pesquisas que demonstram a eficiência e os efeitos positivos na utilização de plantas como ferramenta de remediação de petróleo, como com azevém perene, alfafa,

*Mirabilis jalapa*, trigo, milho e Capim cerdas (PENG *et al.*, 2009 ; SHAHSAVARI, 2013; JONES *et al.*, 2004 ; PHILLIPS *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2017). Além de imobilizar, conter ou degradar o poluente, a remediação promove ainda os processos naturais de crescimento de microorganismos, melhorando a qualidade do solo como um todo e favorecendo o estabelecimento de outras plantas (FRICK *et al.*, 1999 ; LÓPEZ *et al.*, 2004).

#### 4.5 ESPÉCIES ESTUDADAS

*M. oblonga* é endêmica do Brasil, encontrada no Sudeste e Sul. Cresce em mata ciliar e ambientes úmidos (JORDÃO *et al.*, 2018). Apesar de não haver estudos sobre esta espécie na utilização de descontaminação de solo, faz parte do grupo das leguminosas, caracterizadas pela forte associação simbiótica com microorganismos fixadores de nitrogênio, proporcionando melhor fertilidade do solo e redução de erosão. Além disso há também associação com fungos e micorrizas, aumentando a superfície de absorção, favorecendo um rápido crescimento (FRANCO *et al.*, 1992; ADAM *et al.*, 2002), o que as torna adequadas para revegetação de áreas contaminadas com petróleo, visto que ainda apresentam forte resiliência a diferentes biomas (URQUIAGA *et al.*, 2000).

*C. virens* é endêmica do Brasil e é uma espécie que faz parte da família Cyperaceae, que no geral, são frequentemente submetidas a estresse eco fisiológicos por estarem em pântanos (NAWAZ *et al.*, 2014).

As gramíneas no geral possuem uma morfologia radicial que as tornam adequadas a processos de fitorremediação, como maior zona de rizosfera e sistemas radicial ramificados, além disso, demonstram rápido crescimento e não necessitam de manutenções a longo prazo no ambiente de estresse (MERKL *et al.*, 2005 ). Muitas espécies de *Cyperus* já tem sido estudada em locais contaminados e tem se mostrado efetivas candidatas para remediação de petróleo (BASUMATARY *et al.*, 2012; BASUMATARY *et al.*, 2013; YAVARI, 2015; HUSSAIN *et al.*, 2018b), e já tem sido inclusive cultivada em áreas contaminadas, demonstrando uma potente remoção de hidrocarbonetos de petróleo, e boa capacidade de sobrevivência mesmo em áreas fortemente poluídas (BASUMATARY *et al.*, 2012; BARUAH *et al.*, 2014; CHAKRAVARTY *et al.* 2021).

Algumas espécies de *Cyperus* também são importantes para remediação de zonas úmidas contaminadas com metais pesados, como por exemplo, *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus articulatus* e *Cyperus malaccensis*, que já foram utilizadas (GALAL *et al.*, 2017; GALAL *et al.*, 2021; GAO, 2021).

*T. dominguensis* popularmente conhecida como Taboa, é uma espécie cosmopolita, nativa da América do Sul e faz parte da família Typhaceae. É perene, herbácea, rizomatosa, vive em ambientes alagados e pode atingir até 3m de altura.

O gênero *Typha* possui distribuição global com crescimento em uma variedade de habitats aquáticos em todos os continentes (SMITH, 1987), sendo frequentemente dominante na área de ocupação, seu crescimento acelerado forma grupos muito grandes e persistentes, gerando inclusive problemas econômicos e ecológicos por se tornar uma erva daninha. (MORTON, 1975; FINLAYSON *et al.*, 1983; GRACE *et al.*, 1986; THIERET *et al.*, 1996; AUDU *et al.*, 2012). Apesar disso, as *Typhas* fornecem uma variedade de serviços ecossistêmicos, como ciclagem de nutrientes, melhoria da qualidade da água e da biodiversidade, e até mesmo como sumidouro de nutrientes através da absorção, podendo reduzir a eutrofização (GE *et al.*, 2017 ;VROOM *et al.*, 2018 ).

Espécies de *Typha* são amplamente utilizadas em avaliações de fitotoxicidade de diversos poluentes por ser uma planta de fácil cultivo e podem ser inclusive utilizadas como espécies de teste padrão para avaliação de riscos ecológicos de contaminantes (SESIN *et al.*, 2021). O crescimento vigoroso dessas espécies, mesmo em locais contaminados, as tornam particularmente adequadas para fitorremediar áreas degradadas (MARECIK *et al.*, 2012 ; RODRIGUEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2017 ).

Espécies de *Typha* já tem sido estudadas quanto ao potencial de remediação de ambientes perturbados com os mais diversos contaminantes, principalmente *T. domingensis*, *T. latifolia* e *T. angustifolia*.

*T. latifolia* já foi estudada para remediação de metais pesados (BONANNO, 2010; SALEM *et al.*, 2014; MORARI *et al.*, 2015; KLINK, 2017; HEJNA *et al.*, 2020; ABBAS *et al.*, 2021; HAGHNAZAR, *et al.*, 2023), *T. angustifolia* tem o potencial de acumular Cu, Zn e Ni ao máximo do ambiente em todas as condições testadas por Chandra *et al.* (2010), e *T. domingensis* apresenta alta capacidade de fitorremediação de mercúrio (GOMES *et al.*, 2014).

*T. angustifolia* e *T. domingensis* são espécies parafiléticas (ZHOU *et al.*, 2018) e um estudo comparativo entre essas espécies aponta as características compartilhadas por elas, como alta tolerância a condições tóxicas, grande produção de biomassa e crescimento rápido, fazem de *Typhas* em geral ótimas opções para remediação e recuperação de ambientes degradados (BONANNO *et al.*, 2017).

## 5 REFERÊNCIAS

ABBAS, Naeem *et al.* Phytoremediation potential of *Typha latifolia* and water hyacinth for removal of heavy metals from industrial wastewater. **Chemistry International**, v. 7, n. 2, p. 103-111, 2021.

ACCIOLY, Pyramon. Mapeamento dos remanescentes vegetais arbóreos do estado do Paraná e elaboração de um sistema de informações geográficas para fins de análise ambiental do estado. 2013.

ADAM, Gillian; DUNCAN, Harry. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental pollution**, v. 120, n. 2, p. 363-370, 2002.

ADAMS, Randy H.; ZAVALA-CRUZ, Joel; MORALES-GARCÍA, Fernando. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. **Interciencia**, v. 33, n. 7, p. 483-489, 2008.

ALARU, Maarika *et al.* Crop yields and supply of nitrogen compared in conventional and organic farming systems. **Agricultural and food science**, v. 23, n. 4, p. 317-326, 2014.

LÓPEZ, Roberto Aurelio Núñez *et al.* Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. **Revista Ciencia**, p. 69-83, 2004.

ALI, Ali S.; AL-KHAFAJI, Basim Y.; AL-GEZI, Haider R. Comparative study of hydrocarbon pollution before and after rainfall in Al-Gharraf River in Thi-Qar province–Iraq. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, p. 012029. 2019.

ALI, Muhammad Hayder *et al.* Enhanced growth of mungbean and remediation of petroleum hydrocarbons by *Enterobacter* sp. MN17 and biochar addition in diesel contaminated soil. **Applied Sciences**, v. 10, n. 23, p. 8548, 2020.

ANOLIEFO, G. O.; VWIOKO, D. E.; MPAMAH, P. Regeneration of *Chromolaena odorata* (L.) K. & R. in crude oil polluted soil: A possible phytoremediating agent. **Benin Science Digest**, v. 1, p. 9-14, 2003.

ANTONIADIS, Vasileios *et al.* Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. **Earth-Science Reviews**, v. 171, p. 621-645, 2017.

API. Environmental Expenditures by the U.S. Oil and Natural Gas Industry, 12th ed., American Petroleum Institute, Washington, DC. p.27, 2018.

ARTHUR, Ellen L. *et al.* Phytoremediation—an overview. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 2, p. 109-122, 2005.

AUDU, Idi G. *et al.* Ethanol organosolv pretreatment of *Typha capensis* for bioethanol production and co-products. **BioResources**, v. 7, n. 4, 2012.

BAEK, Kyung-Hwa *et al.* Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 39, n. 9, p. 2465-2472, 2004.

BANKS, Margaret Katherine; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 167, p. 211-219, 2005.

BARDELLI-DA-SILVA, M. Y. Florística e estrutura de uma formação pioneira com influência flúvio-lacustre 12 anos após derramamento de óleo, Araucária, Paraná. 2014. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BARUAH, Plabita *et al.* Effect of crude oil contamination on the chlorophyll content and morpho-anatomy of *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 12530-12538, 2014.

BASUMATARY, Budhadev *et al.* Field note: phytoremediation of petroleum sludge contaminated field using sedge species, *Cyperus rotundus* (Linn.) and *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **International journal of phytoremediation**, v. 15, n. 9, p. 877-888, 2013.

BASUMATARY, Budhadev; BORDOLOI, Sabitry; SARMA, Hari Prasad. Crude oil-contaminated soil phytoremediation by using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 3373-3383, 2012.

BONA, Cleusa *et al.* Effect of diesel contaminated soil on root and leaf of *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) and *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 277-285, 2011.

BONANNO, G.; GIUDICE, R. Lo. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. **Ecological indicators**, v. 10, n. 3, p. 639-645, 2010.

BONANNO, Giuseppe; CIRELLI, Giuseppe Luigi. Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 92-101, 2017.

BOROWIK, Agata *et al.* Implications of soil pollution with diesel oil and BP petroleum with active technology for soil health. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 14, p. 2474, 2019.

BRASSINGTON, Kirsty J. *et al.* Weathered hydrocarbon wastes: a risk management primer. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 199-232, 2007.

CHAINEAU, Claude-Henri; MOREL, Jean-Louis; OUDOT, Jean. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. **Environmental science & technology**, v. 29, n. 6, p. 1615-1621, 1995.

CHAKRAVARTY, Paramita; DEKA, Hemen. Enzymatic defense of *Cyperus brevifolius* in hydrocarbons stress environment and changes in soil properties. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

CHANDRA, Ram; YADAV, Sangeeta. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1277-1284, 2010.

CHEN, Lisha *et al.* Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. **Plant and soil**, v. 368, p. 355-363, 2013.

CHEN, Shuisen *et al.* Quantitative proteomics analysis reveals the tolerance of *Mirabilis jalapa* L. to petroleum contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 7375-7382, 2017.

CHEN, Yanan *et al.* Contamination and health risk assessment of PAHs in farmland soils of the Yinma River Basin, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 383-390, 2018.

COCĂRȚĂ, D. M. *et al.* Removal of Total Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soils by Electrochemical Method. **International Journal of Environmental and Ecological Engineering**, v. 11, n. 5, p. 479-483, 2017.

COVRE, Watilla Pereira *et al.* Phytoremediation potential of *Khaya ivorensis* and *Cedrela fissilis* in copper contaminated soil. **Journal of Environmental Management**, v. 268, p. 110733, 2020.

DA SILVA CORREA, Hauane; MARANHO, Leila Teresinha. The potential association of *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. with bacterial consortium for petroleum degradation in contaminated soil. **SN Applied Sciences**, v. 3, p. 1-12, 2021.

DIMITROW, D. N.; MARKOW, E. Behaviour of available forms of NPK in soils polluted by oil products. Poczwoznanie. **Agrochimija I Ekologia**, v. 35, n. 3, p. 3-8, 2000.

DUSHENKOV, SLAVIK. Phytofiltration of metals. **Phytoremediation of toxic metals-using plants to clean up the environment**, 2000.

FINLAYSON, C. M. *et al.* The biology of Australian weeds. II. *Typha domingensis* Pers. and *Typha orientalis* Presl. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v. 49, n. 1, p. 3-10, 1983.

FISMES, Joëlle *et al.* Risk of contamination for edible vegetables growing on soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 24, n. 4-5, p. 827-836, 2004.

FRANCO, Avílio A. *et al.* **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992.

FRICK, C. M.; GERMIDA, J. J.; FARRELL, R. E. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. In: **technical seminar on chemical spills**. Environment Canada; 1998, 1999. p. 105a-124a.

FUNPAR. Fundação Universidade federal do Paraná. Ciência, da tecnologia e da cultura. Diagnóstico e monitoramento da cobertura vegetal da área de influência direta e indireta do vazamento de óleo da Refinaria Presidente Getúlio Vargas - REPAR, Araucária, PR: Fase I - Diagnóstico. FUNPAR, Curitiba, 2001, 82 p.

GALAL, Tarek M. *et al.* Metal uptake capability of *Cyperus articulatus* L. and its role in mitigating heavy metals from contaminated wetlands. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21636-21648, 2017.

GALAL, Tarek M. *et al.* The role of *Cyperus alopecuroides* Rottb. sedge in monitoring water pollution in contaminated wetlands in Egypt: a phytoremediation approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 23005-23016, 2021.

GAO, Pin *et al.* Structure and variation of root-associated bacterial communities of *Cyperus rotundus* L. in the contaminated soils around Pb/Zn mine sites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 58523-58535, 2021.

GE, Zhiwei *et al.* *Phragmites australis*+ *Typha latifolia* community enhanced the enrichment of nitrogen and phosphorus in the soil of Qin Lake Wetland. **Scientifica**, v. 2017, 2017.

GLASS, David J. Current market trends in phytoremediation. **international Journal of Phytoremediation**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 1999.

GOGOSZ, A. M. *et al.* Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.(Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 977-986, 2010.

GOMES, Marcos Vinícius Teles *et al.* Phytoremediation of water contaminated with mercury using *Typha domingensis* in constructed wetland. **Chemosphere**, v. 103, p. 228-233, 2014.

GRACE, James B.; HARRISON, Janet S. The biology of Canadian weeds.: 73. *Typha latifolia* L., *Typha angustifolia* L. and *Typha xglauca* Godr. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 66, n. 2, p. 361-379, 1986.

HAGHNAZAR, Hamed *et al.* Phytoremediation capability of *Typha latifolia* L. to uptake sediment toxic elements in the largest coastal wetland of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 188, p. 114699, 2023.

HAGHOLLAHI, Ali; FAZAELIPOOR, Mohammad Hassan; SCHAFFIE, Mahin. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. **Journal of environmental management**, v. 180, p. 197-201, 2016.

HAN, G. *et al.* The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, p. 2383-2392, 2016.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, 2009.

HAWROT-PAW, Małgorzata *et al.* Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16436, 2020.

HEJNA, Monika *et al.* Bioaccumulation of heavy metals from wastewater through a *Typha latifolia* and *Thelypteris palustris* phytoremediation system. **Chemosphere**, v. 241, p. 125018, 2020.

HUSSAIN, Fida *et al.* Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v. 153, p. 80-88, 2018a.

HUSSAIN, Imran *et al.* Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: improvement opportunities and field applications. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 202-219, 2018b.

JEREZ CH, Jose A.; ROMERO, Rosaura M. Evaluation of *Cajanus cajan* (pigeon pea) for phytoremediation of landfill leachate containing chromium and lead. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 11, p. 1122-1127, 2016.

JONES, Ryan K. *et al.* Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils II. Microbial response to plant roots and contaminant. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 11, p. 340-346, 2004.

JORDÃO, Lucas SB; MORIM, Marli P.; BAUMGRATZ, José Fernando A. Toward a census of Mimosa (Leguminosae) in the Atlantic Domain, southeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 43, n. 1, p. 162-197, 2018.

KANG, Yao-Hu *et al.* Assessment of soil enzyme activities of saline-sodic soil under drip irrigation in the Songnen plain. **Paddy and Water Environment**, v. 11, p. 87-95, 2013.

KAUR, Navjot *et al.* A review of germination and early growth as a proxy for plant fitness under petrogenic contamination—knowledge gaps and recommendations. **Science of The Total Environment**, v. 603, p. 728-744, 2017.

KIM, Yong -Bum *et al.* Phytoremediation of anthracene contaminated soils by different plant species. **Journal of Plant Biology**, v. 47, p. 174-178, 2004.

KLINK, Agnieszka. A comparison of trace metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Phragmites australis*: implication for phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 3843-3852, 2017.

KOZERA, Carina. Florística e fitossociologia de uma formação pioneira com influencia fluvial e de uma Estepe Gramíneo-Lenhosa em diferentes unidades geopedológicas, município de Balsa Nova, Paraná-Brasil. 2008.

KUIPER, Irene *et al.* Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 17, n. 1, p. 6-15, 2004.

LASAT, Mitch M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of environmental quality**, v. 31, n. 1, p. 109-120, 2002.

LIU, Wuxing *et al.* Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). **Plant and soil**, v. 371, p. 533-542, 2013.

MARECIK, Roman *et al.* Phytoremediation Potential of Three Wetland Plant Species Toward Atrazine in Environmentally Relevant Concentrations. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 3, 2012.

MELO, Clarissa Lovato. Evolução da contaminação na área do vazamento de óleo cru na REPAR (2000): estudo do sistema "banhado 4" e aplicação do método de polarização induzida na investigação da biodegradação de hidrocarbonetos. 2006.

MERKL, Nicole; SCHULTZE-KRAFT, Rainer; INFANTE, Carmen. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 165, p. 195-209, 2005.

MERKL, Nicole; SCHULTZE-KRAFT, Rainer; INFANTE, Carmen. Phytoremediation in the tropics—the effect of crude oil on the growth of tropical plants. **Bioremediation Journal**, v. 8, n. 3-4, p. 177-184, 2004.

MORADI, Babak *et al.* Assessment of oxidative stress response genes in *Avicennia marina* exposed to oil contamination—Polyphenol oxidase (PPOA) as a biomarker. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00565, 2020.

MORARI, Francesco; DAL FERRO, Nicola; COCCO, Elisa. Municipal wastewater treatment with *Phragmites australis* L. and *Typha latifolia* L. for irrigation reuse. Boron and heavy metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-14, 2015.

MORTON, Julia F. Cattails (*Typha* spp.) weed problem or potential crop?. **Economic Botany**, v. 29, n. 1, p. 7-29, 1975.

MUKHERJEE, Arghya *et al.* Bioinformatic approaches including predictive metagenomic profiling reveal characteristics of bacterial response to petroleum hydrocarbon contamination in diverse environments. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2017.

NAIDOO, Gonasageran; Naidoo, Yougasphree; Achar, Premila. Responses of the mangroves *Avicennia marina* and *Bruguiera gymnorrhiza* to oil contamination. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 5, p. 357-362, 2010.

NAWAZ, Tahira *et al.* Anatomical and physiological adaptations in aquatic ecotypes of *Cyperus alopecuroides* Rottb. under saline and waterlogged conditions. **Aquatic botany**, v. 116, p. 60-68, 2014.

NEWMAN, Lee A.; REYNOLDS, Charles M. Phytodegradation of organic compounds. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 225-230, 2004.

NG, Yee-Sern; SEN GUPTA, Bhaskar; HASHIM, Mohd A. Stability and performance enhancements of Electrokinetic-Fenton soil remediation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, p. 251-263, 2014.

OGOKO, E. C.; KELLE, H. I. Anions, total petroleum hydrocarbons and aromatic hydrocarbons in soils of Aba Dumpsites. **Br. J. Appl. Sci. Technol**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2016.

OSSE, Matthew; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Markers of oil exposure in cold-water benthic environments: Insights and challenges from a study with echinoderms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 56-66, 2018.

PENG, Shengwei *et al.* Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 2-3, p. 1490-1496, 2009.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, I. *et al.* Growth of four tropical tree species in petroleum-contaminated soil and effects of crude oil contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 1769-1783, 2017.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, I. *et al.* Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-13, 2013.

PHILLIPS, Lori A. *et al.* Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v. 52, p. 56-64, 2012.

REMIGI, Philippe *et al.* Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016.

RODERJAN, Carlos Vellozo *et al.* As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. **Ciência & Ambiente**, v. 24, n. 1, p. 75-92, 2002.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. C. *et al.* *Typha latifolia* as potential phytoremediator of 2, 4-dichlorophenol: Analysis of tolerance, uptake and possible transformation processes. **Chemosphere**, v. 173, p. 190-198, 2017.

RULEY, J. A. *et al.* Enhancing the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils in the Sudd wetlands, South Sudan, using organic manure. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2020, p. 1-8, 2020.

SAADANI, Omar *et al.* In situ phytostabilisation capacity of three legumes and their associated Plant Growth Promoting Bacteria (PGPBs) in mine tailings of northern Tunisia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 263-269, 2016.

SALEM, Zohra Ben *et al.* Metal accumulation and distribution in the organs of Reeds and Cattails in a constructed treatment wetland (Etueffont, France). **Ecological engineering**, v. 64, p. 1-17, 2014.

SALT, David E.; SMITH, R. D.; RASKIN, Ilya. Phytoremediation. **Annual review of plant biology**, v. 49, n. 1, p. 643-668, 1998.

SCHULTZ, Asgard *et al.* Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4377-4381, 2001.

SEGIN, Verena; DAVY, Christina M.; FREELAND, Joanna R. Review of *Typha* spp.(cattails) as toxicity test species for the risk assessment of environmental contaminants on emergent macrophytes. **Environmental Pollution**, v. 284, p. 117105, 2021.

SHAHSAVARI, Esmail *et al.* Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-14, 2013.

SILVA, C. A. *et al.* Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 400-409, 2009.

SMITH, S. GALEN. *Typha*: its taxonomy and the ecological significance of hybrids. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 27, n. 1, p. 129-138, 1987.

SOUSA, R. P. da Silva. **Dinâmica temporal e ecologia funcional de uma formação pioneira de influência flúvio-lacustre 19 anos após derramamento de petróleo**. 87f. Dissertação (Mestrado em engenharia Florestal) – Setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

STRECHE, Constantin *et al.* Experimental research regarding the application of electro-flushing method on diesel contaminated soils. **Present Environment and Sustainable Development**, n. 1, p. 37-44, 2014.

STROUD, J. L.; PATON, G. I.; SEMPLE, Kirk T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1239-1253, 2007.

SUN, Tian-Ran *et al.* Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1-3, p. 919-925, 2010.

THIERET, John W.; LUKEN, James O. The Typhaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, v. 1, n. 8, p. 27-56, 1996.

TSAO, David T. Overview of phytotechnologies. **Phytoremediation**, p. 1-50, 2003.

UDO, E. J.; FAYEMI, A. A. A. **The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn.** American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1975.

URQUIAGA, S., & Zapata, F. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y El Caribe.** Ministerio da Agricultura e do Abastecimento, Porto Alegre (Brasil), 2000.

VAN HAMME, Jonathan D.; SINGH, Ajay; WARD, Owen P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VERÂNE, Jéssica *et al.* Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments using *Rhizophora mangle*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111687, 2020.

VROOM, Renske JE *et al.* *Typha latifolia* paludiculture effectively improves water quality and reduces greenhouse gas emissions in rewetted peatlands. **Ecological engineering**, v. 124, p. 88-98, 2018.

WANG, Jing *et al.* Phytoremediation of petroleum polluted soil. **Petroleum Science**, v. 5, p. 167-171, 2008.

WANG, Yanxu; OYAIZU, Hiroshi. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 2-3, p. 760-764, 2009.

WELLER, David M.; THOMASHOW, Linda S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: biotechnology and the release of GMOs**, p. 1-18, 1994.

XIE, Wenjun *et al.* Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 763-768, 2018.

XIE, Wenjun *et al.* The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 24438-24446, 2017.

YAVARI, Sara; MALAKAHMAD, Amirhossein; SAPARI, Nasiman B. A review on phytoremediation of crude oil spills. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-18, 2015.

YUAN, Longmiao *et al.* Remediating petroleum hydrocarbons in highly saline–alkali soils using three native plant species. **Journal of Environmental Management**, v. 339, p. 117928, 2023.

ZAVALA-CRUZ, J. *et al.* Oil spills on soils and adaptation of tropical grass in Activo Cinco Presidentes, Tabasco, Mexico. **Terra: Organo Científico de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, AC**, 2005.

ZENGEL, Scott *et al.* Heavily oiled salt marsh following the Deepwater Horizon oil spill, ecological comparisons of shoreline cleanup treatments and recovery. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132324, 2015.

ZHANG, X.; LIU, Z. Responses of litter decomposition and nutrient release of *Bothriochloa ischaemum* to soil petroleum contamination and nitrogen fertilization. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, p. 719-728, 2019.

ZHOU, Beibei *et al.* Revised phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan aquatic plant genus *Typha* (Typhaceae). **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8813, 2018.

## CAPÍTULO I

### GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIAÇÃO DE *Mimosa oblonga* Benth EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

#### 1 INTRODUÇÃO

A crescente utilização do petróleo traz uma preocupação ambiental de magnitude mundial frente aos inúmeros acidentes ambientais que contaminam extensas áreas como resultado de sua extração, produção e transporte (HUTCHINSON *et al.*, 2001; EPSTEIN *et al.*, 2002; EKPERUSI *et al.*, 2015; VARJANI *et al.*, 2017).

