



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Siomara Dias da Costa Lemos

**Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.)
exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**

Rio de Janeiro
2015

Siomara Dias da Costa Lemos

**Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.)
exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Marques (FEN/UERJ)

Coorientadora: Profa. Dra. Norma Albarello (IBRAG/UERJ)

Rio de Janeiro
2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

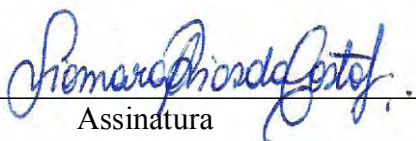
L556 Lemos, Siomara Dias da Costa
Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.)
exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo / Siomara
Dias da Costa Lemos, 2015.
150 f. : il.

Orientador: Márcia Marques Gomes.
Coorientadora: Norma Albarello.
Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro.

1. Plantas medicinais - Propagação-in-vitro - Teses. 2. Biorremediação -
Teses. 3. Plantas - Metabolismo - Teses. 4. Fisiologia vegetal - Teses. I. Gomes,
Márcia Marques. II. Albarello, Norma. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. IV. Título.

CDU 633.88

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte.


Assinatura

12/maio/2015

Data

Siomara Dias da Costa Lemos

**Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.)
exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**

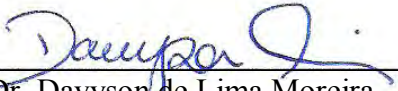
Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências, ao
Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de março de 2015.

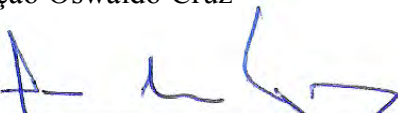
Banca examinadora:

Profª. Dra. Marcia Marques Gomes (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ


Profª. Dra. Norma Albarello (Coorientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ



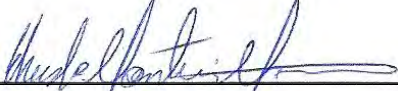
Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira
Fundação Oswaldo Cruz



Prof. Dr. Wenceslau Geraldes Teixeira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/RJ



Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ



Prof. Dr. Eduardo Monteiro Martins
Faculdade de Engenharia - UERJ

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

Aos Cientistas que se dedicam a uma busca infinita,
apesar das dificuldades existentes, seja no âmbito
pessoal, acadêmico, político ou social.

AGRADECIMENTOS

À Professora Marcia Marques, minha orientadora, por ter me aberto as portas de seu laboratório (LABIFI) e da UERJ. Sem este primeiro passo eu não teria chegado onde cheguei.

À Professora Norma Albarello, minha coorientadora, por ter possibilitado a realização de meus experimentos no LABPLAN e ter permitido a minha convivência em um belo grupo ao longo de três anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao farmacêutico Eduardo Fonseca do Departamento de Biologia Vegetal/IBRAG pela condução e auxílio nas análises cromatográficas. À Profa. Dra. Monica Marques do Instituto de Química da UERJ, por ter disponibilizado os equipamentos da Central Analítica Fernanda Coutinho.

Aos colegas do LABIFI, que são tantos... Muitos que já saíram nestes cinco anos (quatro só no doutorado), mas que de alguma maneira me auxiliaram cientificamente e pessoalmente no pouco tempo que estive realizando minhas atividades neste laboratório. Cada um tem a sua parcela de participação nesta tese, mas em especial um grande agradecimento aos amigos e colegas Roberta Cianella (e esposo), Débora Roque, Rodrigo Sondermann, Sanye Soroldoni, Francisca Magalhães e Gabriele Araújo.

Aos colegas do LABPLAN. Todos auxiliaram de alguma forma, mas alguns em especial: Francesca Santoro por reavivar minha memória no cultivo *in vitro*; Thiago Barboza por ter sido sempre prestativo (a sua maneira) desde o meu primeiro dia no laboratório; Ivan Ribeiro pelos nossos debates, discussões e orientações oportunas; Tatiana Castro pela paciência ao ouvir minhas dúvidas e pela linda amizade que construímos - você é a alma que mantém esse laboratório; Luciano Marques pelas belas aulas de química e a amizade construída - sem tua paciência e didática eu estaria completamente perdida; Débora Lage e Claudia Simões, nossas conversas e compartilhamento de experiências sempre me mostraram mais do que eu podia ver; Juliana Lyra, que muito me auxiliou no primeiro e parte do segundo experimento desta tese; Thiago Rebello, meu melhor estagiário e mais novo amigo, parceiro por praticamente dois anos de empreitada e sempre me auxiliando sem poupar esforços - eu disse que íamos colher frutos desta parceria; Gabriel Porto, meu último estagiário neste momento, que não deixou nada por menos e espero ter conseguido estimular a

sua fome pela ciência. Deixo claro que todos do LABPLAN fazem parte de um grupo especial que vou carregar pra sempre no meu coração.

Aos colegas do PPGMA que, apesar de não nos encontrarmos com muita frequência, foram especiais nos debates durante as disciplinas para a minha formação.

Aos professores do PPGMA, especialmente ao Professor Carlos Saldanha por ter aberto a minha mente para as questões ambientais e mostrar que questionar é necessário para o crescimento desta. Além de ter compartilhado comigo seus conhecimentos e o desenvolvimento de um artigo que faz parte desta tese.

Às minhas famílias, Rutsatz e Dias da Costa Lemos, que compreenderam a minha ausência em alguns momentos importantes devido às atividades no laboratório, principalmente após minha mudança para o Rio de Janeiro. Em especial à minha santa mãe Helena Lemos, que sempre compreendeu minhas atitudes e sabe que, após tropeços na vida escolar, eu soube buscar o que eu queria e aprofundar o conhecimento na área que gosto, lhe dando orgulho da pessoa que continuo me formando. Tenho orgulho de ser filha de quem sou, e sei que ela sempre me apoiará em qualquer desafio que venha a surgir na minha vida.

Ao meu marido Marcus Rutsatz que, novamente, me incentivou e esteve ao meu lado como amigo, conselheiro, pacificador e também orientador. Mais um desafio aceito e superado... Que venham outros, pois sei que o que contruímos juntos e sentimos um pelo outro é o meu porto seguro. São 13 anos de uma vida em comum, que venham tantos outros anos com os seus desafios!!!

Agradeço a Deus, princípio supremo que as religiões consideram superior à natureza. Independentemente da denominação que se dê a Deus, acredito que o apoio que a religião nos dá, nos permite suportar situações da nossa vida terrena. Sendo assim, tenho que agradecer a Ele que nas horas em que pensei “Meu Deus do céu” fez surgir alguma ideia, ou elucidar dos pensamentos, me ajudando a seguir adiante.

Enfim, agradeço a minha persistência e gênio difícil em alguns momentos, pois sem isso eu não conseguiria alcançar mais esta vitória. E que venha a próxima!

Não sei se viro menina, se viro mãe, se viro todas.

Se viro artista, se viro vento ou viajante.

Viro