O petróleo é um composto altamente tóxico que pode causar vários efeitos sobre organismos vivos e seus ambientes, apresentando um efeito cumulativo na cadeia alimentar (HUSSAIN *et al.*, 2018). Ao mesmo tempo em que estudos sobre seus efeitos são realizados, há ainda esforços significativos para o desenvolvimento de tecnologias que possam recuperar os ambientes degradados (XIE *et al.*, 2018), principalmente tecnologias mais baratas, visto que a descontaminação de locais contaminados podem chegar a bilhões de dólares (KUIPER *et al.*, 2004, STROUD *et al.*, 2007; API, 2018).

Nas plantas os efeitos da contaminação podem ser vários, desde redução na germinação, na taxa de crescimento e até morte (ADAM *et al.*, 2002; MERKL *et al.*, 2005). Tais efeitos podem variar de acordo com a concentração de petróleo, tempo de exposição ao contaminante e a espécie (ADAM *et al.*, 2002; BAEK *et al.*, 2004; MERKL *et al.*, 2005; NAIDOO, 2010; ZENGEL *et al.*, 2015). No entanto, mesmo com tais adversidades, algumas plantas toleram a contaminação por petróleo, conseguindo se estabelecer com sucesso na revegetação de locais contaminados através da dinâmica natural do ecossistema, e embora mais investigações sejam necessárias para entender o comportamento dessas espécies, muitas podem ser úteis na remediação de locais contaminados por meio da fitorremediação.

Fitorremediação é uma tecnologia promissora, onde é utilizado o maquinário natural de algumas espécies de plantas, juntamente com a associação com microrganismos do solo para reduzir a contaminação do solo (ANTONIADIS *et al.*, 2017). No entanto é necessário muito estudo para identificar espécies aptas a serem utilizadas com sucesso neste processo de descontaminação do solo, bem como para identificação de espécies representativas dos diferentes biomas, visando mitigar os impactos de contaminações por petróleo, contribuindo assim para a restauração das funções do ecossistema (COVRE, 2020). Para identificar estas

espécies, são necessário estudos e testes de fitorremediação principalmente com plantas que apresentam ocorrência natural em locais contaminados, visando compreender os mecanismos utilizados por elas, bem como se possuem um potencial de diminuir a quantidade de petróleo do solo.

No ano de 2012, a espécie *Mimosa oblonga* Benth. (Fabaceae) foi identificada em uma área contaminada por petróleo na Refinaria Getúlio Vargas - PETROBRAS (REPAR) (SILVA, 2014), no Estado do Paraná, onde ocorreu no ano de 2000 a ruptura de um duto, onde aproximadamente 4 milhões de litros de óleo foi derramado, afetando uma área de 2,5km<sup>2</sup>. O acidente foi considerado um dos maiores derramamento de óleo ocorrido em água doce brasileira (SILVA, 2009). Na várzea atingida, *M. oblonga* passou a fazer parte da formação pioneira após o acidente, e foi considerada uma das espécies de maior abundância, em dois levantamentos seguidos realizados na área, um em 2012 por Silva (2014) e outro em 2019 por Sousa (2020).

A alta frequência em um local contaminado aliada a outras características biológicas, destaca esta espécie como uma candidata promissora para utilização em ambientes degradados. *M. oblonga* é endêmica do Brasil, encontrada no Sudeste e Sul em mata ciliar e ambientes úmidos (JORDÃO *et al.*, 2018). Faz parte do grupo das leguminosas, caracterizadas pela forte associação simbiótica com microrganismos fixadores de nitrogênio, proporcionando melhor fertilidade do solo e redução de erosão. Além disso há também associação com fungos e micorrizas, aumentando a superfície de absorção, favorecendo um rápido crescimento (FRANCO *et al.*, 1992; Adam *et al.*, 2002), e ainda apresentam forte resiliência a diferentes biomas e contaminações (URQUIAGA *et al.*, 2000; INCKOT *et al.*, 2011).

Neste estudo avaliamos a espécie *M. oblonga* em uma abordagem combinada, analisando sua germinação e desenvolvimento inicial e em um solo contaminado com petróleo e analisamos indivíduos jovens da espécie transplantados para o solo contaminado, além disso, analisamos se esta espécie tem potencial de reduzir petróleo do solo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento I - Análise de germinação e desenvolvimento inicial de *M. oblonga* em solo contaminado com petróleo.

Sementes de *M. oblonga* foram coletadas em 2021, em uma área contaminada da REPAR, em Araucária, Paraná, Brasil. Foram separadas dos frutos e triadas para seleção de sementes saudáveis e de tamanho semelhante. Antes da instalação do experimento, foram adicionadas em água à 70° e mantidas por 48 horas para superação de dormência (FOWLER *et al.*, 2000). As sementes que flutuaram não foram utilizadas por indicar a inviabilidade.

Como substrato utilizamos casca de pinus compostada sem adição de adubos químicos da marca GHG. O substrato foi dividido em três porções para formação dos três tratamentos: sem contaminação (T0), substrato contaminado a 2% de petróleo (T2) e com 4% de petróleo (T4). Nas porções de contaminação o petróleo foi homogeneizado manualmente (mg de petróleo/kg de substrato). Os substratos foram adicionados em recipientes plásticos sem drenagem com as dimensões: 12,03 cm de largura, 16,42 cm de comprimento e 5,21 cm de altura, e receberam 250g de substrato cada. A concentração foi determinada de acordo com a revisão de Kaur *et al.* (2017), onde em uma proposta de padronização, 1% e 2% são consideradas concentrações baixas e, 5% concentração média. O petróleo utilizado neste estudo foi fornecido pela REPAR.

As sementes foram semeadas diretamente no substrato e os recipientes foram cobertos pelas tampas até o começo da germinação. Foram mantidos em ambiente interno, com regas de 20 ml sempre que necessário. Os recipientes foram distribuídos aleatoriamente e regularmente alternados de local entre eles. Foi utilizado dez recipientes para cada tratamento contendo dez sementes em cada. Para mensuração da quantidade de volatilização natural do petróleo, adicionamos ao experimento dez recipientes de cada tratamento com contaminação, mas sem as sementes.

Após o plantio, a avaliação da germinação e desenvolvimento inicial foi realizada diariamente durante 120 dias. As sementes foram consideradas germinadas quando a radícula se mostrou visível. A porcentagem de germinação (PG) foi calculada como  $PG = Ng \times 100 / Ns$ , onde Ng é o total de sementes germinadas e Ns é o Total de sementes semeadas. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula  $IVG = \sum (ni/ti)$ , em que: ni = número de sementes que germinaram no tempo “i”; ti = tempo após instalação do teste; i = 2 → 10 dias.

Diariamente foram monitoradas as etapas de desenvolvimento de todos os indivíduos (Observação e expansão de eófilos e metáfilos) e a porcentagem de sobrevivência (considerada viva a plântula verde ereta e túrgida. E neste caso, o total de sementes germinadas foi considerado como 100% para taxa de sobrevivência). A cada 30 dias o comprimento de parte aérea total foi medido com régua milimetrada de todos os indivíduos. Após 120 dias de semeados, todos os indivíduos foram avaliados quanto a biomassa fresca, tamanho da parte aérea e raiz e quantidade de folhas. A estimativa de área foliar (EAF) do eófilo e do 1° e 2° metáfilos de todos os tratamentos foi medida com régua milimetrada e obtida a partir da formula:  $EAF = (C \times L)/2$ , onde C é o comprimento e L a largura das folhas, e para análise estatística foi utilizado a média de três indivíduos de cada repetição.

## 2.2 Experimento II - Desenvolvimento e sobrevivência de indivíduos jovens de *M. oblonga* em solo contaminado com petróleo.

Indivíduos saudáveis de *M. oblonga* com quatro meses de idade, cultivados em solo sem contaminação, foram selecionados para este teste.

Foi utilizado substrato de casca de pinus compostada sem adição de adubos químicos da marca GHG. O petróleo, que foi adquirido diretamente da REPAR, foi misturado manualmente ao substrato, cada concentração separadamente em três porções para cada espécie: sem contaminação (T0), substrato contaminado a 2% de petróleo (T2) e T4 com 4% de petróleo (T4) em mg de petróleo/kg de substrato.

Os substratos foram adicionados em vasos plásticos sem drenagem de 2 Litros contendo 20 cm de diâmetro e 12 cm de altura onde foi adicionado 750 g de substrato.

Os indivíduos foram adicionados aos vasos preparados em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de cada tratamento, contendo quatro indivíduos em cada uma, e mais cinco repetições de cada tratamento com petróleo, mas não cultivados, para determinação de volatilização natural do petróleo.

Os vasos foram mantidos em ambiente interno com iluminação natural e regas na mesma proporção sempre que necessário para manter o solo úmido.

O teste foi conduzido por 120 dias, e a cada 30 dias do teste, todos os indivíduos foram medidos quanto altura da parte aérea com régua milimetrada. Ao final dos 120 dias de teste os indivíduos foram retirados dos substratos, lavados em água corrente e secos com papel absorvente. Foram medidos quanto ao comprimento de raiz e pesados para determinação de biomassa fresca.

### 2.3 Análise de potencial fitorremediador de petróleo

Amostras do solo foram coletadas no início para determinação de concentração inicial e ao final dos 120 dias de teste nos dois experimentos em cada tratamento com contaminação.

Ao final do teste, tanto nos tratamentos com plantas quanto nos tratamentos sem planta, os substratos foram separadamente misturados e homogeneizados para obtenção de uma amostra de cada tratamento em cada experimento. Todos os testes foram realizados utilizando cromatografia gasosa de acordo com o método EPA 8015D:2003.

A porcentagem de redução de HTP foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $\text{Degradação de HTP (\%)} = ((T1 - TF) / T1) \times 100$  onde T1 é a concentração inicial de HTP utilizado no tratamento e TF é a concentração final de HTP ao final do experimento em cada tratamento. A eficiência da fitorremediação foi calculada como:  $(CFC - CFS)$  onde CFC é referente a concentração final com planta e CFS é a concentração final sem planta.

### 2.4 Análise Estatística

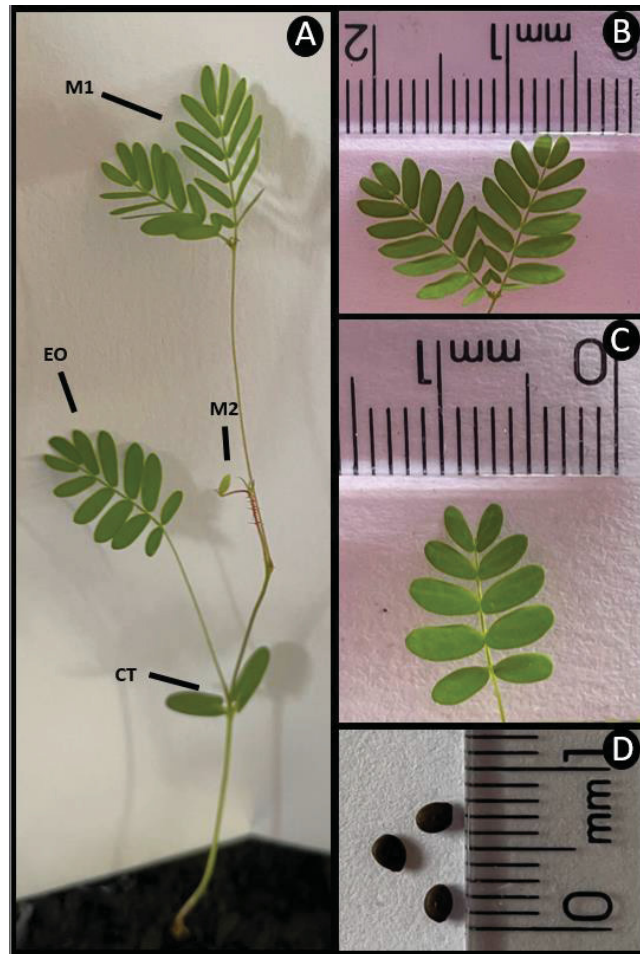
Os dados foram comparados utilizando análise de variância com permutação (ANOVA). A análise foi realizada para testar se as variáveis apresentam diferença significativas entre si. Como as variáveis expostas não atingiam os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade dos resíduos, foi utilizado teste Nemenyi para avaliação de diferença entre tratamentos. A significância estatística das análises foi definida em  $p < 0,05$ . Todos os testes e gráficos foram gerados utilizando o programa RStudio.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Experimento 1 - Análise de germinação e desenvolvimento inicial de *M. oblonga* em solo contaminado com petróleo.

A germinação de *M. oblonga* é do tipo epígea e fanerocotilar, ou seja, os cotilédones e a plúmula são conduzidos acima da superfície do solo, mediante crescimento do hipocótilo. É do tipo fanerocotiliar pois o cotilédone emerge do envoltório da semente, ficando completamente exposto. Possui dois cotilédones opostos e persistentes e colo bem marcado desde o início da germinação. O eófilo é composto por uma única folha composta bipinada com cinco ou seis pares de folíolos, e os metáfilos apresentam um par de folhas compostas bipinada. As folhas são curtas-pecioladas e os folíolos são oblongos, membranáceos e glabros (Figura 1).

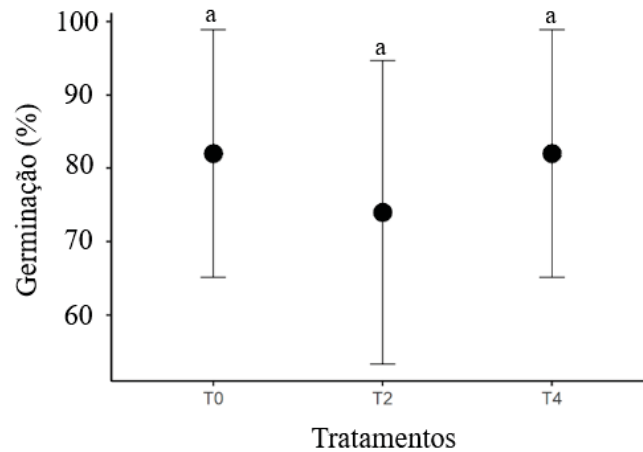
**Figura 1** Plântula de *Mimosa oblonga*. A. plantula completa (CT- Cotiledone; EO – eófilo expandido; M1 – primeiro metafilo expandido; M2 – segundo metafilo visível). B. Detalhes da folha composta (primeiro metafilo) C. detalhe da folha composta (eófilo). D. sementes de *M. oblonga*.



FONTE: O autor (2022).

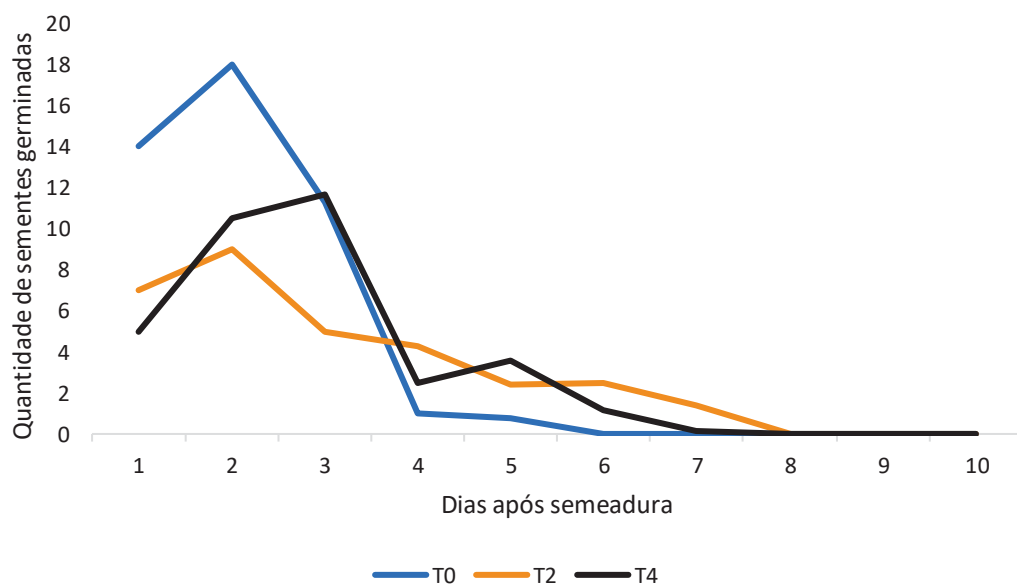
A germinação de *M. oblonga* iniciou após 24 horas após a semente e até o 28º dia foram observadas novas sementes germinadas, com taxas acima de 95% em todos os tratamentos, sem diferença significativa entre eles ( $P > 0,05$ ) (Figura 2).

**Figura 2.** Sementes germinadas de *Mimosa oblonga* em concentrações crescente de petróleo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2% (T2) e 4% (T4). Letras iguais não possuem diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



No entanto, a velocidade de germinação foi diferente entre os tratamentos (Fig. 3). O tratamento controle demonstrou maior índice de germinação entre o 2º ao 3º dia, enquanto os tratamentos com contaminação tiveram seus picos de germinação um pouco mais tardio, do 2º ao 4º dia, com germinações mais distribuídas no decorrer dos dias. Os valores de IVG dos tratamentos demonstraram diferença, enquanto o T0 obteve um IVG de 45,41, os demais apresentaram um índice menor (T2: 31,75 e T4: 34,58).

**Figura 3.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de *M. oblonga* ao longo de 10 dias após semeadura nos tratamentos sem contaminante (T0) e com concentrações crescentes de petróleo, com 2% (T2) e 4% (T4).



O desenvolvimento inicial após a germinação de *M. oblonga* foi desigual entre os tratamentos desde a protusão da radícula. O desenvolvimento foi mais lento principalmente no tratamento T4. Neste tratamento nem a visualização do segundo metáfilo foi concluída em 70% dos indivíduos até os 120 dias observados (Tab. 1).

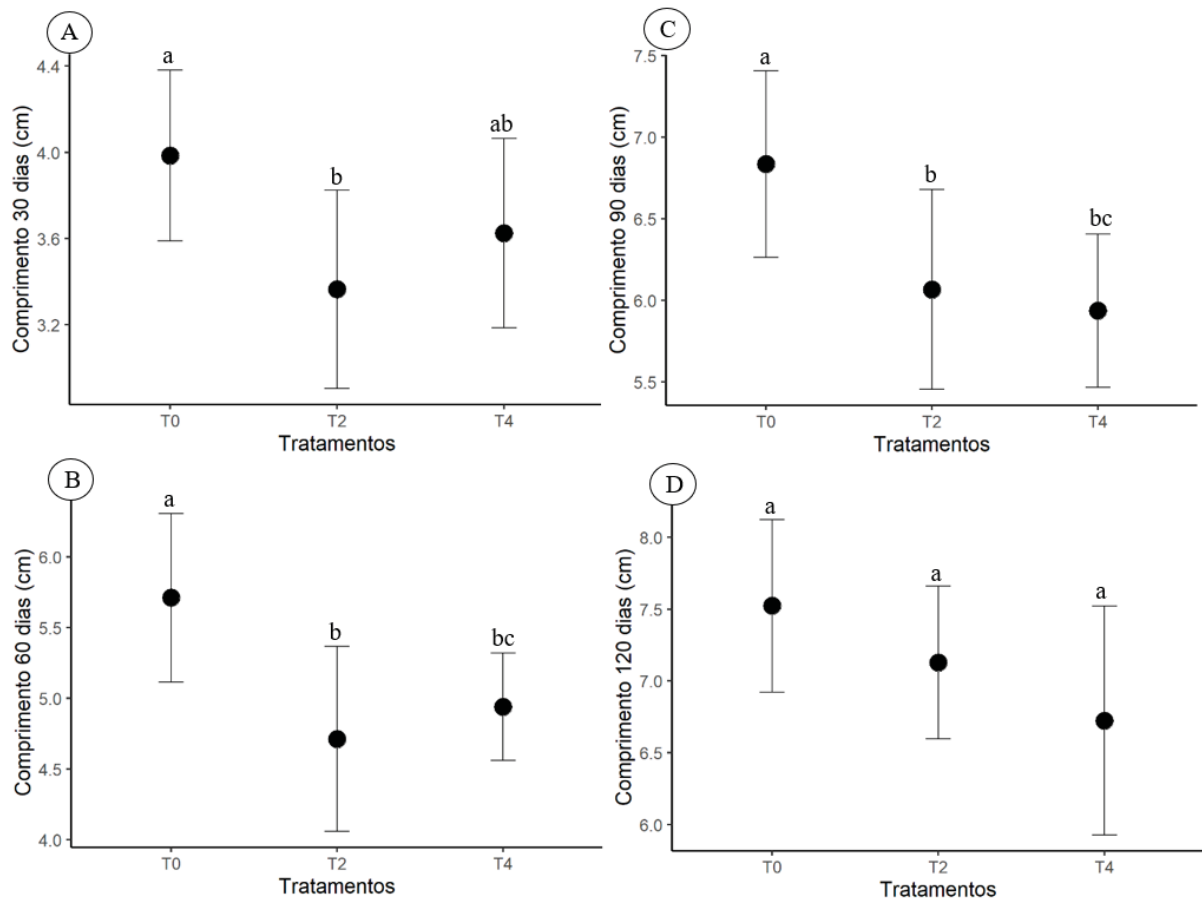
Comparado ao tratamento sem contaminação, as plantas dos tratamentos T2 e T4 demonstraram no geral um desenvolvimento mais lento, provavelmente afetado pelo petróleo. Porém, no início o tratamento T4 apresentou um desenvolvimento mais rápido comparado ao T2 até a expansão do primeiro metáfilo, inclusive em algumas etapas, até mais rápido que o tratamento T0.

**Tabela 1** Etapas de desenvolvimento de *Mimosa oblonga* em relação ao tempo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4). Considerado quando 70% dos indivíduos concluíram cada etapa do desenvolvimento até 120 dias.

Etapas do desenvolvimento		T0	T2	T4
		Dias		
Protusão da radícula	-	3	6	4
Cotilédone visível	Início	6	7	6
	Expansão	12	10	12
Eófilo	Início	26	29	25
	Expansão	40	48	37
Primeiro metáfilo	Início	50	61	58
	Expansão	70	81	75
Segundo metáfilo	Início	66	84	-
	Expansão	113	115	-
Terceiro metáfilo	Início	114	117	-
	Expansão	-	-	-

Desde o início do crescimento após a germinação, o comprimento da parte aérea do tratamento sem contaminação (T0), foi maior que o restante dos tratamentos com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) aos 30, 60 e 90 dias após o início do experimento (Fig.4A, 4B e 4C).

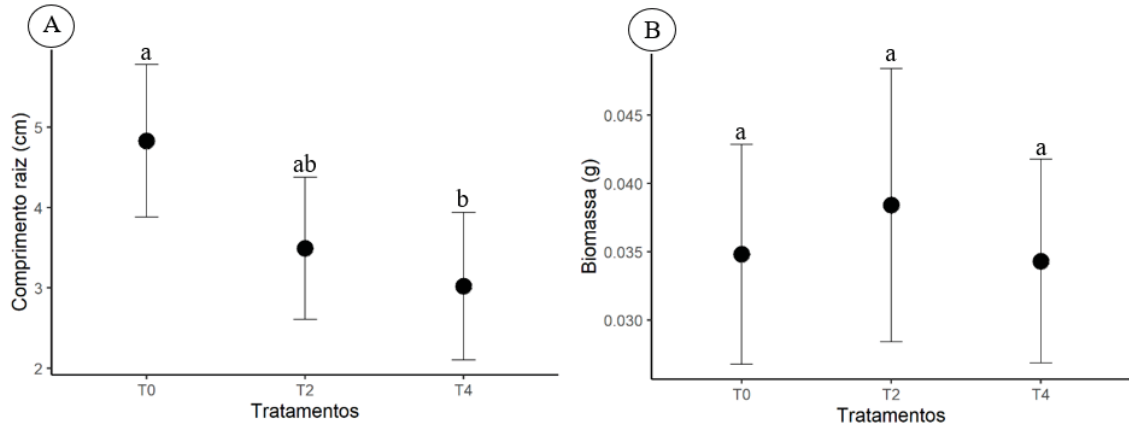
**Figura 4.** Comprimento de parte aérea de *Mimosa oblonga* aos 30 (A), 60 (B), 90 (C) e 120 (D) dias de crescimento, em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



Com relação a sobrevivência, o tratamento com o maior número de mortes foi o T2 com uma taxa de sobrevivência de 80,21%. O tratamento T4 foi quem demonstrou maior taxa de sobrevivência 87,76% e o tratamento T0 apresentou 83,67% de sobrevivência ao final do experimento aos 120 dias.

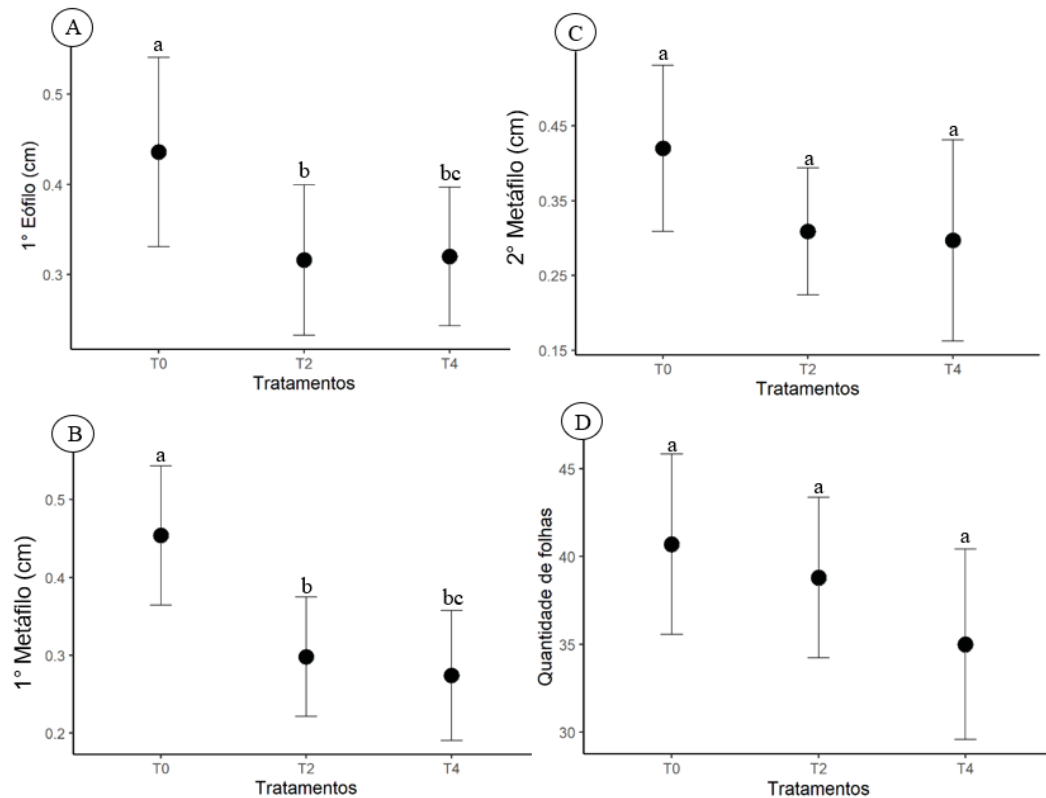
O comprimento das raízes demonstrou inibição de forma dependente do aumento das concentrações de petróleo, com resultados significativos entre os tratamentos T0 e T4 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 5A). No entanto na biomassa não houve uma diferença significativa entre os valores dos tratamentos ( $P > 0,05$ ).

**Figura 5.** Comprimento de raiz de *Mimosa oblonga* (A) e biomassa fresca (B) após 120 dias de germinação e desenvolvimento em solo não contaminado (T0) e solo contaminado com 2% (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



A estimativa de área foliar foi estatisticamente significante ( $P < 0,05$ ) no eófilo e no primeiro metáfilo (Fig. 6A-B). Porém, a quantidade de folhas não variou estatisticamente ( $P > 0,05$ ) (Fig. 6D).

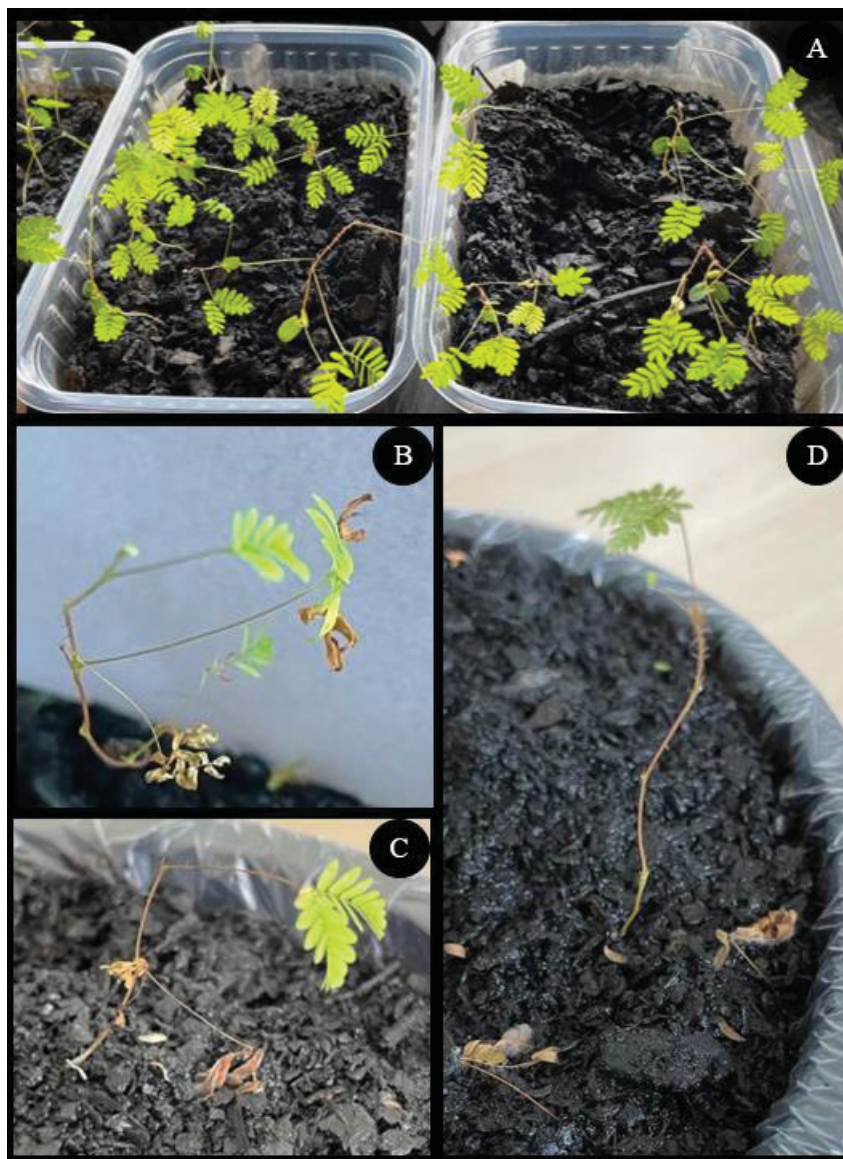
**Figura 6.** Estimativa de área foliar (EAF) do eófilo, 1° metáfilo e 2° metáfilo (A, B e C respectivamente) e quantidade de folhas (D) de *Mimosa oblonga* dos tratamentos controle, (T0) e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



### 3.2 Experimento 2 - Desenvolvimento e sobrevivência de indivíduos jovens de *M. oblonga* em solo contaminado com petróleo.

Após 120 dias de experimento os indivíduos de *M. oblonga* apresentaram danos visíveis nas folhas. Em todos os tratamentos os indivíduos apresentaram perda de folhas, morte de alguns metáfilos, perda dos cotilédones que ainda estavam presentes durante o plantio e necrose de folhas ou alguns folíolos (Fig. 7).

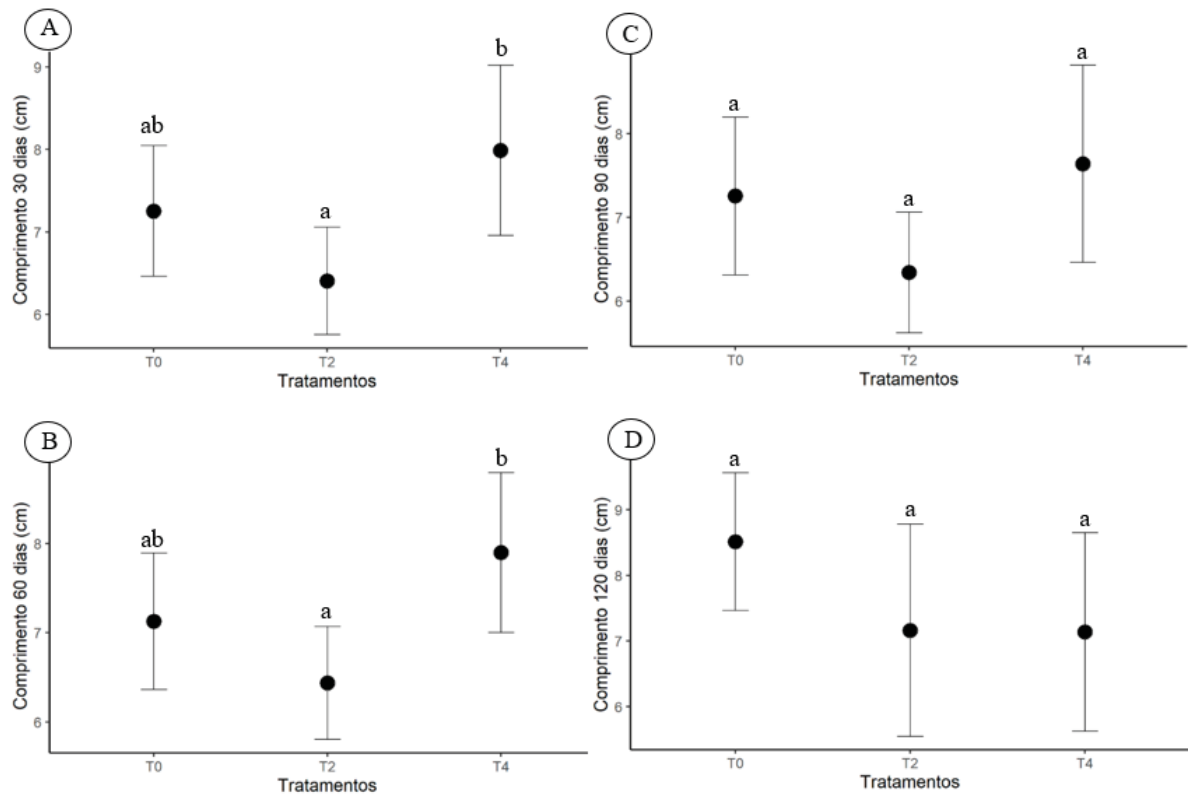
**Figura 7.** Indivíduos de *Mimosa oblonga* antes do plantio do experimento II (A) e indivíduos após plantio nos vasos do experimento II (B, C e D), evidenciando a perda de algumas folhas e necrose de alguns folíolos.



Durante o período de teste, *M. oblonga* demonstrou um elevado valor de indivíduos mortos até o final do experimento, com um total de 16 mortes dos 20 indivíduos do tratamento T4, ou seja, apenas 20% dos indivíduos do T4 sobreviveram até o final dos 120 dias. Nos tratamentos T2 e T0 um total de 40% e 85% sobreviveram respectivamente.

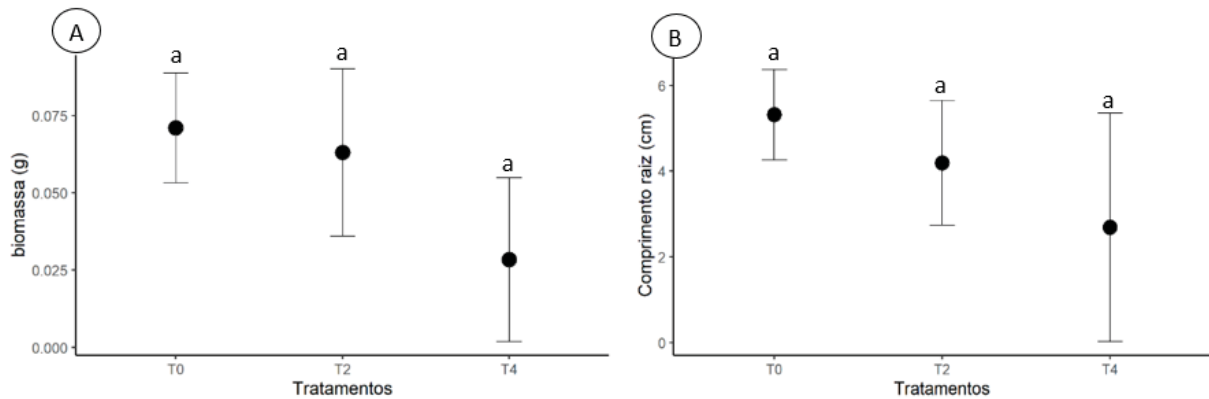
Com relação ao comprimento de parte aérea, houve uma diferença significativa apenas aos 30 e 60 dias entre os tratamentos T2 e T4, sendo que o tratamento T4 apresentou as maiores taxas de crescimento, inclusive maiores que o tratamento controle T0 (Fig. 8).

**Figura 8.** Comprimento de parte aérea de *Mimosa oblonga* aos 30, 60, 90 e 120 dias de crescimento nas figuras A, B, C e D respectivamente, em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo no experimento 2. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



Com relação a biomassa e comprimento de raiz, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

**Figura 9.** Biomassa (A) e comprimento de raiz (B) de *Mimosa oblonga* após 120 dias de experimento em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo no experimento 2. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



#### 2.4 3.3 Análise de potencial fitorremediador de petróleo

A análise cromatográfica do solo mostrou uma taxa de degradação elevada de concentração de petróleo em todos os tratamentos com planta em relação aos tratamentos não cultivados no experimento I, e embora com variações entre os tratamentos, no experimento II os resultados foram inversos (Tab 2). O potencial fitorremediador de *M. oblonga* foi observado em maior taxa no tratamento com 2% de petróleo do experimento I, onde houve uma redução de 42% de petróleo de solo comparativamente ao seu respectivo tratamento não cultivado. No entanto, no experimento II a maior redução ocorreu no tratamento T4 não cultivado, com uma diferença de 16,58% de seu respectivo tratamento cultivado. A porcentagem de degradação nos vasos cultivados declinou com o aumento da concentração de petróleo, e a mesma tendência foi observada para vasos não cultivados. Os resultados apresentados demonstram ainda que a porcentagem de redução de HTP no tratamento de menor concentração de 2% foi maior do que a redução no maior nível de contaminação 4%.

**Tabela 2** Concentração inicial e final de petróleo nos tratamentos com contaminação crescente de 2 (T2) e 4% (T4), comparativamente em vasos cultivados com *Mimosa oblonga* e não cultivados dos experimentos I e II.

Tratamento	Concentração inicial (mg/kg)		Concentração final (mg/kg)	Redução (%)	Potencial fitorremediador (%)
<b>Experimento 1</b>					
T2	24.854,7	Cultivado	11.044,9	55,56	<b>42,00</b>
		Não cultivado	21.484,5	13,56	
T4	38.629,3	Cultivado	26.341,8	31,81	<b>20,83</b>
		Não cultivado	34.389,3	10,98	
<b>Experimento 2</b>					
T2	15.387,7	Cultivado	4.938,8	67,90	-
		Não cultivado	4.125,1	73,19	
T4	37.036,4	Cultivado	19.607,8	47,05	-
		Não cultivado	13.466,8	63,63	

#### 4 DISCUSSÃO

A fitorremediação tem ganhado cada vez mais atenção nos últimos anos (GERHARDT *et al.*, 2017), e como as respostas das espécies variam muito de acordo com o contaminante e a concentração utilizada (SHAHSAVARI *et al.*, 2013), estudos comparativos entre diferentes abordagens para analisar o desenvolvimento das espécies em um ambiente contaminado é importante para testar a real eficiência de um espécie a ser utilizada em processos de fitorremediação. Um bom estabelecimento em locais contaminados só é possível com comunidades de espécies que conseguem se desenvolver de forma eficiente, para isso, é importante testar sua capacidade de germinação e seu desenvolvimento inicial, bem como analisar um plantio de indivíduos jovens em um solo contaminado, especialmente com espécies que já apresentam crescimento natural em áreas degradadas, agregando não só em conhecimento a respeito das plantas e suas adaptações a ambientes contaminados, mas também sobre novas espécies aptas a serem utilizadas em processos de remediação de contaminantes utilizando diferentes abordagens.

A germinação da semente, primeiro estágio vegetativo de vida de uma planta, tem sido estudada utilizando diferentes espécies em solo contaminado com petróleo, e é comum ver em outros estudos que a presença do petróleo e seus derivados causam redução na germinação (KROENING *et al.*, 2001; ADAM *et al.*, 2002; ISSOUFI *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2011). Sharonova *et al.* (2012) relacionam resultados com baixa germinação à uma barreira física que o contaminante pode causar ao redor das sementes, dificultando a entrada de água e oxigênio.

Em nosso estudo, o petróleo não afetou a germinação de sementes, podendo ser observado taxas acima de 90% em todos os tratamentos e sem diferença significativa entre eles. No caso de *M. oblonga*, o tegumento é tão resistente que em testes de germinação é necessária a utilização de métodos como a escarnificação das sementes, necessária para superação de dormência e aceleração da etapa da germinação (MONTAÑO-ARIAS *et al.*, 2021). Isso reforça que o tegumento desta espécie é resistente, já que conferiu resistência até mesmo na germinação dessas sementes, podendo fornecer uma barreira protetora, protegendo o embrião antes do contato com o contaminante e não comprometendo as funções fisiológicas no interior da semente.

Embora ocorra variações na escala de inibição de germinação entre diferentes espécies, que podem responder a estímulos externos de maneira diferente, tais variações podem ainda estar ligadas a concentração de petróleo (ADAM *et al.*, 2002). Nossos resultados podem indicar ainda que as concentrações utilizadas neste estudo foram muito baixas para causar forte inibição na germinação de *M. oblonga*, principalmente por se tratar de uma espécie de rápida germinação (1 a 3 dias), neste caso as sementes ficam pouco tempo em contato com o petróleo antes de germinarem, reduzindo o período de exposição ao contaminante. Isso mostrou que a germinação de *M. oblonga* não é um indicador sensível à contaminação por petróleo.

Após a germinação há o desenvolvimento dos eófilos e primeiros metáfilos, que em nosso estudo demonstraram um desenvolvimento tardio nos solos contaminados, e apesar da quantidade de folhas não ter sido prejudicada, os resultados de EAF dos eófilos também demonstraram diferença entre os tratamentos com contaminação com relação ao tratamento controle. Embora alguns estudos demonstrem que um solo biorremediado pode colaborar na redução desses efeitos do contaminante sobre o desenvolvimento dos eófilos (DORN *et al.*, 2000; INCKOT *et al.*, 2011), a restrição no crescimento e desenvolvimento dos eófilos e metáfilos é um fator comum em outros testes com outras espécies como em *Vicia sativa L.* e *Hordeum vulgare L.* (CHUPAKHINA *et al.*, 2004).

Esse desenvolvimento mais lento dos tratamentos com petróleo pode estar relacionado à várias restrições causadas pelo contaminante, dentre elas, as restrições hídricas e nutricionais

(NOGUEIRA *et al.*, 2011). Em experimentos realizados por MERCKL *et al.* (2005A), foi observado que a disponibilidade de água pode ser mais crítica em recipientes impregnados por petróleo, o que acabou afetando tanto o crescimento quanto a sobrevivência de três espécies de leguminosas (*Calopogonium mucunoides* Desv., *Centrosema brasilianum* (L.) Benth e *Stylosanthes capitata* Vogel).

Os problemas relacionados ao ambiente contaminado e o estresse hídrico, podem causar uma redução significativa em elementos essenciais, como fósforo, potássio e nitrogênio (DIMITROW *et al.*, 2000). Tais deficiências podem ter sido responsáveis pela diminuição de comprimento de parte aérea observada no teste de germinação, que seguiu de forma linear e dependente da concentração em todos os eventos de medida. No entanto, no teste com os indivíduos jovens, observamos uma estagnada de crescimento, e embora os resultados tenham demonstrado maior crescimento no tratamento T4 até os 90 dias, houve uma estagnação até este período, só aos 120 dias é que os indivíduos apresentaram crescimento, e então, mesmo que não estatisticamente diferente entre eles, o tratamento T0 já apresentou maiores taxas de crescimento comparado aos demais.

Apesar do comprimento de parte aérea de ambos os experimentos ter apresentado variações entre os tratamentos no decorrer dos 120 dias, a biomassa, não foi alterada em nenhum experimento. No entanto, o petróleo pode reduzir drasticamente, tanto o crescimento vegetal quanto a biomassa, sendo esses fatores utilizados como indicadores de toxicidade de hidrocarbonetos em alguns estudos. Xie *et al.* (2017) observaram que *Medicago sativa* e *Setaria viridis* Beauv avaliadas em cinco níveis entre 0 e 2,0% tiveram a biomassa e crescimento significativamente reduzidos. Em *Cedrela odorata*, *Haematoxylum campechianum*, *Swietenia macrophylla* e *Tabebuia rosea* também foi observado a diminuição de altura e biomassa em solo contaminado com 1,8%, 3,1% e 4,7% (PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

Os fatores que levam a diminuição de crescimento e tantos outros resultados negativos nas plantas, podem interferir também diretamente na sobrevivência dos indivíduos, e o sucesso de qualquer técnica onde é utilizado plantas, depende diretamente da capacidade de sobrevivência das espécies em solos contaminados (CHAKRAVARTY *et al.*, 2021). Em nosso experimento de germinação, *M. oblonga* apresentou bons resultados, com uma porcentagem de sobrevivência de 83,67%, 80,21% e 87,76% nos tratamentos T0, T2 e T4 respectivamente, no entanto, no experimento II os resultados foram gradativos dependente da concentração de petróleo no solo, com 85% de sobrevivência no tratamento T0, 40% no tratamento T2 e apenas 20% no tratamento T4. Esses resultados indicaram que a manipulação inicial dos indivíduos do experimento II pode ter os deixado vulneráveis aos efeitos tóxicos da contaminação do petróleo,

visto que tais efeitos não foram observados durante o desenvolvimento inicial após o experimento de germinação.

As lesões e necroses foliares observadas nos indivíduos jovens são respostas comuns em outras espécies sob condição de estresse com petróleo, como *Triticum aestivum*, *Deschampsia caespitosa* e *Canavalia ensiformis* (NAKATA *et al.*, 2011; BALLIANA *et al.*, 2017). No entanto, observamos em nosso estudo que as lesões estavam presentes inclusive nos indivíduos do tratamento controle, sendo possível que foram causadas pela sensibilidade da manipulação inicial para plantio e troca de vasos. Tais efeitos não foram observados em nosso experimento de germinação, onde os indivíduos não foram manipulados e sim germinados diretamente no solo, e um estudo recente de Inckot *et al.* (2023) onde foi avaliado germinação e desenvolvimento inicial de indivíduos de *Mimosa bimucronata*, *M. flocculosa* e *M. scabrella* var. *aspercarpa* também não foi observado lesões e necroses nos indivíduos, corroborando ao fato de que o petróleo não causou tais efeitos, pode ter intensificado as lesões e levado os indivíduos a morte, mas não foi a causa inicial.

A redução de petróleo do solo ocorreu em níveis mais elevados no experimento com os indivíduos jovens, no entanto em comparação entre solo cultivado e não cultivado, a diferença foi muito maior no experimento de germinação, com potencial de fitorremediação de 42,00% e 20,83% de seus respectivos vasos não cultivados nos tratamentos T2 e T4 respectivamente.

A capacidade das plantas em reduzir petróleo do solo está relacionada ainda a um dos mecanismos mais importantes da fitorremediação de solo contaminado com petróleo, o estímulo das plantas ao crescimento e atividade de degradadores simbiotes (FRICK *et al.*, 1999; YATEEM *et al.*, 2008), e as leguminosas (Fabaceae) já tem sido amplamente estudadas e conhecidas pelo alto potencial de associação com bactérias e fungos que melhoram tanto a eficiência das plantas na absorção de nutrientes quanto favorecer seu crescimento em um ambiente de estresse (FRANCO *et al.*, 2000; ADAM *et al.*, 2003; BENTO *et al.*, 2012).

A redução de petróleo é observada também em outros estudos com outras espécies, alguns inclusive relacionam a redução de concentração com relação ao tempo, Cai *et al.* (2016) observaram que aos 30 dias houve a degradação de 6,9%, e ao final de 90 dias houve a redução máxima de 64% de petróleo utilizando *Festuca arundinaceae*. Estudo de Al-Mansoori *et al.* (2017) utilizando *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) também observaram uma grande redução da concentração do petróleo, 79,8% após 72 dias de exposição a uma mistura de solo com concentração de 2 g/kg de gasolina.

Nos estudos de Silva (2014) realizados na área de várzea degradada da Repar-Petrobras, juntamente com o levantamento florístico da área apontando *M. oblonga* como uma das

espécies de maior frequência no local, foi constatado valores entre 439,00 e 6.444,62 (mg/kg) de petróleo em 30 diferentes pontos amostrais. A maior concentração encontrada foi no ponto amostral 20, com cerca de 6.444,62 (mg/kg), ou seja, 2,58% a mais de petróleo, comparada a nossa concentração máxima obtida no início do tratamento T4. Estes dados aliados aos nossos resultados, indicam que *M. oblonga* tem a capacidade de sobreviver a níveis altos de petróleo, conseguindo se estabelecer com sucesso em um solo degradado mesmo em concentrações elevadas.

## 5 CONCLUSÕES

Nossos estudos indicaram que a espécie *M. oblonga* respondeu de maneira positiva ao estresse causado pela contaminação por petróleo, mesmo no maior nível de contaminação utilizada em nossos testes. Não demonstrou toxicidade na germinação e desenvolvimento inicial, apresentou altos índice de sobrevivência e biomassa em seu desenvolvimento inicial em solo contaminado. Os indivíduos jovens apresentaram certa sensibilidade após o transplante para os vasos contaminados, no entanto os resultados não apresentaram diferenças significativas. O potencial de fitorremediação desta espécie não apresentou taxas elevadas, no entanto a redução de petróleo do solo chegou a 67,90% em vaso cultivado, tendo estão esta espécie forte potencial de utilização em locais contaminados, especialmente a partir de semeadura direta.

## 6 REFERÊNCIAS

ADAM, Gillian; DUNCAN, Harry. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental pollution**, v. 120, n. 2, p. 363-370, 2002.

ADAM, Gillian; DUNCAN, Harry. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, p. 123-130, 2003.

AL-MANSOORY, Asia Fadhile *et al.* Phytoremediation of contaminated soils containing gasoline using *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) in greenhouse pots. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 11998-12008, 2017.

ANTONIADIS, Vasileios *et al.* Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. **Earth-Science Reviews**, v. 171, p. 621-645, 2017.

API. Environmental Expenditures by the U.S. Oil and Natural Gas Industry, 12th ed., American Petroleum Institute, Washington, DC. p.27, 2018.

BAEK, Kyung-Hwa *et al.* Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 39, n. 9, p. 2465-2472, 2004.

BALLIANA, A. G. *et al.* Development of *Canavalia ensiformis* in soil contaminated with diesel oil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 979-986, 2017.

BENTO, Ricardo Aparecido *et al.* Selection of leguminous trees associated with symbiont microorganisms for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 5659-5671, 2012.

CAI, Bin *et al.* Comparison of phytoremediation, bioaugmentation and natural attenuation for remediating saline soil contaminated by heavy crude oil. **Biochemical engineering journal**, v. 112, p. 170-177, 2016.

CHAKRAVARTY, Paramita; DEKA, Hemen. Enzymatic defense of *Cyperus brevifolius* in hydrocarbons stress environment and changes in soil properties. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V. Plant adaptation to oil stress. **Russian journal of ecology**, v. 35, p. 290-295, 2004.

COVRE, Watilla Pereira *et al.* Phytoremediation potential of *Khaya ivorensis* and *Cedrela fissilis* in copper contaminated soil. **Journal of Environmental Management**, v. 268, p. 110733, 2020.

DIMITROW, D. N.; MARKOW, E. Behaviour of available forms of NPK in soils polluted by oil products. *Poczwoznanie. Agrochimija I Ekologia*, v. 35, n. 3, p. 3-8, 2000.

DORN, Philip B.; SALANITRO, Joseph P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, v. 40, n. 4, p. 419-426, 2000.

EKPERUSI, O. A.; AIGBODION, F. I. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus*. *3 Biotech*, v. 5, p. 957-965, 2015.

EPSTEIN, Paul R. *et al.* A life cycle analysis of its health and environmental impacts. **The Center for Health and the Global Environment. Harvard Medical School. EUA**, 2002.

FRANCO, Avílio A. *et al.* **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. de C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. **Transition to global sustainability: the contribution of Brazilian science**, p. 209-233, 2000.

FRICK, C. M.; GERMIDA, J. J.; FARRELL, R. E. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. In: **technical seminar on chemical spills**. Environment Canada; 1998, 1999. p. 105a-124a.

FOWLER, J.A.P.; Bianchetti, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas. 27p. 2000.

GERHARDT, Karen E.; GERWING, Perry D.; GREENBERG, Bruce M. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Science*, v. 256, p. 170-185, 2017.

HUSSAIN, Imran *et al.* Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: improvement opportunities and field applications. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 202-219, 2018.

HUTCHINSON, S. Lewis; SCHWAB, A. P.; BANKS, M. K. Bioremediation and Biodegradation. **J. Environ. Qual**, v. 30, p. 1516-1522, 2001.

INCKOT, Renata Charvet *et al.* Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 3, p. 261-266, 2011.

INCKOT, Renata Charvet *et al.* Germination and Post-Seminal Development of *Mimosa L.*(Fabaceae) in Diesel Oil-Contaminated Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 18, 2023.

ISSOUFI, I.; RHYKERD, R. L.; SMICIKLAS, K. D. Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 192, n. 4, p. 310-317, 2006.

JORDÃO, Lucas SB; MORIM, Marli P.; BAUMGRATZ, José Fernando A. Toward a census of *Mimosa* (Leguminosae) in the Atlantic Domain, southeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 43, n. 1, p. 162-197, 2018.

KAUR, Navjot *et al.* A review of germination and early growth as a proxy for plant fitness under petrogenic contamination—knowledge gaps and recommendations. **Science of The Total Environment**, v. 603, p. 728-744, 2017.

KROENING, S. J. *et al.* Losses of diesel oil by volatilisation and effects of diesel oil on seed germination and seedling growth. **Environmental technology**, v. 22, n. 9, p. 1113-1117, 2001.

KUIPER, Irene *et al.* Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 17, n. 1, p. 6-15, 2004.

MERKL, Nicole; SCHULTZE-KRAFT, Rainer; INFANTE, Carmen. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 165, p. 195-209, 2005.

MERKL, Nicole; SCHULTZE-KRAFT, Rainer; INFANTE, Carmen. Phytoremediation in the tropics—influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. **Environmental Pollution**, v. 138, n. 1, p. 86-91, 2005.

MONTAÑO-ARIAS, Susana Adriana *et al.* Effect of scarification and temperature on seed germination of two Mexican species of *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae). **Botanical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 649-659, 2015.

NAIDOO, Gonasageran; Naidoo, Yougasphree; Achar, Premila. Responses of the mangroves *Avicennia marina* and *Bruguiera gymnorrhiza* to oil contamination. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, n. 5, p. 357-362, 2010.

NAKATA, Colin *et al.* Growth and physiological responses of *Triticum aestivum* and *Deschampsia caespitosa* exposed to petroleum coke. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, p. 59-72, 2011.

SALT, David E.; SMITH, R. D.; RASKIN, Ilya. Phytoremediation. **Annual review of plant biology**, v. 49, n. 1, p. 643-668, 1998.

SHAHSAVARI, Esmaeil *et al.* Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-14, 2013.

SHARONOVA, Natalia; BREUS, Irina. Tolerance of cultivated and wild plants of different taxonomy to soil contamination by kerosene. **Science of the Total Environment**, v. 424, p. 121-129, 2012.

SILVA, C. A. *et al.* Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 400-409, 2009.

SILVA, M. Y. B. D. **Florística e estrutura de uma formação pioneira com influência fluvio-lacustre 12 anos após derramamento de óleo**. 131f. Tese (Engenharia florestal) – Setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2014.

SOUSA, R. P. da Silva. **Dinâmica temporal e ecologia funcional de uma formação pioneira de influência flúvio-lacustre 19 anos após derramamento de petróleo**. 87f. Dissertação (Mestrado em engenharia Florestal) – Setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

STROUD, J. L.; Paton, G. I.; Semple, Kirk T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1239-1253, 2007.

SUN, Tian-Ran *et al.* Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1-3, p. 919-925, 2010.

TANG, Jingchun *et al.* Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 5, p. 845-851, 2011.

URQUIAGA, Segundo; Zapata, Felipe. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y El Caribe**. Ministerio da Agricultura e do Abastecimento, Porto Alegre (Brasil), 2000.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

WANG, Yanxu; Oyaizu, Hiroshi. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 2-3, p. 760-764, 2009.

XIE, Wenjun *et al.* Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 763-768, 2018.

XIE, Wenjun *et al.* The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 24438-24446, 2017.

YATEEM, A.; AL-SHARRAH, T.; BIN-HAJI, A. Investigation of microbes in the rhizosphere of selected trees for the rhizoremediation of hydrocarbon-contaminated soils. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 4, p. 311-324, 2008.

ZENGEL, Scott *et al.* Heavily oiled salt marsh following the Deepwater Horizon oil spill, ecological comparisons of shoreline cleanup treatments and recovery. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132324, 2015.

## CAPÍTULO II

### GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E POTENCIAL DE FITORREMEDIÇÃO DE *Cyperus virens* Michx EM SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO

#### 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um composto altamente tóxico que causa inúmeros problemas ambientais, além de oferecer perigo a fauna, flora e ao ser humano (TANG *et al.*, 2011; VARJANI *et al.* 2017). Por isso, atualmente existe uma grande necessidade de remediação dessas áreas contaminadas principalmente com tecnologias eficientes e sustentáveis para recuperar os ambientes degradados por petróleo.

Nas plantas o petróleo pode causar diversos problemas, como afetar o crescimento, a germinação, as taxas de rendimento levando até a morte (SHAHSAVARI *et al.*, 2013, XIE *et al.*, 2017). No entanto, o cultivo de algumas espécies pode colaborar na degradação de vários contaminantes orgânicos do solo, principalmente pelo estímulo da atividade microbiana da rizosfera (HALL *et al.*, 2011).

A fitorremediação surge como uma ferramenta com inúmeros benefícios, muito eficiente e com baixo custo, em que é utilizado plantas para realização redução do contaminante do solo (ANTONIADIS *et al.*, 2017). A identificação de espécies que podem ser utilizadas com sucesso em processos de fitorremediação de petróleo são de extrema necessidade na atualidade, visando mitigar os impactos de contaminações, restaurando a função do ecossistema por meio de crescimento e proteção do solo (COVRE, 2020). Para identificar estas espécies, é necessário estudos e testes de fitorremediação principalmente com plantas que apresentam ocorrência natural em locais contaminados e espécies nativas, que já apresentam uma alta adaptabilidade ao clima e a região, e assim, é necessário então procurar compreender os mecanismos utilizados por esses indivíduos, bem como se são potencialmente utilizáveis na descontaminação de outros locais degradados.

As espécies de Cyperaceae, no geral, são frequentemente submetidas a estresse eco fisiológicos por estarem em pântanos (NAWAZ *et al.*, 2014), além disso, algumas espécies de *Cyperus* já tem apresentado sucesso na fitorremediação de metais pesados (GALAL *et al.*, 2017; GALAL *et al.*, 2021; GAO, 2021) e inclusive mostrado efetividade na remediação de

solos contaminados com petróleo (BASUMATARY *et al.*, 2012; BARUAH *et al.*, 2013; YAVARI *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2018). Características como sistema radicular extensos, crescimento rápido e o fato de não necessitarem de manutenção a longo prazo, fazem das *Cyperus* candidatas adequadas para utilização em processos de fitorremediação. *Cyperus virens* Michx é uma gramínea nativa e apresentou crescimento natural em uma área após um ano de um grave acidente de derramamento de petróleo, ocorrido em 2000 na Refinaria Getúlio Vargas – PETROBRAS. Um ano após esse acidente poucas espécies conseguiram se estabelecer novamente na área afetada, e *C. virens* foi uma dessas espécies, que inclusive apresentava índices altos de frequência comparado as outras poucas espécies do local (FUNPAR, 2001).

No entanto, os estudos com foco na avaliação das respostas fitotóxicas de *C. virens* em solos contaminados é limitado. Por isso, o objetivo deste estudo foi de avaliar os efeitos do petróleo em *C. virens* desde os seus primeiros estágios de vida, a partir da germinação, e testar os efeitos fitotóxicos do petróleo em indivíduos jovens também em um experimento paralelo. Além disso, avaliamos se *C. virens* tem potencial fitorremediador de solo contaminado com petróleo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento I – Análise de germinação e desenvolvimento inicial de *C. virens*

Sementes de *C. virens* foram coletadas na área da REPAR no ano de 2022. Antes do plantio foram triadas de modo que fosse selecionada apenas sementes aparentemente saudáveis, e foram adicionadas em um recipiente com água para teste de flutuação. Sementes que flutuaram foram descartadas.

Para o teste utilizamos casca de pinus compostada sem adição de adubos químicos como substrato. Dividimos inicialmente em três porções, tratamento controle T0, e tratamentos com 2% e 4% de petróleo como T2 e T4 respectivamente. O petróleo, que foi fornecido pela Refinaria REPAR, foi homogeneizado ao substrato manualmente, até que o substrato estivesse todo envolto pelo contaminante. Para a mistura nas concentrações dos tratamentos T2 e T4 o petróleo foi misturado ao substrato em mg de petróleo por kg de substrato (20.000 mg kg<sup>-1</sup> (T2) e 40.000 mg kg<sup>-1</sup> (T4). Foi adicionado 250g substratos a potes plásticos sem drenagem com capacidade de 500g.

As sementes foram colocadas acima do substrato preparado e deixadas para germinar em ambiente interno com luz natural, temperatura ambiente e regas sempre que necessário para

manter o solo húmido. Foi estabelecido cinco repetições de cada tratamento contendo 30 sementes em cada, totalizando 150 sementes por tratamento e ainda cinco repetições de cada tratamento com contaminação, mas não cultivados, para determinação de volatilização natural do petróleo ao final do experimento. O experimento foi avaliado durante um período de 240 dias.

Após o plantio das sementes a contagem de germinações foi realizada todos os dias e a porcentagem de germinação (PG) foi calculada como  $PG = Ng \times 100 / Ns$ , onde Ng total de sementes germinadas e Ns Total de sementes semeadas. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula  $IVG = \sum (ni/ti)$ , em que: ni = número de sementes que germinaram no tempo “i”; ti = tempo após instalação do teste, e foi considerado 95 dias após a semeadura.

A cada 30 dias o comprimento de parte aérea foi medido com régua milimetrada em todos os indivíduos. E ao final do experimento os indivíduos foram avaliados quanto a biomassa fresca (pesados em balança digital) e tamanho de raiz.

## 2.2 Experimento II – Análise de desenvolvimento de indivíduos jovens de *C. virens*

Indivíduos saudáveis de *C. virens* com oito meses de idade, cultivados em ambiente sem contaminação por petróleo, foram selecionados e adicionados a vasos preparados com substrato de casca de pinus compostada. O petróleo foi misturado manualmente ao substrato, cada concentração separadamente em três porções para cada espécie: sem contaminação (T0), substrato contaminado a 2% de petróleo (T2) e T4 com 4% de petróleo (T4) em mg de petróleo/kg de substrato. Os substratos foram adicionados em vasos plásticos sem drenagem de 2 Litros contendo 20 cm de diâmetro e 12 cm de altura onde foi adicionado 750g de substrato.

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de cada tratamento contendo quatro indivíduos em cada uma, e mais cinco repetições de cada tratamento com petróleo, mas não cultivados, para determinação de volatilização natural do petróleo. Os vasos foram mantidos em ambiente interno com iluminação natural e regas na mesma proporção sempre que necessário para manter o solo úmido e o teste foi conduzido por 120 dias.

A cada 30 dias do teste, todos os indivíduos foram medidos quanto altura da parte aérea com régua milimetrada. Ao final dos 120 dias de teste os indivíduos foram retirados cuidadosamente dos substratos, lavados em água corrente e secos com papel absorvente. Foram medidos quanto a comprimento de raiz e pesados para determinação de biomassa fresca.

### 2.3 Análise de potencial de fitorremediação do solo

Inicialmente foi realizada a coleta do substrato homogeneizado com petróleo antes de serem adicionados aos vasos, para determinação de concentração inicial do petróleo nos tratamentos T2 e T4. Outra análise foi realizada ao final do experimento, onde o substrato foi homogeneizado novamente, cada tratamento separadamente para obtenção de concentração final, tanto dos vasos cultivados quanto dos vasos não cultivados.

O teste para determinação de concentração de petróleo foi realizado utilizando cromatografia gasosa de acordo com o método EPA 8015D:2003.

### 2.4 Análise estatística

Os dados foram comparados utilizando análise de variância com permutação (ANOVA). A análise foi realizada para testar se as variáveis apresentam diferenças entre tratamentos. Como as variáveis expostas não atingiam os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade dos resíduos, foi utilizado teste Nemenyi para avaliação de diferença entre tratamentos. A significância estatística das análises foi definida em  $p < 0,05$ . Todos os testes e gráficos foram gerados utilizando o programa RStudio.

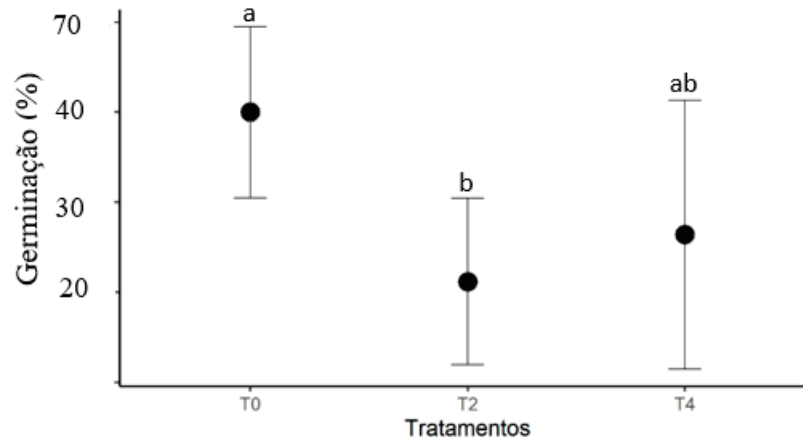
## 3 RESULTADOS

### 3.1 Experimento I – Análise de germinação e desenvolvimento inicial de *C. virens*

*C. virens* possui a germinação do tipo hipógea e folhas do tipo linear. As sementes começaram a germinar após o 15º dia de semente e foi observado novas germinações até os 95 dias de teste.

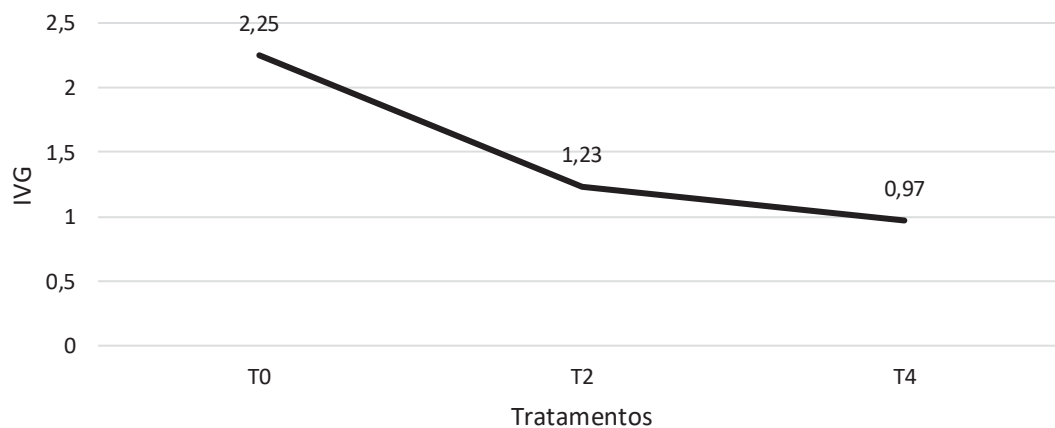
A germinação entre os tratamentos apresentou diferença significativa entre os tratamentos T0 e T2 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1). A quantidade de sementes germinadas no tratamento controle (T0) acabou sendo maior comparada aos tratamentos com contaminação. No total das 150 sementes germinadas em cada tratamento apenas 66,66% germinaram no T0 e 35,33% e 44% nos tratamentos T2 e T4 respectivamente, ou seja, o tratamento controle germinou cerca de duas vezes mais a quantidade de sementes do tratamento T2, apresentando assim uma diferença significativa entre ambos.

**Figura 1.** Resultado da germinação de *Cyperus virens* em concentrações crescente de petróleo em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



O IVG (Índice de velocidade de germinação) apresentou diferenças entre os tratamentos (Fig. 2), sendo que o resultado foi dependente da concentração de petróleo, o tratamento T0 apresentou IVG cerca de duas vezes maior que o T4.

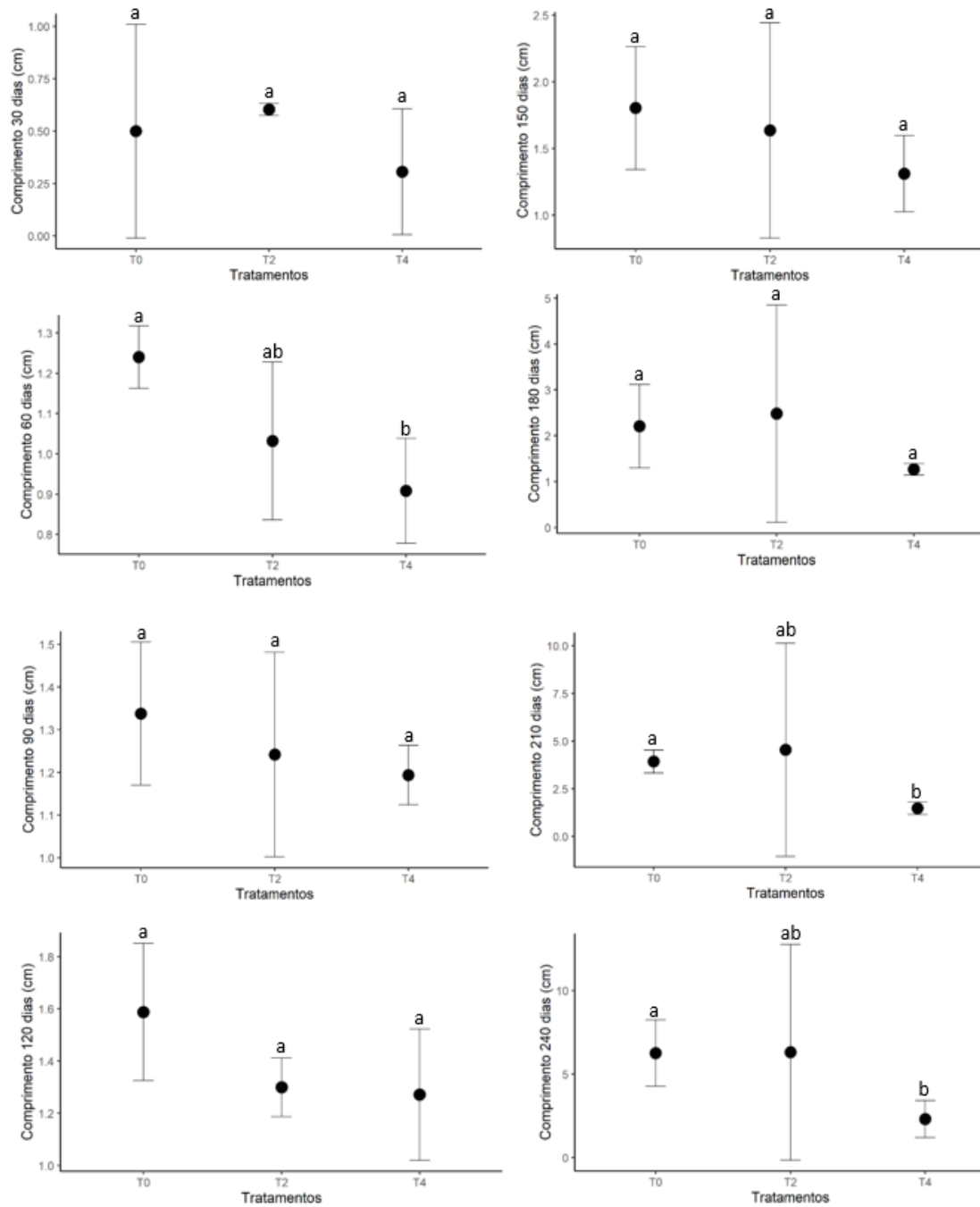
**Figura 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) de *Cyperus virens* submetidas a tratamento de solo não contaminado (T0) e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo.



O crescimento de *C. virens* só apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) aos 60, 210 e 240 dias de experimento ( $P < 0,05$ ). A diferença significativa nesses três períodos ocorreu principalmente pela diferença do T0 com os tratamentos com maior contaminação T4, sendo o T0 com o maior índice de crescimento. Nos outros períodos, inclusive quando T0 apresentou taxas menos elevadas de crescimento os resultados não foram significativos. Em todos os

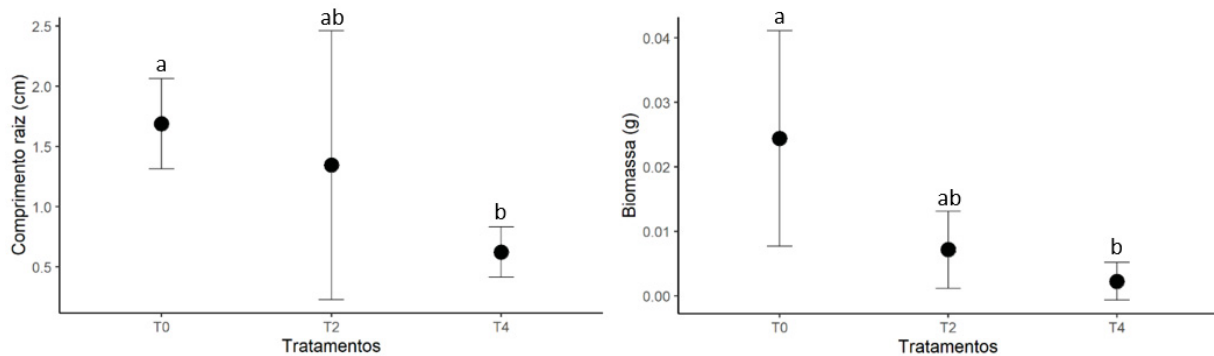
períodos medidos, o comprimento do tratamento T4, com a maior concentração de petróleo, se manteve com crescimento abaixo dos demais.

**Figura 3.** Comprimento de parte aérea de *Cyperus virens* aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 250 dias de crescimento em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



Os resultados de comprimento de raiz e biomassa obtidos ao final dos 240 dias de experimento (Fig. 4) foram semelhantes aos encontrados nas medições de tamanho, onde a diferença significativa ocorreu entre os tratamentos T0 e T4 ( $P < 0,05$ ), sendo que a biomassa foi consideravelmente reduzida dependente da concentração de petróleo do solo.

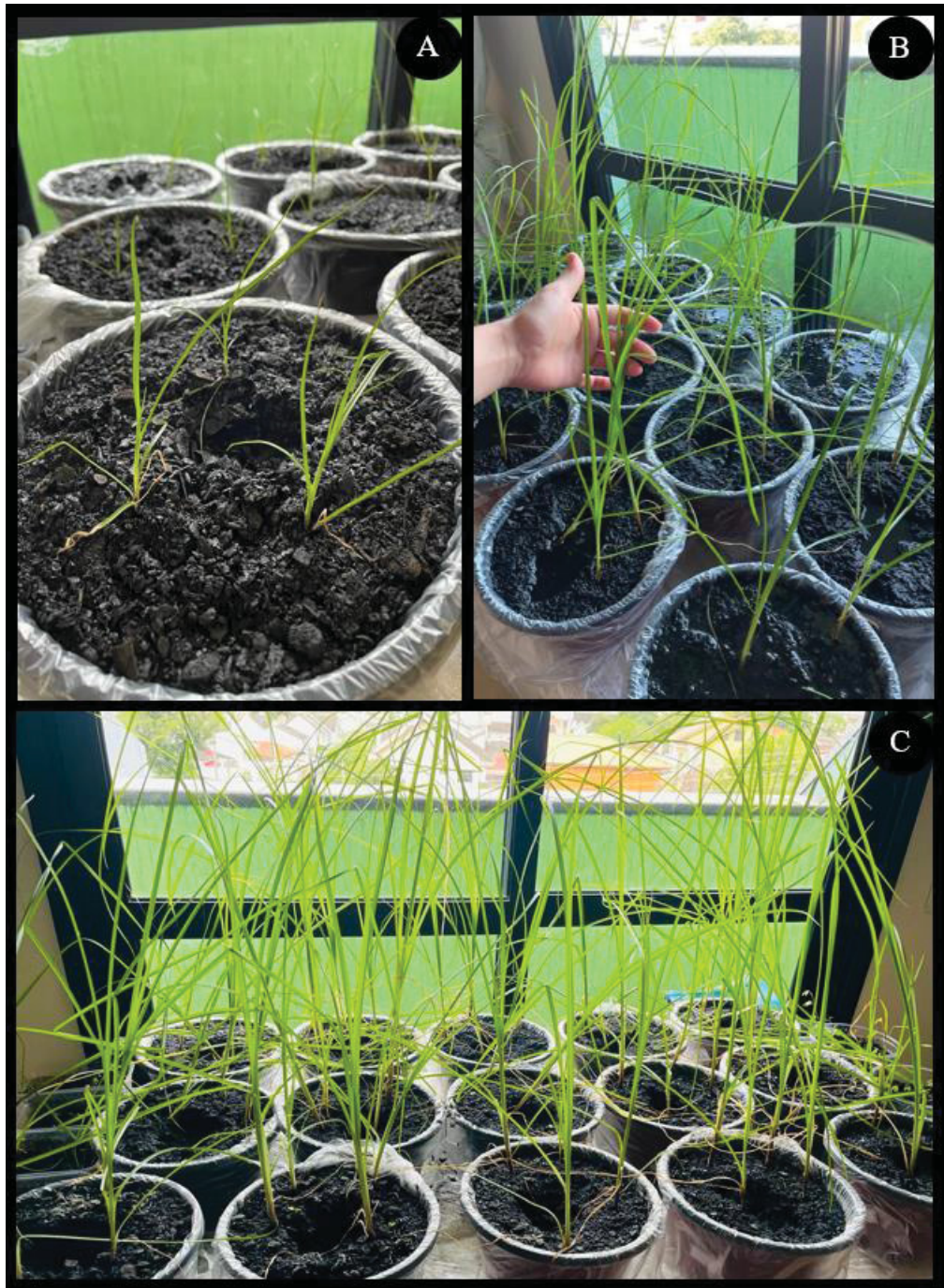
**Figura 4.** Comprimento de raiz e Biomassa de *Cyperus virens* ao final dos 240 dias de experimento em solo controle (T0) e contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



### 3.2 Experimento II – Análise de desenvolvimento de indivíduos jovens de *C. virens*

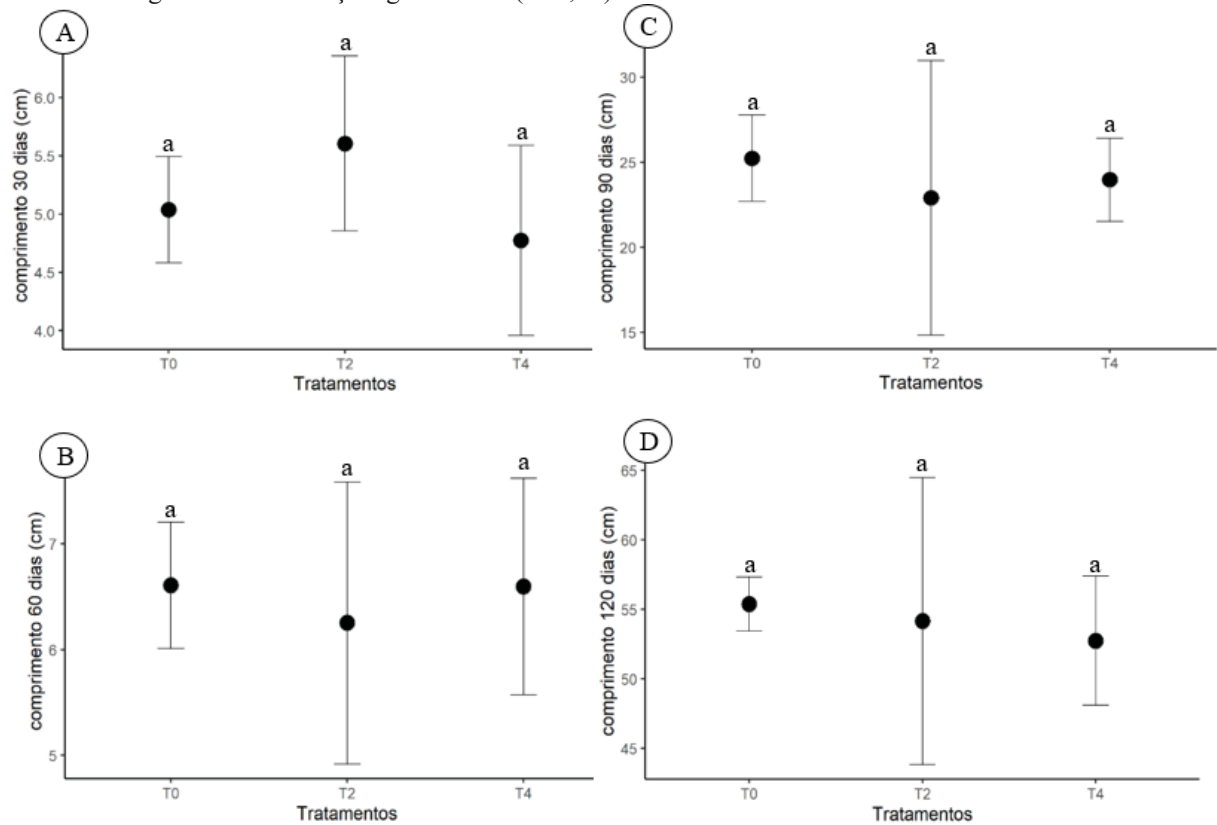
Após 120 dias de experimento não foram observados sintomas visíveis de toxicidade do petróleo em indivíduos de *C. virens*. A espécie demonstrou um bom desenvolvimento em solo contaminado após o plantio (Fig 5). No início do experimento os indivíduos tinham uma média semelhante entre os tratamentos, com valores entre 4,6 cm e 5,52 cm de altura. 90 dias após o início do teste os indivíduos já apresentavam uma média cinco vezes maior nos tratamentos T0, T2 e T4 com valores de 25,23cm / 22,90cm e 23,97cm respectivamente.

**Figura 5.** Imagens de desenvolvimento de indivíduos de *Cyperus virens* aos 40 dias de experimento (A), 90 dias de experimento (B) e 120 dias de experimento (C).



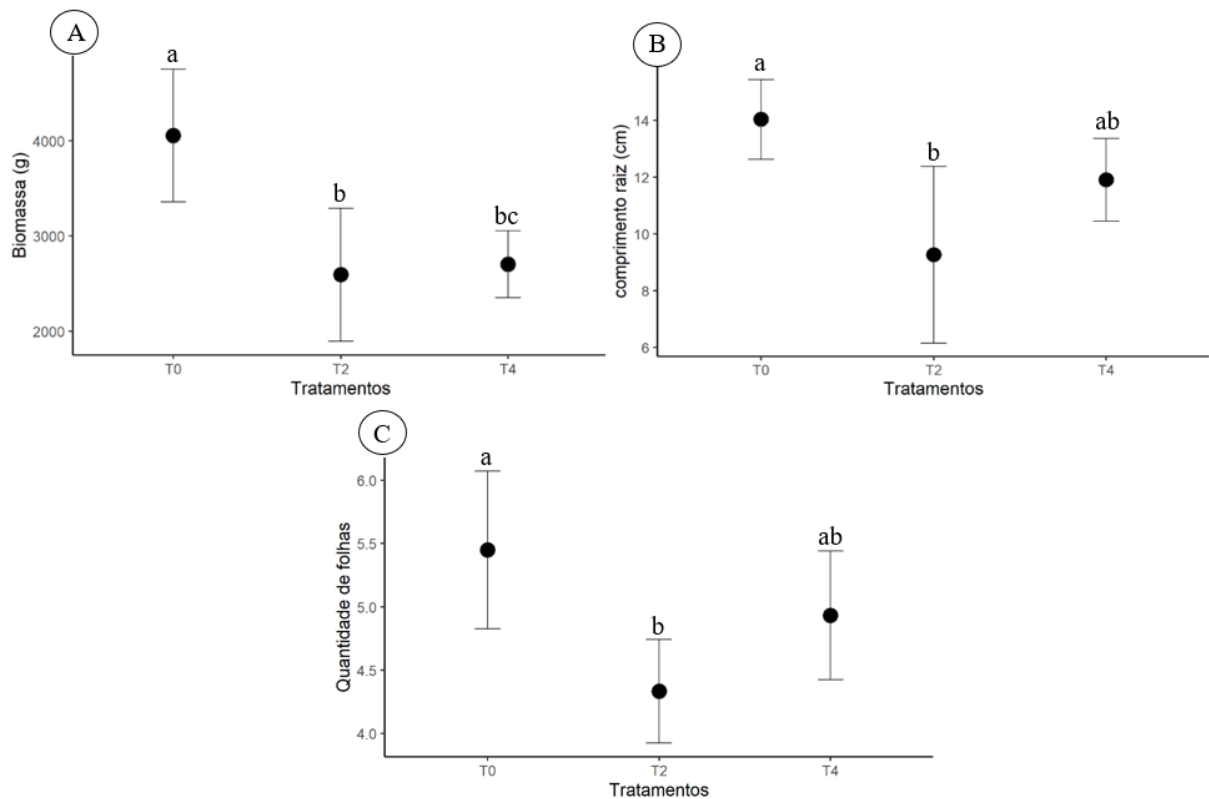
Durante todo o período analisado os valores de comprimento não foram significativos ( $P>0,05$ ).

**Figura 6.** Comprimento de parte aérea de *Cyperus virens* aos 30, 60, 90 e 120 dias de crescimento no Experimento II em solo não contaminado (T0), e solo contaminado com 2 (T2) e 4% (T4) de petróleo. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P<0,05$ ).



Com relação a biomassa, *C. virens* apresentou uma redução significativa nos tratamentos com contaminação T2 e T4 em comparação com o tratamento controle, assim como o comprimento de raiz, que observamos uma diferença significativa entre os tratamentos T2 e T0 (Fig 7). Para entender esta redução, visto que o comprimento não havia sido afetado, foi realizada a contagem de número de folhas de todos os indivíduos ao final do teste, que revelou também uma diferença significativa ( $P<0,05$ ) (Fig. 7C).

**Figura 7.** Biomassa (A) e comprimento de raiz (B) e quantidade de folhas (C) de *Cyperus virens*. Letras diferentes significam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



Com relação a sobrevivência nos indivíduos de *C. virens*, o menor índice de sobrevivência foi no tratamento T2, com um total de 75% de sobrevivência, já nos tratamentos T0 e T4 houve uma porcentagem de sobrevivência de 95% e 90% respectivamente.

### 3.3 Potencial de fitorremediação do solo

A redução de petróleo ocorreu em maior proporção nos vasos cultivados em comparação com seus respectivos tratamentos não cultivados. A maior taxa de redução ocorreu nos tratamentos T2 em comparação com os tratamentos T4 e a maior redução foi observada no tratamento T2 de *C. virens* no experimento II, onde utilizamos os indivíduos jovens, com uma redução de 70,05% de petróleo. O tratamento onde *C. virens* apresentou maior potencial de fitorremediação foi no T2 do experimento I após o teste de germinação, com uma diferença de 10,56% de seu respectivo tratamento não cultivado.

**Tabela 1.** Concentração inicial, final e potencial de fitorremediação de petróleo nos tratamentos com contaminação crescente de 2 (T2) e 4% (T4), comparativamente em vasos cultivados com *Cyperus virens* e não cultivados.

Tratamento	Concentração inicial (mg/kg)		Concentração final (mg/kg)	Redução (%)	Potencial de fitorremediação
<i>Experimento I</i>					
T2	30130,1	Cultivado	10449,8	65,32	10,56
		Não cultivado	13631,2	54,76	
T4	48687,1	Cultivado	26217,6	46,15	3,25
		Não cultivado	27802,5	42,90	
<i>Experimento II</i>					
T2	19282,2	Cultivado	5774,8	70,05	3,14
		Não cultivado	5380,6	66,91	
T4	39060,1	Cultivado	14830,3	62,03	5,11
		Não cultivado	16826,6	56,92	

#### 4 DISCUSSÃO

Levando em conta que as espécies apresentam particularidades quanto aos seus processos de desenvolvimento, avaliamos neste estudo a capacidade de *C. virens* de sobreviver e se desenvolver em dois experimentos distintos, no primeiro a espécie foi testada quanto a sua capacidade de germinação e desenvolvimento inicial em solo contaminado com petróleo, na segunda abordagem avaliamos seu desenvolvimento e testamos sua capacidade de sobrevivência em solo nas mesmas condições de contaminação com petróleo, utilizando indivíduos jovens que cresceram em um ambiente limpo. Assim, com uma abordagem combinada, testamos a viabilidade de utilização desta espécie para processos de fitorremediação a partir de sua germinação e/ou utilização de indivíduos jovens, bem como a capacidade de *C. virens* em ambos os experimentos em reduzir o petróleo do solo.

A contaminação por petróleo causa efeitos adversos nas propriedades físico-químicas e biológicas do solo, obstrui os poros do solo, reduz a porosidade e infiltração de água, dificultando a disponibilidade de nutrientes e água para as plantas (YAVARI *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2016; NDIMELE *et al.*, 2018; DEVATHA *et al.*, 2019). Esses fatores dificultam todo o processo de desenvolvimento e crescimento nas plantas, por isso, é comum ver na literatura

trabalhos que relatam redução de germinação, comprimento de raiz e parte aérea, biomassa e sobrevivência.

A exposição de sementes de *C. virens* em solo contaminado com petróleo foi realizada para caracterizar os efeitos desse contaminante nos estágios iniciais de desenvolvimento. A germinação das sementes é uma etapa muito importante do crescimento e estabelecimento das plantas, e nesta etapa mais vulnerável é onde testamos a sensibilidade particular das espécies (BANKS *et al.*, 2005). Os resultados mostraram diferença significativa na germinação de sementes entre solo controle e solo contaminado T2, e a velocidade de germinação também foi afetada de acordo com a concentração de petróleo, sendo este um fator já observado em outros estudos (ADAM *et al.*, 2002; ACHUBA, 2006; CHEN *et al.*, 2013). Naturalmente os resultados podem variar de acordo com a espécie e concentração do petróleo, *Vigna radiata* L. por exemplo, foi testada em quatro concentrações distintas de petróleo (1,0 %, 1,5 %, 2,0 % e 2,5% p/p TPH) em estudos de MASAKORALA *et al.* (2013), e apresentou taxa de germinação de 100%.

No entanto, é importante levar em consideração, que *C. virens* é uma espécie que se propaga, além das sementes, através de rizomas, e o ponto chave para o bom estabelecimento dessa espécie em locais contaminados pode estar relacionada à sua reprodução vegetativa bem-sucedida aliada a uma grande quantidade de sementes dispersas, que após germinadas conseguem se estabelecer e manter a presença e a densidade no ambiente. Muitas espécies de *Cyperus* dependem mais da reprodução assexuada do que sexuada, e este fato já é conhecido e estudado a muitos anos (THULLEN *et al.*, 1979; HORAK *et al.*, 1986; HORAK *et al.*, 1987; STOLLER *et al.*, 1987; LAPHAM *et al.*, 1990; HOLT, 1994; ABAD *et al.*, 1998; RANSOM *et al.*, 2009; KING *et al.*, 2012).

A sensibilidade de *C. virens* no experimento I foi observada no parâmetro de crescimento, biomassa e tamanho de raiz, onde o tratamento controle apresentou maiores índices comparado aos tratamentos com contaminação. No entanto no experimento II o comprimento não foi afetado, e visivelmente os indivíduos estavam semelhantes, mas o comprimento de raiz, quantidade de folhas e principalmente biomassa tiveram impacto negativo da contaminação por petróleo. Então a contaminação por petróleo não afetou as folhas no crescimento, mas sim no desenvolvimento.

Devido a toxicidade do petróleo as propriedades físico-químicas e bioquímicas do solo são deterioradas, levando a escassez de oxigênio, água e nutrientes (DUTTA *et al.*, 2017 ; AHMED *et al.*, 2018 ), restringindo o crescimento e a produtividade das plantas (HUNG *et al.*, 2020), por isso, a redução do comprimento de parte aérea, raiz e biomassa é comumente

observado em outros estudos com contaminação de petróleo (ZAMANI *et al.*, 2017; RULEY *et al.*, 2020; MORADI *et al.*, 2020; HAWROT-PAW *et al.*, 2020; GRIFONI *et al.*, 2020).

As raízes estão em contato direto com os poluentes, e por isso, além de serem consideradas importantes no ponto de vista fitotóxico das plantas, o comprometimento de seu crescimento e desenvolvimento afeta significativamente a absorção de água e nutrientes e como um ciclo, afeta a parte aérea e a biomassa das plantas. No entanto, são as raízes as responsáveis pela alteração do comportamento biológico do solo, bem como composição e até a degradação do contaminante (NEERGAARD *et al.*, 2000; ATKINSON, 2000), realizada pela própria planta ou por microrganismos que vivem na rizosfera e degradam o petróleo.

Com relação a sobrevivência nos indivíduos de *C. virens* observada em nosso experimento II, o menor índice de sobrevivência foi no tratamento T2, com um total de 75% de sobrevivência, já nos tratamentos T0 e T4 houve uma porcentagem de sobrevivência de 95% e 90% respectivamente. A morte de plantas em um ambiente contaminado por petróleo é normalmente atribuída à deficiência de água e nutrientes (CHAKRAVARTY *et al.*, 2021), porém é um fator muito importante para o estabelecimento da espécie em local contaminado. Um estudo recente de Chakravarty *et al.* (2021) com *Cyperus brevifolius* em solo contaminado com  $11,333 \pm 5,271$  g/kg de petróleo, demonstrou que 50% dos indivíduos sobreviveram após 60 dias de experimento.

A redução de concentração de petróleo do solo indica o potencial da planta em remover ou promover a remoção do poluente do solo contaminado. Nosso estudo revelou que em ambos os experimentos aqui avaliados, *C. virens* demonstrou grande potencial de redução do petróleo, chegando a uma redução de 62,03-70,05% do valor de concentração inicial no solo contaminado com 2%, e em todos os solos cultivados os valores foram maiores que seus respectivos solos não cultivados. No entanto, o potencial fitorremediador apresentou taxas menos elevadas, sendo a maior taxa observada no Experimento I com 10,56% no tratamento com 2% de petróleo. Estudos de Basumatary *et al.* (2013) utilizando *Cyperus rotundus* foi observado que após 180 dias de experimento a espécie reduziu cerca de 32,6–50,01%.

## 5 CONCLUSÃO

A germinação e desenvolvimento de *C. virens* após a germinação apresentaram resultados significativos, com taxas mais elevadas no tratamento controle em comparação com os tratamentos com contaminação em todas as variáveis observadas, no entanto no experimento

utilizando indivíduos jovens, *C. virens* apresentou rápido crescimento em todos os tratamentos, sem diferenças significativas, no entanto, na biomassa, comprimento de raiz e quantidade de folhas, foi evidenciando sinais significativos de toxicidade. A redução de petróleo do solo foi elevada em todos os vasos cultivados, no entanto com taxas de potencial de fitorremediação baixas, sendo a maior taxa observada no experimento I no tratamento com 2% de petróleo, uma redução de 10,56%. A alta capacidade de crescer e sobreviver ao ambiente contaminado desta espécie, mesmo com sinais de toxicidade, favorece a ocupação e estabelecimento de *C. virens* em locais com contaminação de petróleo, e fazem desta espécie uma forte opção para utilização em processos de fitorremediação.

## 6 REFERÊNCIAS

ABAD, Paloma *et al.* RAPD analysis of cultivated and wild yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.). **Weed Science**, v. 46, n. 3, p. 318-321, 1998.

ACHUBA, F. I. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **Environmentalist**, v. 26, p. 17-20, 2006.

ADAM, Gillian; DUNCAN, Harry. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental pollution**, v. 120, n. 2, p. 363-370, 2002.

AHMED, Fowzia; FAKHRUDDIN, A. N. M. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. **International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources**, v. 11, n. 3, p. 1-7, 2018.

ANTONIADIS, Vasileios *et al.* Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. **Earth-Science Reviews**, v. 171, p. 621-645, 2017.

ATKINSON, D. **Root characteristics: why and what to measure**. 2000.

BANKS, Margaret Katherine; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, air, and soil pollution**, v. 167, p. 211-219, 2005.

BARUAH, Plabita; BARUAH, Partha Pratim; DEKA, Suresh. Removal of hydrocarbon from crude oil contaminated soil by *Cyperus brevifolius* Rottb. **Bull Environ Pharmacol Life Sci**, v. 2, n. 6, p. 123-130, 2013.

BASUMATARY, Budhadev; BORDOLOI, Sabitry; SARMA, Hari Prasad. Crude oil-contaminated soil phytoremediation by using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 3373-3383, 2012.

BASUMATARY, Budhadev *et al.* Field note: phytoremediation of petroleum sludge contaminated field using sedge species, *Cyperus rotundus* (Linn.) and *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **International journal of phytoremediation**, v. 15, n. 9, p. 877-888, 2013.

CHAKRAVARTY, Paramita; DEKA, Hemen. Enzymatic defense of *Cyperus brevifolius* in hydrocarbons stress environment and changes in soil properties. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

CHEN, Lisha *et al.* Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. **Plant and soil**, v. 368, p. 355-363, 2013.

DE NEERGAARD, E. *et al.* **Anatomy and histology of roots and root-soil boundary**. 2000.

DEVATHA, C. P.; VISHNU VISHAL, A.; PURNA CHANDRA RAO, J. Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. **Applied Water Science**, v. 9, p. 1-10, 2019.

DUTTA, Tanushree *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds in biochar and biochar-amended soil: a review. **Gcb Bioenergy**, v. 9, n. 6, p. 990-1004, 2017.

FUNPAR. Fundação Universidade federal do Paraná. Ciência, da tecnologia e da cultura. Diagnóstico e monitoramento da cobertura vegetal da área de influência direta e indireta do vazamento de óleo da Refinaria Presidente Getúlio Vargas - REPAR, Araucária, PR: Fase I - Diagnóstico. FUNPAR, Curitiba, 2001, 82 p.

GALAL, Tarek M. *et al.* Metal uptake capability of *Cyperus articulatus* L. and its role in mitigating heavy metals from contaminated wetlands. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21636-21648, 2017.

GALAL, Tarek M. *et al.* The role of *Cyperus alopecuroides* Rottb. sedge in monitoring water pollution in contaminated wetlands in Egypt: a phytoremediation approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 23005-23016, 2021.

GAO, Pin *et al.* Structure and variation of root-associated bacterial communities of *Cyperus rotundus* L. in the contaminated soils around Pb/Zn mine sites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 58523-58535, 2021.

GRIFONI, M. *et al.* The effect of residual hydrocarbons in soil following oil spillages on the growth of *Zea mays* plants. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114950, 2020.

HALL, Jessica; SOOLE, Kathleen; BENTHAM, Richard. Hydrocarbon phytoremediation in the family Fabacea—a review. **International journal of phytoremediation**, v. 13, n. 4, p. 317-332, 2011.

HAN, G. *et al.* The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, p. 2383-2392, 2016.

HAWROT-PAW, Małgorzata *et al.* Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16436, 2020.

HUSSAIN, Imran *et al.* Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: improvement opportunities and field applications. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, p. 202-219, 2018.

HOLT, Jodie S. Genetic variation in life history traits in yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) from California. **Weed Science**, v. 42, n. 3, p. 378-384, 1994.

- HORAK, Michael J.; HOLT, Jodie S. Isozyme variability and breeding systems in populations of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Science**, v. 34, n. 4, p. 538-543, 1986.
- HORAK, Michael J.; HOLT, Jodie S.; ELLSTRAND, Norman C. Genetic variation in yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Science**, v. 35, n. 4, p. 506-512, 1987.
- HUNG, Chang-Mao *et al.* Activation of percarbonate by water treatment sludge-derived biochar for the remediation of PAH-contaminated sediments. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114914, 2020.
- KING, Jonathan R. *et al.* Seed biomass production and germination rates of *Cyperus entriarianus*. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 1, p. 76-85, 2012.
- LAPHAM, Jon; DRENNAN, Donald SH. The fate of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) seed and seedlings in soil. **Weed Science**, v. 38, n. 2, p. 125-128, 1990.
- MASAKORALA, Kanaji *et al.* Effects of petroleum hydrocarbon contaminated soil on germination, metabolism and early growth of green gram, *Vigna radiata* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 91, p. 224-230, 2013.
- MORADI, Babak *et al.* Assessment of oxidative stress response genes in *Avicennia marina* exposed to oil contamination–Polyphenol oxidase (PPOA) as a biomarker. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00565, 2020.
- NAWAZ, Tahira *et al.* Anatomical and physiological adaptations in aquatic ecotypes of *Cyperus alopecuroides* Rottb. under saline and waterlogged conditions. **Aquatic botany**, v. 116, p. 60-68, 2014.
- NDIMELE, Prince Emeka *et al.* Remediation of crude oil spillage. In: **The political ecology of oil and gas activities in the Nigerian aquatic ecosystem**. Academic Press, 2018. p. 369-384.
- RANSOM, Corey V.; RICE, Charles A.; SHOCK, Clinton C. Yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) growth and reproduction in response to nitrogen and irrigation. **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 21-25, 2009.

RULEY, J. A. *et al.* Enhancing the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils in the Sudd wetlands, South Sudan, using organic manure. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2020, p. 1-8, 2020.

SHAHSAVARI, Esmail *et al.* Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-14, 2013.

STOLLER, E. W.; SWEET, R. D. Biology and life cycle of purple and yellow nutsedges (*Cyperus rotundus* and *C. esculentus*). **Weed Technology**, v. 1, n. 1, p. 66-73, 1987.

TANG, Jingchun *et al.* Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 5, p. 845-851, 2011.

THULLEN, R. J.; KEELEY, P. E. Seed production and germination in *Cyperus esculentus* and *C. rotundus*. **Weed Science**, v. 27, n. 5, p. 502-505, 1979.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

XIE, Wenjun *et al.* The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 24438-24446, 2017.

YAVARI, Sara; MALAKAHMAD, Amirhossein; SAPARI, Nasiman B. A review on phytoremediation of crude oil spills. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-18, 2015.

ZAMANI, Sahar *et al.* Evaluation the growth potential of artichoke (*Synara scolymus* L.) and Milk thistle (*Sylibum marianum* L.) in petroleum-contaminated Soil. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 8, n. 1, 2018.

## CAPÍTULO III

### EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO EM *Typha domingensis* PERS. (TYPHACEAE)

#### 1 INTRODUÇÃO

O aumento da industrialização global, juntamente com a utilização crescente de petróleo, mostra um desafio o controle de contaminações advindos de sua extração, produção e transporte no mundo todo (VARJANI *et al.*, 2017; HUNG *et al.*, 2020). O petróleo é formado em sua maioria por compostos tóxicos, e oferece perigo e possui efeitos nocivos tanto nos seres vivos quanto em seus ambientes. Tais efeitos têm sido estudados a décadas, bem como alternativas que possam colaborar em uma neutralização dos ambientes contaminados (OSSE *et al.*, 2018; UKALSKA-JARUGA *et al.*, 2020).

A tendência dos últimos anos é a procura por alternativas sustentáveis, e que além disso envolva uma tecnologia eficaz e barata para a remediação dos ambientes afetados. Nas plantas, o petróleo normalmente apresenta efeitos negativos, como baixa germinação, redução de crescimento ou rendimento e até a morte (XIE *et al.*, 2018; Hung *et al.*, 2020), sendo que tais efeitos dependem da composição do petróleo, concentração e espécies de plantas presentes no local (SHAHSVARI *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2017).

No entanto, tecnologias utilizando algumas plantas para remediação de solo tem sido utilizada em pesquisas por todo o mundo, e consiste na aplicação de algumas espécies específicas de plantas que detém o potencial de reduzir ou eliminar o contaminante (XIE *et al.*, 2018). A remediação de solos contaminados por petróleo pode ser realizada através da fitorremediação, técnica que consiste na utilização do sistema natural das plantas para reduzir ou eliminar o contaminante do ambiente (CUNNINGHAM *et al.*, 1995; NDIMELE, 2010). A remediação pode ocorrer através de alguns mecanismos, como: (i) fitoestabilização, aprisionamento do poluente nas raízes da planta; (ii) fitoextração, absorção e armazenamento do contaminante nos tecidos da planta; (iii) fitovolatilização, absorção e bioconversão do poluente a compostos voláteis, eliminados nos processos de transpiração da planta; e (iv) fitoestimulação (ou rizodegradação), aumento da oxigenação do solo e produção de exsudatos pelas raízes, favorecendo o crescimento de microorganismos que degradam o contaminante (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

Porém, poucos estudos têm investigado os efeitos da contaminação do petróleo na área contaminada, sendo que a maior parte dos estudos são realizadas em laboratório com plantas cultivadas em soluções nutritivas e ambiente controlado, poucos são os estudos em campo (HUNT *et al.*, 2019).

Em 16 de julho de 2000, na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), localizada no município de Araucária (Região Metropolitana de Curitiba, Paraná - Brasil), ocorreu um dos maiores desastres ambientais brasileiros. A partir da ruptura de um oleoduto, vazaram cerca de quatro milhões de litros de óleo cru que escoaram por uma encosta e atingiram corpos d'água próximos, contaminando banhados adjacentes (Maranho *et al.* 2006; Maranho *et al.* 2009), ocasionando a morte da vegetação quase que totalmente.

Após doze anos do acidente, ocorreu uma notável modificação florística na área, houve um aumento na cobertura vegetal da espécie *Typha domingensis*, que antes do acidente já existia na área com uma cobertura aproximada de 5,8%, posteriormente ao acidente essa cobertura passou a ser 85% (RP Sousa unpubl. res.), mesmo com o petróleo em altas concentrações no local, com valores entre 200 e 6.400 mg/kg de solo.

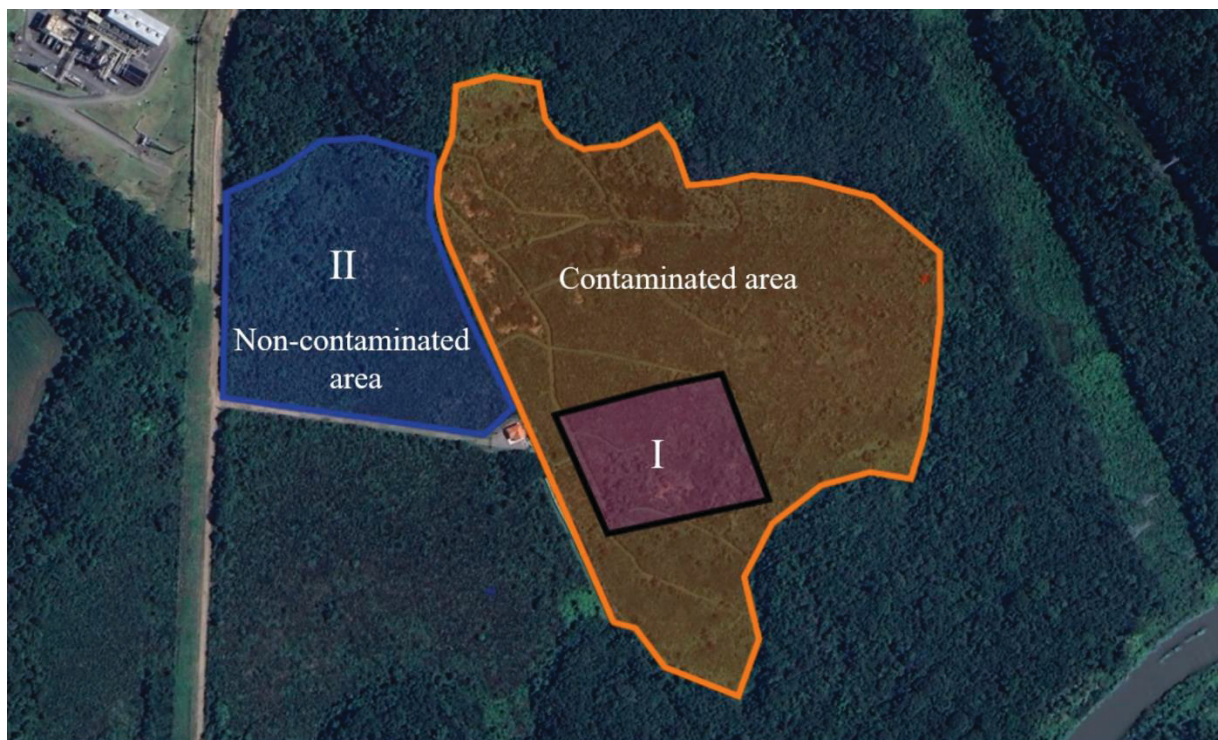
*T. domingensis* é uma planta que apresenta muitos pontos favoráveis para utilização em locais degradados, da família Typhaceae, é perene, de grande porte, rizomatosa e amplamente distribuída no mundo. Apresenta excelentes resultados na remediação de metais pesados e conseguem crescer e se estabelecer bem em habitats com altos níveis de elementos tóxicos (KLINK *et al.*, 2013; KUMARI *et al.*, 2015 ; PARZYCH *et al.*, 2016; BONANNO e CIRELLI, 2017; YANG e SHEN, 2020). A partir dessas questões, pretendemos entender quais adaptações anatômicas *T. domingensis* adotou para sobreviver ao ambiente, e se tem capacidade de absorver o petróleo do solo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado em uma área situada na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), localizada no município de Araucária, Paraná - Brasil, entre as coordenadas geográficas 25°35'17.2"S e 49°20'56.7"O (figura 1), onde indivíduos de *T. domingensis* foram coletados em dois pontos para análise, um ponto sem contaminação de petróleo (Ponto I) e um ponto com a maior concentração de petróleo da área contaminada (Ponto II) (Figura 1), com concentração de 6.400 mg/kg de solo (Fig. 1).

**Figura 2.** Imagem aérea da área atingida por petróleo na Repar, Araucária, Paraná - Brasil. Locais amostrais do estudo: A localização da área I refere-se ao local de maior concentração de petróleo da área do acidente (área contaminada); e II área controle adjacente à área contaminada. Fonte: Google Earth.



### 2.2 Amostras vegetais, análise morfológica e anatômica

Para análise morfológica foram analisados 20 indivíduos da área não contaminada e 20 indivíduos da área contaminada. Foi quantificado o número de folhas de cada indivíduo e o comprimento das cinco maiores folhas de cada indivíduo foi medido.

Foram coletadas amostras de folhas e raízes, de indivíduos de solo controle (área I) e solo contaminado (Área II), para as análises anatômicas. As amostras foram fixadas em FAA

50% (Johansen 1940) e em Karvovsky (Karnovsky 1965), emblocadas em historresina Leica, seccionadas em micrótomo, e coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964).

Para a detecção de compostos fenólicos e de lipídeos totais nas folhas foram realizados os teste histoquímicos com cloreto férrico (Johansen 1940) e Sudam III (Sass 1951).

### 2.3 Análise de absorção de petróleo

Para detectar a presença de compostos xenobióticos no interior dos tecidos das raízes foi utilizada metodologia proposta por Wild *et al.* (2005). Os cortes foram montados em lâminas e analisadas em microscopia de fluorescência nos filtros RPF e Texas Red para observação de autofluorescência desses compostos.

Para analisar a presença de hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno) voláteis, folhas de *T. domingensis*, de ambas as áreas estudadas, foram submetidas a Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Ionização por Chama (CG-DIC). As amostras foram obtidas por headspace automatizado com temperatura de 80°C e tempo de equilíbrio de 30 minutos. A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições de análises: coluna capilar de sílica fundida Rtx-1 (30 m x 0,32 mm x 3,0 µm). O gás hélio foi aplicado como gás de arraste com vazão de 1,5 ml min<sup>-1</sup>, estando o injetor à 250°C e o detector à 280°C. A rampa de aquecimento empregada na análise tinha temperatura inicial de 50°C (após 1 minuto) com aquecimento de 8°C por minutos até 200 °C.

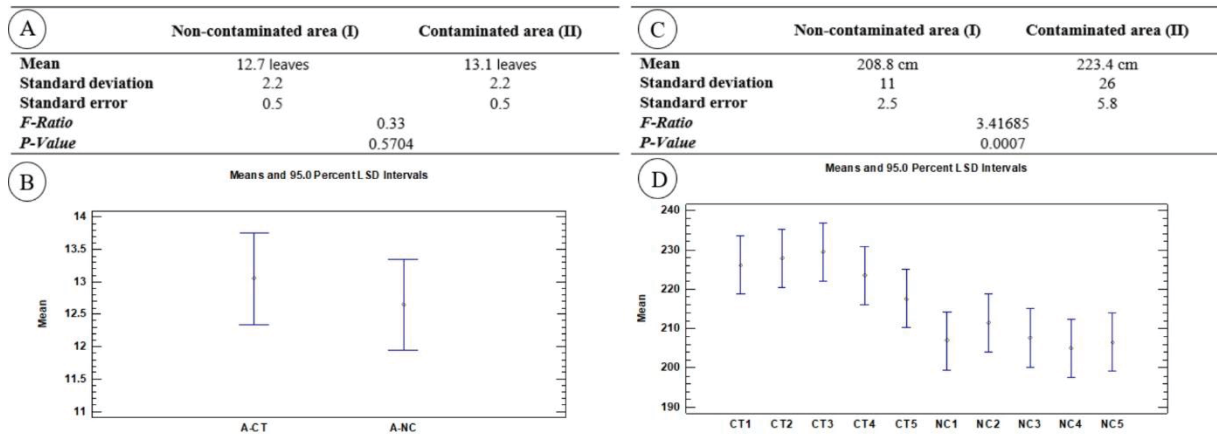
### 2.4 Análise estatística

Teste de homogeneidade das variâncias de Levene ( $p < 0.05$ ) foi aplicado para verificar se havia diferença entre o número de folhas e o comprimento das cinco maiores folhas entre os dois ambientes estudados ao nível de confiança de 95%

## 3 RESULTADOS

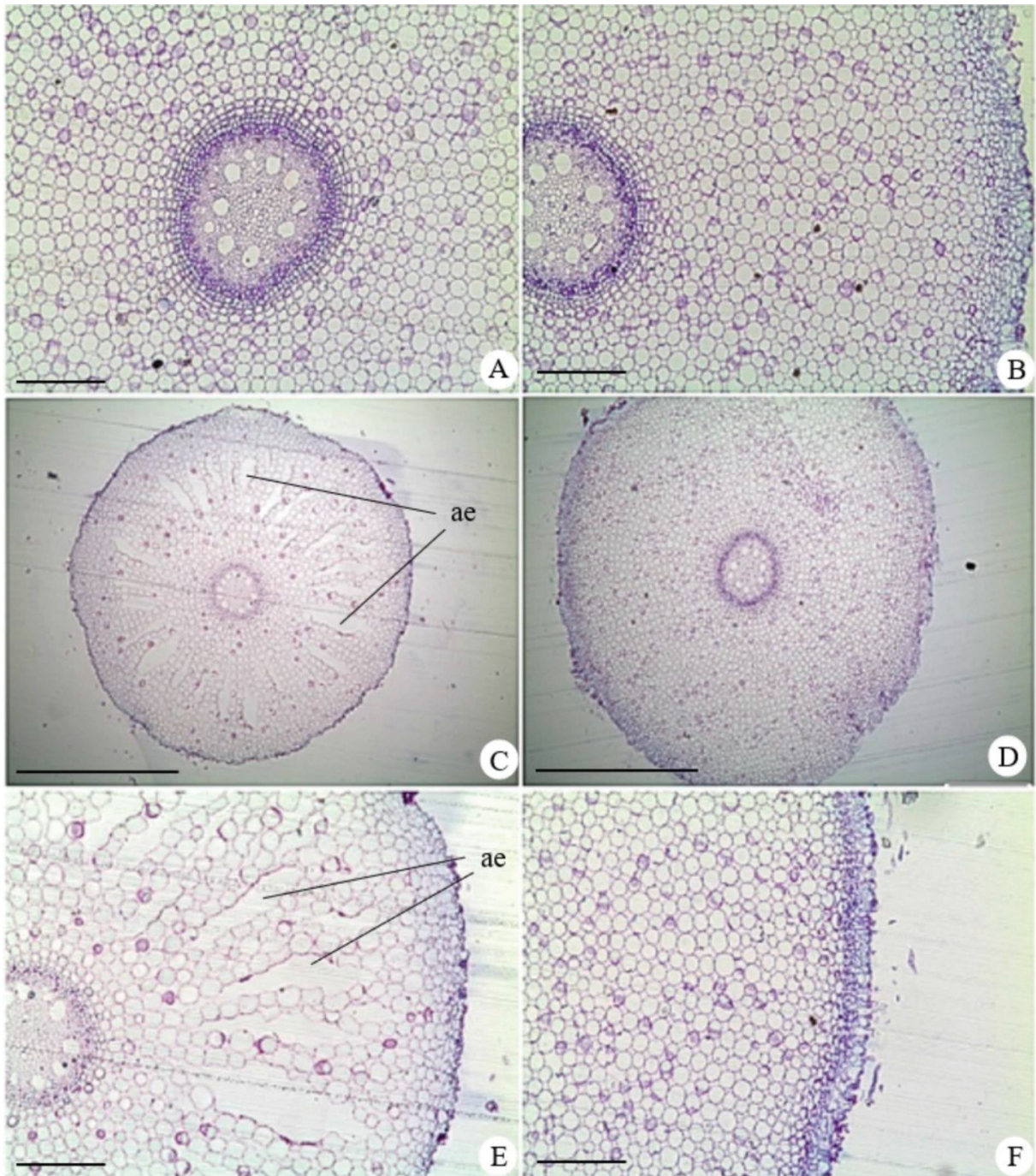
A diferença da quantidade de número de folhas por indivíduo das duas áreas estudadas não apresentou um valor significativo ( $P < 0,05$ ) (Figura 2A). No entanto, no comprimento das folhas dos cinco maiores indivíduos, foi observado uma alteração significativa entre a área controle e a área com contaminação de petróleo ( $P > 0,05$ ) (Figura 2B-C-D). Neste resultado foi possível observar um aumento de comprimento dos indivíduos da área contaminada.

**Figura 2.** Resultado das análises morfológicas de *T. dominguesnis* de área não contaminada (I) e área contaminada com petróleo (II). A. Valores de P e da razão F para a análise de comparação de médias do número de folhas por indivíduo da área não contaminada e área contaminada. B. Gráfico da média do comprimento da folha das cinco folhas maiores por indivíduo nas áreas CT (contaminada com petróleo) e NC (não contaminada). C. Valores de P e da razão F para a análise de comparação de médias do comprimento, da folha, das cinco folhas maiores de cada indivíduo das áreas de maior concentração de petróleo e de menor concentração. D. Gráfico da média do comprimento da folha das cinco folhas maiores por indivíduo nas áreas CT (contaminada com petróleo) e NC (não contaminada).



Na porção distal de *T. domingensis*, as características apresentadas são: Epiderme unisseriada; região cortical externa composta por células justapostas e ausência de drusas ou ráfides; e medula, composta por vasos do xilema e parênquima medular (Fig. 3A-B). Nos indivíduos coletados na área contaminada foi observado a presença de aerênquimas através do aumento dos espaços intercelulares e do colapso de células (Fig. 3C-E).

**Figura 3.** Imagens de raízes de *T. domingensis* em solo contaminado (A, C e E) e não contaminado (B, D e F) de modo comparativo, evidenciando o aerênquima (ae) formado nas raízes do local contaminado (C e E). Barras de escala: A, B, E e F 200 $\mu$ m; C e D 500 $\mu$ m.

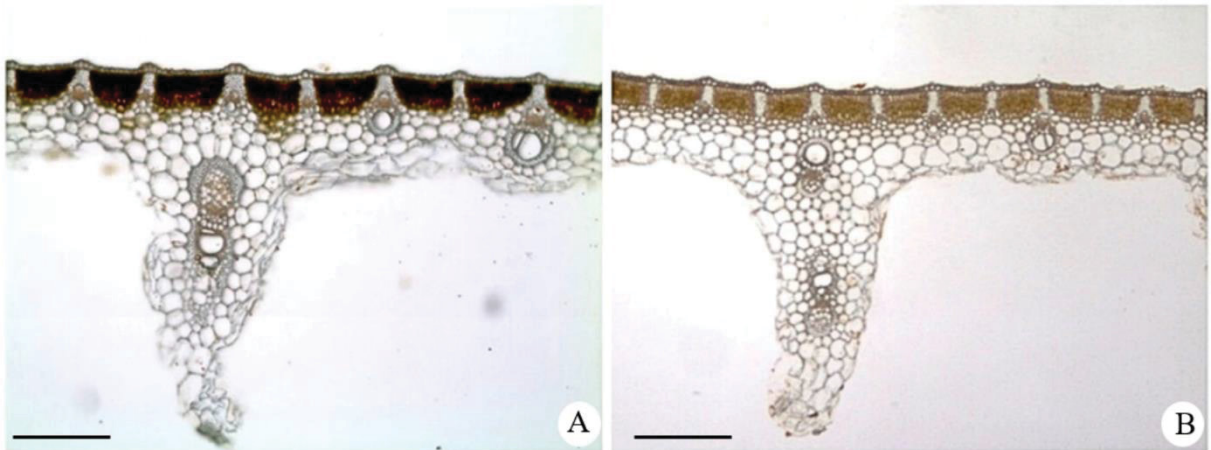


As folhas de ambos os locais apresentam epiderme unisseriada e fibras nas camadas subepidérmicas, em ambas as faces, o parênquima paliçádico nas duas faces, e internamente a ele há o parênquima clorofiliano regular, e a presença de aerênquimas. Os feixes vasculares estão dispostos nas regiões onde encontra-se o parênquima regular, alguns feixes localizaram-

se próximos ao parênquima paliçádico, e são conectados à epiderme por uma bainha de fibras. Entre as folhas de ambos os locais estudados não foram observadas diferenças anatômicas.

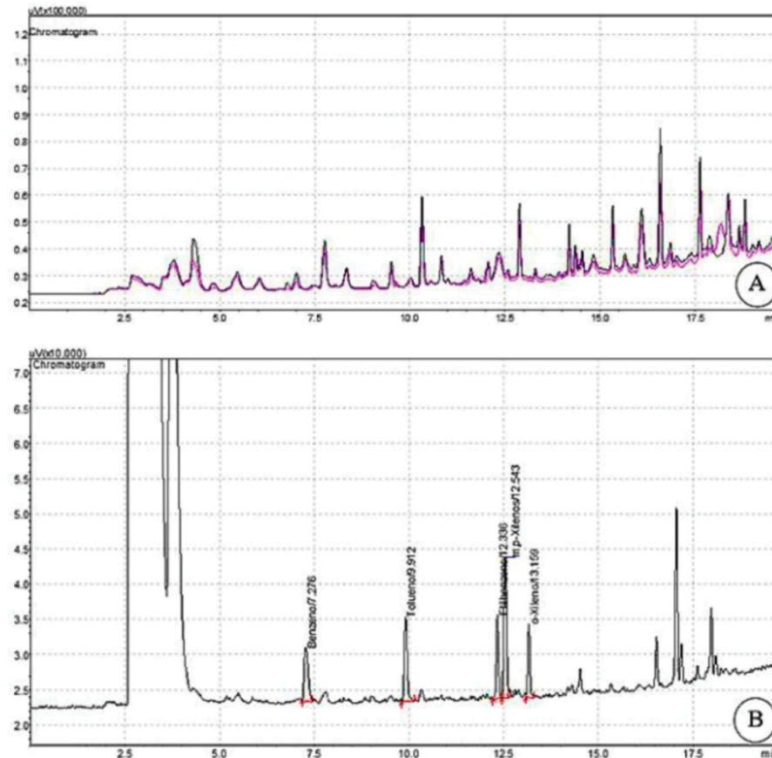
O teste histoquímico com cloreto férrico detectou uma presença maior de compostos fenólicos no parênquima nos indivíduos de local contaminado (Fig. 4A), mas o teste histoquímico para a detecção de lipídeos totais, Sudan III (Sass 1951), não detectou a presença desses compostos nos tecidos vegetais das folhas de *T. domingensis*

**Figura 4.** Imagens de folhas de *T. dominguensis* após teste histoquímico com cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos. A. Folha de local contaminado evidenciando a presença de compostos fenólicos na epiderme. B. Folha de local não contaminado. Barras de escala: 200  $\mu$ m



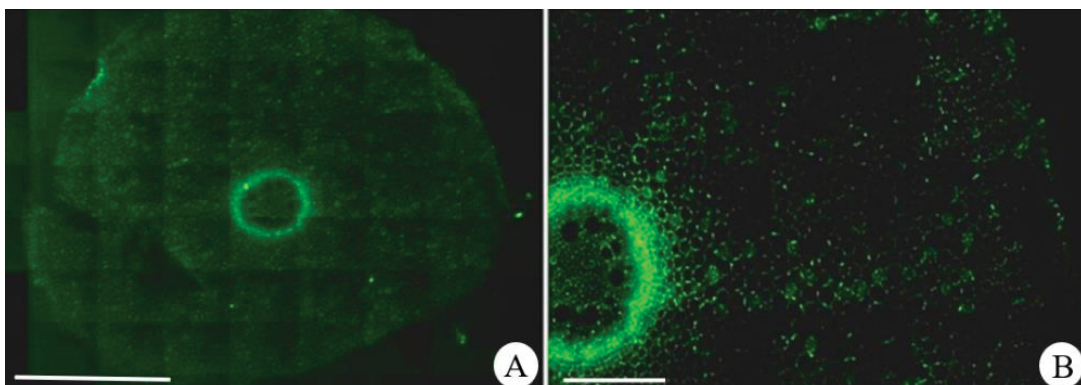
A análise de cromatografia para os padrões de compostos monoaromáticos BTEX, não evidenciaram a presença desses compostos nas folhas de indivíduos em solo contaminado com petróleo (Fig. 5B). Inclusive na comparação entre as amostras, é possível observar que os indivíduos de locais contaminados (linhas rosas) e os indivíduos de locais não contaminado (linhas pretas) são similares (Fig.5A).

**Figura 5.** Resultados do teste de cromatografia gasosa para detecção de compostos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno) em folhas de *T. domingensis*. A. Sobreposição das amostras de local não contaminado (em rosa) com amostras de local contaminado (em preto). B. Resultado negativo para padrões BTEX.



A análise em microscopia de fluorescência revelou a ausência de compostos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, houve apenas a autofluorescência das paredes celulares na região do cilindro vascular das raízes (Fig. 6A-B).

**Figura 6.** Imagem da porção distal de raiz de *T. domingensis* coletada em um local com contaminação de petróleo observada com microscopia de fluorescência, evidenciando apenas a autofluorescência das paredes celulares na região do cilindro vascular, sem evidências de absorção de compostos xenobioticos. Barras de escala: A. 500µm; B. 200µm



## 4 DISCUSSÃO

A utilização de plantas para remediar um ambiente tem sido já muito utilizada em locais contaminados, mas a eficiência desta utilização varia de acordo com a espécie, já que podem demonstrar diferentes níveis de tolerância e diferentes respostas à contaminação (SHAHSAVARI *et al.*, 2013; ZENGEL *et al.*, 2015; GERHARDT *et al.*, 2017), portanto, é importante também avaliar as espécies em diferentes circunstâncias, e estudar essas espécies no ambiente contaminado onde germinaram e se desenvolveram de forma espontânea é uma alternativa para analisar *in situ* as respostas morfológicas e anatômicas.

Após a contaminação por petróleo, as condições físicas, químicas e biológicas do solo são alteradas. A característica hidrofóbica do petróleo faz com que a água não se espalhe de forma homogênea, diminuindo a disponibilidade de água e a condutividade hidráulica, resultando em um estresse hídrico para as plantas (DE FARIAS *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2014). A dificuldade em absorver água normalmente gera problemas na diminuição de fotossíntese e como consequência, a diminuição do crescimento das plantas e redução de biomassa, sendo este um resultado constante em alguns estudos (CUI *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2017; PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; ODUKOYA *et al.*, 2019; DUAN *et al.* 2023).

No entanto, observamos um aumento significativo no comprimento dos indivíduos que cresceram na área contaminada, enquanto o número de folhas não foi afetado. É possível, então, que a alta concentração de petróleo tenha aumentado a taxa de desenvolvimento. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com *Ricinus communis*, no qual parâmetros como altura da planta, perímetro do caule, área foliar, massa fresca e seca e comprimento da raiz melhoraram em baixas concentrações de petróleo (1%) em comparação com o tratamento controle (Vwioko *et al.* 2005).

Esses fatores indicam que essas espécies que apresentam melhora em seus parâmetros em um solo contaminado, podem estar utilizando componentes orgânicos para produzir algum metabolito intermediário que acaba estimulando o crescimento e desenvolvimento (KVESITADZE *et al.*, 2009 ; AL-THANI *et al.*, 2020). Esses metabolitos intermediários são pequenas unidades de moléculas orgânicas que podem ser incorporadas nas plantas após o processo de fitotransformação, que é um processo realizado por algumas espécies capazes de secretar algumas substâncias para fora do sistema radicular que degradam os compostos orgânicos como o petróleo, e após essa degradação externa, essas pequenas moléculas se tornam metabolitos úteis para as plantas (YASSEN, 2014).

Outra explicação possível para este fato é a rizodegradação, mecanismo que tem como foco principal a atividade das raízes, que colaboram com o aumento da atividade bacteriana e fúngica e foi descrito originalmente por Lorenz Hiltner em 1904 (CURL *et al.*, 2012). Essa grande relação simbiótica torna a área da rizosfera um local de troca, onde a planta fornece compostos para bactérias e fungos, enquanto recebe outros compostos que otimizam seu crescimento (SUSARLA *et al.*, 2002; GERHARDT *et al.*, 2009). Inclusive, muitos subprodutos de bactérias degradadoras de petróleo, por exemplo, acabam virando produto disponível e assimilável para plantas, processo este conhecido como fistoestimulação, que quando eficiente, colabora para uma modulação hormonal e de produção de metabolitos da própria planta, levando a uma produção maior de biomassa e crescimento (FINKEL *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022), explicando inclusive, os maiores índices de crescimento dos indivíduos em solo contaminado obtidos em nosso trabalho, sendo este um parâmetro importante a ser considerado.

Além das alterações morfológicas, o petróleo também pode modificar aspectos internos das plantas, como fisiologia e anatomia (OLARANONT *et al.*, 2018). O estresse abiótico causado pelo petróleo pode aumentar a produção de metabolitos secundários como os compostos fenólicos, que servem como um suporte protetor para as plantas, para que possam crescer e se desenvolver normalmente sob diferentes estresses (ZAYNAB *et al.*, 2018), como estresses ambientais e nutricionais (TRAN *et al.*, 2020) e poluentes orgânicos (WAHMAN *et al.*, 2022; KÖSESAKAL *et al.*, 2023). Os compostos fenólicos no geral são relacionados à processos antioxidantes, moleculares, bioquímicos, fisiológicos e de defesa (KIANI *et al.*, 2021). As plantas aumentam a concentração desses compostos fenólicos para evitar estresse oxidativo causado pela contaminação.

No teste histoquímico no presente estudo foi observada a presença de compostos fenólicos nas folhas de *T. domingensis*. Esse resultado indica que, apesar de dominar a área contaminada com petróleo, *T. domingensis* pode sofrer um certo grau de estresse causado pelo poluente, visto que a maioria dos fenóis são considerados metabolitos de estresse (SHEPPARD *et al.*, 1976; STRACK *et al.*, 2003). A presença de fenólicos pode estar funcionando como um antioxidante para eliminação dos efeitos negativos do petróleo, visto que *T. domingensis* não apresentou resultados de toxicidade nos parâmetros estudados. Resultado esse observado em outros estudos que utilizaram desta técnica para analisar outras espécies em um ambiente com petróleo (BONA *et al.*, 2011; BALLIANA *et al.*, 2017).

A presença de compostos fenólicos em espécies submetidas a um ambiente contaminado por petróleo também pode estar relacionada ao aumento da resistência à contaminação. Estudos

de Malallah *et al.* (1998) concluíram que baixos níveis de fenóis são associados a uma baixa resistência à contaminação por petróleo em *Sonchus oleraceus*, *Launaea mucronata* e *Picris babylonica*, enquanto Bona *et al.* (2011) relacionaram a presença de altos teores de fenóis ao aumento da resistência de *Sebastiania commersoniana* ao petróleo.

Em nível anatômico os contaminantes podem afetar as plantas de diferentes formas, podendo variar de acordo com o contaminante e a concentração. Em *T. latifolia* os metais pesados podem alterar toda a estrutura da epiderme dos órgãos vegetativos. Em estudos de Hadad *et al.* (2010) *T. dominguensis* apresentou alterações anatômicas em resposta a toxicidade de metais pesados, como aumento de estela e dos vasos de xilema, tendo uma influência positiva na condutância hidráulica das raízes, relacionada também a uma resposta adaptativa para melhorar a absorção dos metais pesados, que se encontrava em maiores concentrações nas plantas com maior número de vasos de condução.

Embora outros estudos demonstrem que a toxicidade do petróleo possa causar modificações significativas, como número de estômatos reduzido, redução e compactação de células, deformações estruturais; enegrecimento de epiderme, córtex, feixes vasculares e medula, diminuição do comprimento dos feixes vasculares e cutícula espessa (BARUAH *et al.*, 2014; PUNWONG *et al.*, 2017; DA SILVA CORREA *et al.*, 2022), neste presente estudo foi possível observar apenas a presença de aerênquima no mesofilo dos indivíduos coletados no ambiente contaminado.

A presença de aerênquima em *T. dominguensis* mostra uma adaptação para armazenamento de oxigênio em seu interior, frente ao ambiente anóxico causado pelo petróleo para sobreviver nas condições de estresse. É uma adaptação registrada em outras espécies submetidas a contaminação com petróleo, como *Sebastiania commersoniana* e *Canavalia ensiformis* (BONA *et al.*, 2011; BALLIANA *et al.*, 2017), sendo considerada uma estratégia vantajosa para sobreviver à contaminação.

Para entender a ausência de modificações significativas de toxicidade nos indivíduos de *T. dominguensis* e verificar se é uma espécie capaz de absorver o petróleo do solo, utilizamos metodologia de absorção de compostos xenobióticos nas plantas a partir da técnica de fluorescência, que é uma ferramenta útil nas avaliações de fitorremediação, pois além de avaliar se a espécie estudada é capaz de absorver os compostos xenobióticos, permite entender em qual estrutura da raiz a absorção está limitada, como apenas superficialmente ou no interior de seus vasos de condução (WILD *et al.*, 2005). Essa análise em microscopia de fluorescência, segundo metodologia de Wild *et al.* (2005), denotaria fluorescência azul na presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Em nossos estudos as raízes de *T. dominguensis* coletadas do solo

contaminado não apresentaram a fluorescência desses compostos. Nos estudos de Wild *et al.* (2005), pioneiro dessa técnica, foi observado antraceno e fenantreno se movendo de maneira simplástica nas células epidérmicas para entrar nas células do córtex, e ambos os contaminantes chegaram a passar através das células do córtex de *Zea mays* e *Triticum aestivum*.

A ausência de fluorescência nas raízes juntamente com os resultados de cromatografia gasosa, onde também não foi evidenciado a presença de compostos xenobioticos nas folhas dos indivíduos do solo contaminado com petróleo, corrobora ao fato de que *T. domingensis* não absorve e não armazenar o petróleo em seus tecidos.

No entanto, o gênero *Typha* é considerado um dos mais promissores para fitorremediação (GAZZONI *et al.*, 2010; BONANNO *et al.*, 2017; SESIN *et al.*, 2021). Um estudo comparativo de Bonanno *et al.* (2017) avaliando *T. domingensis*, *T. latifolia* e *T. angustifolia* sob estresse de metais pesados, concluiu que as características compartilhadas dessas espécies, como alta tolerância a condições tóxicas, grande produção de biomassa e crescimento rápido, fazem das espécies de *Typha* uma das melhores opções para fitorremediação de ambientes.

A capacidade de *T. domingensis*, *T. latifolia* e *T. angustifolia* de acumular metais pesados é extensamente observada em outros estudos (BONANNO *et al.*, 2010; CHANDRA *et al.*, 2010; SALEM *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; MORARI *et al.*, 2015; KLINK, 2017; HEJNA *et al.*, 2020; ABBAS *et al.*, 2021; Haghazari *et al.*, 2023). *T. latifolia* é capaz ainda de remover e degradar diesel e biodiesel em 60% e 40% respectivamente (GAZZONI *et al.*, 2010), e *T. domingensis* apresentou alta capacidade de fitorremediação petróleo em um estudo de Rehman *et al.*, (2019), onde associada a microrganismos promoveu a degradação de 90% de petróleo, porém a degradação não foi eficiente nos tratamentos utilizando apenas a planta ou apenas os microrganismos, corroborando com nosso estudo em que demonstramos que *T. domingensis* não possui potencial de absorver e armazenar petróleo.

Levando em conta a recomendação de alguns autores, é possível classificar a concentração de petróleo em baixo (0,5, 1 e 2%), médio (3 e 5%), alto (até 10%) e muito alto (15%) (SHARONOVA *et al.*, 2012; POTASHEV *et al.*, 2014; KAUR *et al.*, 2017). Segundo esta escala, *T. domingensis* utilizada em nosso estudo está em um ambiente com alta concentração de petróleo, e apesar de demonstrar alterações como presença de compostos fenólicos e aerênquimas, se estabeleceu de forma dominante na área contaminada. O fato de *T. dominguensis* não absorver e não armazenar petróleo em seus tecidos pode ser ainda responsável pelo não comprometimento de seu crescimento e desenvolvimento, porém é uma espécie que apresenta forte interações com microrganismos, sendo este o ponto chave para

promoção da degradação de petróleo do solo e utilização de subprodutos para otimização do seu bom desenvolvimento.

## 5 CONCLUSÃO

Verificamos que plantas de *T. domingensis* crescendo em solo contaminado com petróleo não apresentaram alterações no tamanho e quantidade de folhas em comparação com aquelas encontradas em solo não contaminado. Apesar de apresentarem compostos fenólicos e aerênquima em suas raízes, não foram encontradas outras alterações estruturais anatômicas graves. Embora *T. domingensis* não absorva petróleo, acreditamos que ela use subprodutos ou relações simbióticas para o seu desenvolvimento e crescimento. Portanto, recomendamos para estudos futuros os microorganismos presentes no solo e raízes de *T. domingensis* em ambientes contaminados, bem como uma avaliação da absorção de subprodutos resultantes da degradação do petróleo nesta espécie.

## 6 REFERÊNCIAS

ABBAS, Naeem *et al.* Phytoremediation potential of *Typha latifolia* and water hyacinth for removal of heavy metals from industrial wastewater. **N. Abbas, MT Butt, MM Ahmad, F. Deeba and N. Hussain. Phytoremediation potential of Typha latifolia and water hyacinth for removal of heavy metals from industrial wastewater. Chemistry International**, v. 7, n. 2, p. 103-111, 2021.

AL-THANI, R. F.; YASSEEN, B. T. Phytoremediation of polluted soils and waters by native Qatari plants: Future perspectives. **Environmental Pollution**, v. 259, p. 113694, 2020.

BALLIANA, A. G. *et al.* Development of *Canavalia ensiformis* in soil contaminated with diesel oil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 979-986, 2017.

BARUAH, Plabita *et al.* Effect of crude oil contamination on the chlorophyll content and morpho-anatomy of *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 12530-12538, 2014.

BONA, Cleusa *et al.* Effect of diesel contaminated soil on root and leaf of *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) and *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 277-285, 2011.

BONANNO, Giuseppe; CIRELLI, Giuseppe Luigi. Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 92-101, 2017.

BONANNO, G.; GIUDICE, R. Lo. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. **Ecological indicators**, v. 10, n. 3, p. 639-645, 2010.

CHANDRA, Ram; YADAV, Sangeeta. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1277-1284, 2010.

CUI, B. X. *et al.* Response of growth and antioxidant protect system of *Caragana korshinskii* to oil-contaminated soil. **Pratacultural. Sci**, v. 31, p. 632-640, 2014.

CUNNINGHAM, Scott D.; LEE, C. R. Phytoremediation: Plant-based remediation of contaminated soils and sediments. **Bioremediation: Science and applications**, v. 43, p. 145-156, 1995.

CUNNINGHAM, Scott D. *et al.* Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in agronomy**, v. 56, n. 1, p. 55-114, 1996.

CURL, Elroy A.; TRUELOVE, Bryan. **The rhizosphere**. Springer Science & Business Media, 2012.

DA SILVA CORREA, Hauane *et al.* Effects of oil contamination on plant growth and development: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 29, p. 43501-43515, 2022.

DE FARIAS, Vanessa *et al.* Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, p. 10-22, 2009.

DUAN, Qiuxiao *et al.* The effects of petroleum contaminated soils on the growth, gas exchange and antioxidative level of sea-buckthorn. **Plant and Soil**, p. 1-16, 2023.

FINKEL, Omri M. *et al.* A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome. **Nature**, v. 587, n. 7832, p. 103-108, 2020.

GAZZONI, Bruna Francielle *et al.* Tratamento de água residual contendo diesel de petróleo e B2 utilizando *Typha latifolia*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, 2010.

GERHARDT, Karen E.; GERWING, Perry D.; GREENBERG, Bruce M. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. **Plant Science**, v. 256, p. 170-185, 2017.

GERHARDT, Karen E. *et al.* Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. **Plant science**, v. 176, n. 1, p. 20-30, 2009.

GOMES, Marcos Vinícius Teles *et al.* Phytoremediation of water contaminated with mercury using *Typha domingensis* in constructed wetland. **Chemosphere**, v. 103, p. 228-233, 2014.

HADAD, Hernán Ricardo *et al.* Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, p. 666-675, 2010.

HAGHNAZAR, Hamed *et al.* Phytoremediation capability of *Typha latifolia* L. to uptake sediment toxic elements in the largest coastal wetland of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 188, p. 114699, 2023.

HEJNA, Monika *et al.* Bioaccumulation of heavy metals from wastewater through a *Typha latifolia* and *Thelypteris palustris* phytoremediation system. **Chemosphere**, v. 241, p. 125018, 2020.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, Herminia Alejandra *et al.* Diesel effects on root hydraulic conductivity and morphological changes of the vascular cylinder in *Medicago sativa*. **Environmental and experimental botany**, v. 105, p. 1-9, 2014.

HILTNER, Lorenz. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arbeiten der deutschen landwirtschaftlichen gesellschaft**, v. 98, p. 59, 1904.

HUNG, Chang-Mao *et al.* Biochar derived from red algae for efficient remediation of 4-nonylphenol from marine sediments. **Chemosphere**, v. 254, p. 126916, 2020.

HUNT, Lillian J. *et al.* Petroleum hydrocarbon (PHC) uptake in plants: A literature review. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 472-484, 2019.

JOHANSEN, Donald Alexander. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.

KARNOVSKY, Morris, J.. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. cell Biol**, v. 27, p. 1A-149A, 1965.

KAUR, Navjot *et al.* A review of germination and early growth as a proxy for plant fitness under petrogenic contamination—knowledge gaps and recommendations. **Science of The Total Environment**, v. 603, p. 728-744, 2017.

KIANI, Razieh; ARZANI, Ahmad; MIRMOHAMMADY MAIBODY, S. A. M. Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 646221, 2021.

KLINK, Agnieszka. A comparison of trace metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Phragmites australis*: implication for phytoremediation. **Environmental science and pollution research**, v. 24, p. 3843-3852, 2017.

KLINK, Agnieszka *et al.* Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L.(cattail) and their potential use in bioindication. **Limnologica**, v. 43, n. 3, p. 164-168, 2013.

KÖSESAKAL, Taylan; SEYHAN, Müge. Phenanthrene stress response and phytoremediation potential of free-floating fern *Azolla filiculoides* Lam. **International Journal of Phytoremediation**, v. 25, n. 2, p. 207-220, 2023.

KUMARI, Menka; TRIPATHI, B. D. Efficiency of *Phragmites australis* and *Typha latifolia* for heavy metal removal from wastewater. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 112, p. 80-86, 2015.

KVESITADZE, E.; SADUNISHVILI, T.; KVESITADZE, G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. **World Acad Sci Eng Technol**, v. 55, n. 6, p. 458-468, 2009.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, José *et al.* Screening of Phosphate Solubilization Identifies Six *Pseudomonas* Species with Contrasting Phytostimulation Properties in *Arabidopsis* Seedlings. **Microbial Ecology**, p. 1-15, 2022.

MALALLAH, G. *et al.* Impact of oil pollution on some desert plants. **Environment International**, v. 24, n. 8, p. 919-924, 1998.

MARANHO, L. T. *et al.* Effects of the pollution by petroleum on the tracheids along the stem of *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 263-269, 2009.

MARANHO, Leila Teresinha *et al.* Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 615-624, 2006.

MORARI, Francesco; DAL FERRO, Nicola; COCCO, Elisa. Municipal wastewater treatment with *Phragmites australis* L. and *Typha latifolia* L. for irrigation reuse. Boron and heavy metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 1-14, 2015.

NDIMELE, P. E. A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbon. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 13, n. 15, p. 715-722, 2010.

O'BRIEN, TrP; FEDER, N. M. E. M.; MCCULLY, Mi E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

ODUKOYA, Johnson; LAMBERT, Ronnie; SAKRABANI, Ruben. Impact of crude oil on yield and phytochemical composition of selected green leafy vegetables. **International Journal of Vegetable Science**, v. 25, n. 6, p. 554-570, 2019.

OLARANONT, Yanisa; STEWART, Alyssa B.; TRAIPEM, Paweena. Physiological and anatomical responses of a common beach grass to crude oil pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 28075-28085, 2018.

OSSE, Matthew; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Markers of oil exposure in cold-water benthic environments: Insights and challenges from a study with echinoderms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 56-66, 2018.

PARZYCH, Agnieszka; CYMER, Małgorzata; MACHETA, Kamila. Leaves and roots of *Typha latifolia* L. and *Iris pseudacorus* L. as bioindicators of contamination of bottom sediments by heavy metals. **Limnological Review**, v. 16, n. 2, p. 77-83, 2016.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, I. *et al.* Growth of four tropical tree species in petroleum-contaminated soil and effects of crude oil contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 1769-1783, 2017.

POTASHEV, Konstantin; SHARONOVA, Natalia; BREUS, Irina. The use of cluster analysis for plant grouping by their tolerance to soil contamination with hydrocarbons at the germination stage. **Science of the Total Environment**, v. 485, p. 71-82, 2014.

PUNWONG, Paramita; JUPRASONG, Yotin; TRAIPEM, Paweena. Effects of an oil spill on the leaf anatomical characteristics of a beach plant (*Terminalia catappa* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21821-21828, 2017.

REHMAN, Khadeeja *et al.* Enhancement of oil field-produced wastewater remediation by bacterially-augmented floating treatment wetlands. **Chemosphere**, v. 217, p. 576-583, 2019.

SALEM, Zohra Ben *et al.* Metal accumulation and distribution in the organs of Reeds and Cattails in a constructed treatment wetland (Etueffont, France). **Ecological engineering**, v. 64, p. 1-17, 2014.

SASS, J. E. Botanical micro technique Iowa state college press. **Ames, Iowa**, v. 228, 1951.

SESIN, Verena; DAVY, Christina M.; FREELAND, Joanna R. Review of *Typha* spp.(cattails) as toxicity test species for the risk assessment of environmental contaminants on emergent macrophytes. **Environmental Pollution**, v. 284, p. 117105, 2021.

SHAHSAVARI, Esmaeil *et al.* Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-14, 2013.

SHARONOVA, Natalia; BREUS, Irina. Tolerance of cultivated and wild plants of different taxonomy to soil contamination by kerosene. **Science of the Total Environment**, v. 424, p. 121-129, 2012.

SHEPPARD, J. W.; PETERSON, J. F. Chlorogenic acid and Verticillium wilt of tobacco. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 56, n. 1, p. 157-160, 1976.

STRACK, Dieter *et al.* Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. **Journal of chemical ecology**, v. 29, p. 1955-1979, 2003.

SUSARLA, Sridhar; MEDINA, Victor F.; MCCUTCHEON, Steven C. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological engineering**, v. 18, n. 5, p. 647-658, 2002.

TRAN, Thi Linh Nham *et al.* Differential production of phenolics, lipids, carbohydrates and proteins in stressed and unstressed aquatic plants, *Azolla filiculoides* and *Azolla pinnata*. **Biology**, v. 9, n. 10, p. 342, 2020.

UKALSKA-JARUGA, Aleksandra; SMRECZAK, Bożena. The impact of organic matter on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) availability and persistence in soils. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2470, 2020.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VWIOKO, D. E.; FASHEMI, D. S. Growth response of *Ricinus communis* L (Castor Oil) in spent lubricating oil polluted soil. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 9, n. 2, p. 73-79, 2005.

WAHMAN, Rofida *et al.* The changes in *Lemna minor* metabolomic profile: A response to diclofenac incubation. **Chemosphere**, v. 287, p. 132078, 2022.

WANG, Shengwang *et al.* *Bacillus megaterium* strain WW1211 promotes plant growth and lateral root initiation via regulation of auxin biosynthesis and redistribution. **Plant and Soil**, v. 466, p. 491-504, 2021.

WILD, Edward *et al.* Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 10, p. 3695-3702, 2005.

XIE, Wenjun *et al.* Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 763-768, 2018.

XIE, Wenjun *et al.* The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 24438-24446, 2017.

YANG, Yan; SHEN, Qianyong. Phytoremediation of cadmium-contaminated wetland soil with *Typha latifolia* L. and the underlying mechanisms involved in the heavy-metal uptake and removal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 4905-4916, 2020.

YASSEEN, B. T. Phytoremediation of industrial wastewater from oil and gas fields using native plants: The research perspectives in the State of Qatar. **Central European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 4, p. 6-23, 2014.

ZAYNAB, Madiha *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZENGEL, Scott *et al.* Heavily oiled salt marsh following the Deepwater Horizon oil spill, ecological comparisons of shoreline cleanup treatments and recovery. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132324, 2015.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies respondem de maneiras diferentes ao estresse causado por contaminação de petróleo. No entanto, as três espécies aqui estudadas apresentaram tolerância ao petróleo.

*M. oblonga* apresentou altas taxas de germinação e bom desenvolvimento de indivíduos após a germinação. A espécie se mostrou sensível após manipulação e troca de vasos no experimento com os indivíduos jovens, desenvolvimento mais lento do eófilo e metáfilos no experimento I e variações no comprimento de raízes, no entanto a partir de uma semeadura direta pode ser utilizada com sucesso em ambientes contaminados com petróleo.

*C. virens* apresentou resultados significativos quanto à germinação, com baixas taxas principalmente no tratamento com 2% de petróleo, no entanto os resultados como um todo de *M. oblonga* e *C. virens* deve ser levado em conta, como o baixo número de mortes tanto no experimento de germinação de *M. oblonga* quanto no experimento utilizando indivíduos jovens de *C. virens*, a biomassa de *M. oblonga* que não foi alterada em nenhum experimento e o rápido crescimento de *C. virens*. Além disso, ambas apresentaram eficiência no processo de redução de petróleo do solo, mesmo no maior nível de contaminação utilizado nos testes.

*T. dominguensis* também apresenta bons resultados no ambiente contaminado, sem alterações na quantidade e tamanho das folhas, e presença de aerênquima e compostos fenólicos intimamente ligados a um mecanismo de bom desenvolvimento e estabelecimento na área degradada da Repar. A espécie não apresentou capacidade de absorção de BTEX, o que pode estar inclusive não comprometendo seu crescimento. É uma provável espécie com fortes interações com microrganismos que colaboram para a restauração do solo e otimiza o bom desenvolvimento desta espécie.

No geral, as poucas diferenças nas variáveis aqui estudadas e a presença e abundância natural dessas espécies na área contaminada, são fortes indicativos que *M. oblonga*, *C. virens* e *T. dominguensis* são espécies aptas a serem utilizadas em processos de fitorremediação, e juntamente com os processos químicos e biológicos que promove no solo, contribuem para a restauração e equilíbrio do ecossistema natural sem causar danos colaterais adjacentes.

**APÊNDICES**

**Tabela 1.** Dados da germinação e crescimento de *M. oblonga* no decorrer de 120 dias referente ao Experimento I do capítulo I.

Tratamento	Quantidade de sementes germinadas	Comprimento 30 dias (cm)	Comprimento 60 dias (cm)	Comprimento 90 dias (cm)	Comprimento 120 dias (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Biomassa (g)	Quantidade de folhas	EAF eófilo (cm)	EAF 1° metáfilo (cm)	EAF 2° metáfilo (cm)
T0	10	3,47	5,77	7,81	8,83	4,56	0,037	40	0,37	0,50	0,59
T0	10	3,67	5,78	6,43	6,90	4,30	0,030	38	0,44	0,34	0,26
T0	10	3,96	6,00	6,93	7,42	3,88	0,037	48	0,38	0,41	0,49
T0	10	3,97	5,75	6,92	7,78	6,71	0,032	38	0,40	0,46	0,52
T0	10	3,50	4,65	6,00	6,80	4,65	0,032	39	0,38	0,51	0,41
T0	9	3,82	5,02	6,31	7,33	4,61	0,030	31	0,47	0,39	0,35
T0	10	4,70	6,37	6,98	7,05	5,52	0,053	42	0,54	0,45	0,40
T0	10	4,15	5,75	6,92	7,56	3,63	0,023	40	0,33	0,36	0,29
T0	9	4,45	6,67	7,63	8,06	5,94	0,041	49	0,68	0,65	0,54
T0	10	4,16	5,34	6,43	7,50	4,50	0,033	42	0,37	0,47	0,35
T2	10	3,88	5,44	6,75	7,56	4,88	0,041	44	0,37	0,34	0,35
T2	9	4,08	5,80	7,01	7,47	3,26	0,040	37	0,27	0,23	0,18
T2	9	2,91	4,31	5,85	6,84	3,92	0,030	37	0,31	0,34	0,27
T2	10	2,92	4,06	5,50	6,20	2,08	0,027	39	0,17	0,20	0,28
T2	10	3,15	4,50	5,75	6,45	2,38	0,029	30	0,20	0,17	0,18
T2	10	3,81	4,78	6,39	7,00	3,95	0,033	45	0,42	0,38	0,40
T2	9	3,35	5,20	6,31	7,75	4,06	0,060	34	0,37	0,35	0,35
T2	10	2,73	3,91	5,20	7,22	2,90	0,034	39	0,38	0,39	0,41
T2	10	3,22	4,03	5,41	7,02	4,31	0,046	41	0,29	0,27	0,39
T2	9	3,60	5,10	6,51	7,77	3,18	0,044	42	0,38	0,31	0,28
T4	10	3,75	4,60	5,80	7,46	1,95	0,034	37	0,36	0,26	0,45
T4	10	3,91	4,95	5,57	5,81	3,18	0,029	40	0,38	0,31	0,17
T4	10	4,00	5,28	5,77	6,14	3,81	0,022	27	0,27	0,19	0,14
T4	10	3,78	5,23	6,07	6,62	2,18	0,026	37	0,27	0,21	0,30
T4	10	3,70	5,41	7,02	7,76	2,18	0,044	39	0,30	0,36	0,51
T4	10	4,36	5,44	6,25	6,91	4,31	0,042	42	0,46	0,44	0,37
T4	9	3,25	4,41	5,75	6,75	2,89	0,035	29	0,26	0,24	0,22
T4	10	3,07	4,51	5,31	6,05	3,88	0,032	39	0,24	0,17	0,16
T4	9	2,95	4,76	6,13	7,96	1,93	0,044	30	0,41	0,32	0,43
T4	10	3,48	4,80	5,70	5,78	3,90	0,035	30	0,25	0,24	0,22

\*EAF: Estimativa de área foliar.

**Tabela 2.** Resultados estatísticos do experimento I do teste de germinação de *M. oblonga* referente ao capítulo I.

Variável	P-Value	R <sup>2</sup>	Nemenyi Test
Quantidade de sementes germinadas	0,586	0.025	T2-T0 - 0.7263
			T4-T0 - 1.0000
			T4-T2 - 0.7263
Comprimento 30 dias	0,009 *	0.223	T2-T0 - 0.0168 *
			T4-T0 - 0.2455
			T4-T2 - 0.4876
Comprimento 60 dias	0.011 *	0.351	T2-T0 - 0.0063 *
			T4-T0 - 0.0405 *
			T4-T2 - 0.8008
Comprimento 90 dias	0.002 *	0.315	T2-T0 - 0.0462 *
			T4-T0 - 0.0098 *
			T4-T2 - 0.8485
Comprimento 120 dias	0.058	0.159	T2-T0 - 0.5189
			T4-T0 - 0.0560
			T4-T2 - 0.4493
Comprimento da raiz	0.001 *	0.394	T2-T0 - 0.0525
			T4-T0 - 0.0013 *
			T4-T2 - 0.4645
Biomassa	0.487	0.022	T2-T0 - 0.7263
			T4-T0 - 0.9968
			T4-T2 - 0.7718
Quantidade de folhas	0.055	0.136	T2-T0 - 0.7030
			T4-T0 - 0.0634
			T4-T2 - 0.3164
EAF do eófilo	0.005 *	0.250	T2-T0 - 0.0477 *
			T4-T0 - 0.0320 *
			T4-T2 - 0.9873
EAF 1° metáfilo	0,001 *	0.467	T2-T0 - 0.00575 *
			T4-T0 - 0.00086 *
			T4-T2 - 0.85490
EAF 2° metáfilo	0.064	0.155	T2-T0 - 0.1372
			T4-T0 - 0.0989
			T4-T2 - 0.9873

\*Resultados com (\*) variaram estatisticamente. Significância estatística em  $p < 0,05$ .

**Tabela 3.** Dado do crescimento e desenvolvimento de *M. oblonga* no decorrer de 120 dias referente ao Experimento II do capítulo I.

Tratamento	Peso inicial (g)	Comprimento raiz inicial (cm)	Comprimento inicial (cm)	Comprimento 30 dias (cm)	Comprimento 60 dias (cm)	Comprimento 90 dias (cm)	Comprimento 120 dias (cm)	Biomassa (g)	Comprimento raiz final (cm)
T0	0,036	6,30	7,67	7,82	7,70	7,50	9,20	0,07	4,86
T0	0,028	3,85	6,20	6,37	6,42	6,75	8,70	0,10	6,70
T0	0,034	4,80	6,30	6,40	6,27	6,15	7,00	0,06	3,96
T0	0,039	4,17	7,47	7,90	7,25	7,20	8,00	0,05	5,97
T0	0,053	4,64	7,62	7,77	8,00	8,67	9,67	0,08	5,10
T2	0,026	4,90	5,52	5,72	6,20	5,90	6,80	0,03	4,00
T2	0,026	4,10	7,10	7,30	7,50	7,60	9,13	0,09	3,75
T2	0,071	5,55	5,57	5,87	5,82	5,85	5,00	0,04	3,60
T2	0,036	4,77	6,65	6,77	6,40	6,16	6,55	0,06	6,70
T2	0,033	4,82	5,80	6,37	6,27	6,20	8,33	0,09	2,93
T4	0,032	5,07	7,42	7,92	7,55	7,40	6,30	0,00	0,00
T4	0,025	4,95	7,65	9,20	8,85	7,70	7,55	0,00	0,00
T4	0,094	4,47	7,05	7,12	7,23	6,60	8,00	0,06	5,50
T4	0,020	6,57	6,37	6,85	7,00	6,90	5,00	0,04	5,15
T4	0,020	2,85	8,37	8,85	8,86	9,60	8,85	0,04	2,80

**Tabela 4.** Resultados estatísticos do experimento II de *M. oblonga* referente ao capítulo I.

<b>Variável</b>	<b>P-Value</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Nemenyi Test</b>
Comprimento 30 dias	0.036 *	0.3294	T2-T0 - 0.3335
			T4-T0 - 0.5165
			T4-T2 - 0.0323 *
Comprimento 60 dias	0.045 *	0.3359	T2-T0 - 0.2651
			T4-T0 - 0.6948
			T4-T2 - 0.0469 *
Comprimento 90 dias	0.161	0.1658	T2-T0 - 0.3335
			T4-T0 - 0.8384
			T4-T2 - 0.1172
Comprimento 120 dias	0.221	0.0732	T2-T0 - 0.2981
			T4-T0 - 0.2495
			T4-T2 - 0.9938
Comprimento da raiz	0.167	0.1788	T2-T0 - 0.4947
			T4-T0 - 0.1931
			T4-T2 - 0.8195
Biomassa	0.063	0.3266	T2-T0 - 0.6728
			T4-T0 - 0.0513
			T4-T2 - 0.2981

\*Resultados com (\*) variaram estatisticamente. Significância estatística em  $p < 0,05$ .

**Tabela 5.** Dados da germinação e crescimento de *C. virens* no decorrer de 240 dias referente ao Experimento I do capítulo II.

Tratamento	Quantidade de sementes germinadas	Comprimento o 30 dias (cm)	Comprimento o 60 dias (cm)	Comprimento o 90 dias (cm)	Comprimento o 120 dias (cm)	Comprimento o 150 dias (cm)	Comprimento o 180 dias (cm)	Comprimento o 210 dias (cm)	Comprimento o 240 dias (cm)	Comprimento o raiz (cm)	Biomassa (g)
T0	16	1,20	1,14	1,24	1,30	1,43	1,23	3,27	5,05	1,53	0,02260
T0	17	0,00	1,27	1,11	1,35	1,41	1,75	3,77	5,51	1,88	0,02206
T0	19	0,60	1,23	1,47	1,89	2,52	3,62	4,84	9,62	2,25	0,05280
T0	28	0,70	1,21	1,35	1,60	1,69	2,49	4,17	6,32	1,45	0,01400
T0	20	0,00	1,35	1,52	1,80	1,97	1,96	3,62	4,74	1,33	0,01050
T2	7	0,60	0,97	1,22	1,35	0,94	0,98	1,05	2,40	0,86	0,00010
T2	14	0,60	1,12	1,18	1,33	1,37	1,96	2,81	3,94	0,75	0,00660
T2	11	0,57	0,88	0,97	1,10	1,57	1,75	2,85	5,21	1,21	0,01320
T2	16	0,65	0,86	1,21	1,37	1,28	1,06	1,58	2,32	0,60	0,00270
T2	5	0,60	1,33	1,63	1,35	3,02	6,65	14,42	17,64	3,30	0,01310
T4	7	0,00	0,90	1,20	0,94	1,04	1,30	1,34	2,25	0,67	0,00300
T4	9	0,60	1,05	1,20	1,26	1,44	1,40	1,41	1,56	0,53	0,00010
T4	24	0,60	0,70	1,08	1,26	1,12	1,16	2,05	4,20	0,91	0,00700
T4	18	0,00	0,92	1,27	1,25	1,21	1,11	1,33	2,10	0,66	0,00100
T4	8	0,33	0,97	1,22	1,65	1,75	1,36	1,25	1,46	0,34	0,00010

**Tabela 6.** Resultados estatísticos do experimento I de *C. virens* referente ao capítulo II.

Variável	P-Value	R <sup>2</sup>	Nemenyi Test
Germinação	0.061	0.2672	T2-T0 - 0.0469 * T4-T0 - 0.2651 T4-T2 - 0.6948
Comprimento 30 dias	0.305	0.003	T2-T0 - 0.9569 T4-T0 - 0.5608 T4-T2 - 0.3906
Comprimento 60 dias	0.019 *	0.457	T2-T0 - 0.1463 T4-T0 - 0.0266 * T4-T2 - 0.7593
Comprimento 90 dias	0.422	0.015	T2-T0 - 0.4731 T4-T0 - 0.3520 T4-T2 - 0.9755
Comprimento 120 dias	0.074	0.236	T2-T0 - 0.4106 T4-T0 - 0.0855 T4-T2 - 0.6728
Comprimento 150 dias	0.369	0.001	T2-T0 - 0.4947 T4-T0 - 0.2345 T4-T2 - 0.8737
Comprimento 180 dias	0.408	0.008	T2-T0 - 0.5832 T4-T0 - 0.1805 T4-T2 - 0.7167
Comprimento 210 dias	0.030 *	0.034	T2-T0 - 0.2981 T4-T0 - 0.0160 * T4-T2 - 0.4106
Comprimento 240 dias	0.022 *	0.074	T2-T0 - 0.5832 T4-T0 - 0.0130 * T4-T2 - 0.1571
Comprimento da raiz	0.049 *	0.2872	T2-T0 - 0.3335 T4-T0 - 0.0130 * T4-T2 - 0.3335
Biomassa	0.006 *	0.430	T2-T0 - 0.1172 T4-T0 - 0.0105 * T4-T2 - 0.6281

\*Resultados com (\*) variaram estatisticamente. Significância estatística em  $p < 0,05$ .

Tabela 7. Dados do crescimento e desenvolvimento de *C. virens* no decorrer de 120 dias referente ao Experimento II do capítulo II.

Tratamento	Peso inicial	Comprimento raiz inicial	comprimento parte aérea inicial	Comprimento 30 dias	Comprimento 60 dias	Comprimento 90 dias	Comprimento 120 dias	Biomassa	Quantidade de folhas	Comprimento raiz
T0	0,013	1,80	4,32	4,52	5,70	23,16	55,66	4148,66	5	15,45
T0	0,023	1,65	5,27	4,97	6,32	22,23	52,00	4983,00	6	14,23
T0	0,025	2,70	5,52	5,60	7,17	25,35	55,75	4349,75	6,25	11,90
T0	0,021	1,57	5,35	5,40	7,00	27,75	56,42	3163,50	5	15,03
T0	0,020	2,27	4,67	4,70	6,85	27,70	56,95	3624,75	5	13,53
T2	0,027	2,90	5,80	5,90	6,00	17,40	57,45	3293,50	5	14,60
T2	0,010	2,08	5,62	5,37	5,70	25,20	53,05	2187,00	4	8,90
T2	0,024	2,12	4,62	4,72	5,93	18,30	40,30	1738,42	4,33	7,75
T2	0,017	1,32	6,40	6,72	8,55	36,12	68,75	3327,20	4,33	6,56
T2	0,016	1,85	5,17	5,32	5,08	17,50	51,15	2422,00	4	8,53
T4	0,015	1,70	5,37	5,45	7,50	27,25	59,40	3026,00	4,75	12,16
T4	0,025	2,37	4,77	4,90	7,47	22,37	46,85	2405,59	4,25	10,83
T4	0,020	2,32	3,67	3,95	6,36	22,00	50,96	2435,66	5,66	12,40
T4	0,018	2,08	3,87	3,92	6,65	25,95	51,92	3139,50	5	13,93
T4	0,018	2,38	5,57	5,65	5,00	22,30	54,50	2518,00	5	10,20

**Tabela 8.** Resultados estatísticos do experimento II de *C. virens* referente ao capítulo II.

Variável	P-Value	R <sup>2</sup>	Nemenyi Test
Comprimento 30 dias	0.160	0.113	T2-T0 - 0.5386
			T4-T0 - 0.9755
			T4-T2 - 0.4106
Comprimento 60 dias	0.864	0.130	T2-T0 - 0.6728
			T4-T0 - 0.9938
			T4-T2 - 0.6057
Comprimento 90 dias	0.652	0.117	T2-T0 - 0.3335
			T4-T0 - 0.7593
			T4-T2 - 0.7593
Comprimento 120 dias	0.867	0.140	T2-T0 - 0.8384
			T4-T0 - 0.4947
			T4-T2 - 0.8384
Comprimento da raiz	0.013 *	0.426	T2-T0 - 0.0356 *
			T4-T0 - 0.3710
			T4-T2 - 0.4947
Biomassa	0.005 *	0.480	T2-T0 - 0.0356 *
			T4-T0 - 0.0428 *
			T4-T2 - 0.9972
Quantidade de folhas	0.017 *	0.405	T2-T0 - 0.0294 *
			T4-T0 - 0.4731
			T4-T2 - 0.3520

\*Resultados com (\*) variaram estatisticamente. Significância estatística em  $p < 0,05$ .

Tabela 9. Dados do número de folhas e comprimento das cinco maiores de *T. dominguenensis* de local sem contaminação de petróleo referente ao Capítulo III.

Indivíduo	Nº de folhas	Comprimento das 5 maiores folhas (cm)				
		1	2	3	4	5
1	14 folhas	228,0	236,0	237,0	240,0	221,0
2	15 folhas	221,0	229,5	189,0	221,4	230,5
3	12 folhas	203,2	227,7	221,3	192,7	216,0
4	16 folhas	215,7	217,7	202,0	214,5	222,5
5	16 folhas	193,7	208,0	182,7	200,2	209,5
6	11 folhas	188,0	204,0	204,2	180,4	184,0
7	14 folhas	211,7	225,7	214,5	205,5	219,9
8	14 folhas	227,5	215,5	224,5	207,0	221,0
9	13 folhas	225,0	219,5	197,2	216,4	206,7
10	12 folhas	194,0	213,2	206,6	211,5	201,5
11	12 folhas	220,0	228,0	222,4	231,0	220,0
12	9 folhas	195,0	187,0	202,5	179,7	187,0
13	11 folhas	211,9	220,6	219,5	217,3	206,8
14	11 folhas	202,7	220,2	216,6	183,8	214,6
15	8 folhas	206,0	181,0	188,4	219,3	199,2
16	11 folhas	187,0	198,4	210,6	204,5	202,8
17	15 folhas	195,0	197,7	202,0	207,6	186,9
18	12 folhas	221,9	208,4	221,7	204,1	202,5
19	12 folhas	208,0	224,0	221,0	191,0	204,5
20	15 folhas	205,0	190,0	199,5	207,0	188,0

**Tabela 10.** Dados do número de folhas e comprimento das cinco maiores de *T. dominguenensis* de local com contaminação de petróleo. Referente ao capítulo III.

Indivíduo	Nº de folhas	Comprimento das 5 maiores folhas (cm)				
		1	2	3	4	5
1	15 folhas	208,7	212,0	198,5	190,4	171,5
2	14 folhas	206,4	191,8	179,0	162,2	148,5
3	12 folhas	200,0	187,0	167,4	148,0	156,0
4	11 folhas	199,5	191,0	179,0	159,0	150,0
5	15 folhas	224,5	231,5	212,0	207,5	193,0
6	10 folhas	228,0	239,5	253,8	213,2	250,6
7	11 folhas	248,0	254,6	263,3	250,0	238,0
8	14 folhas	190,7	248,7	224,5	241,0	240,5
9	9 folhas	223,0	209,2	192,2	193,5	219,1
10	16 folhas	237,0	247,2	248,0	238,0	198,5
11	12 folhas	229,0	242,9	264,4	264,0	266,5
12	14 folhas	254,5	247,1	251,0	259,5	250,6
13	15 folhas	214,0	230,5	238,0	237,5	219,2
14	12 folhas	223,0	247,0	233,4	209,5	224,2
15	9 folhas	221,0	199,0	244,3	253,0	223,5
16	15 folhas	237,9	250,5	254,4	241,4	214,5
17	15 folhas	262,1	259,0	253,2	256,5	243,5
18	12 folhas	257,7	218,5	234,0	254,0	241,9
19	15 folhas	245,5	227,7	244,0	229,0	238,7
20	15 folhas	193,9	205,5	222,0	230,0	216,0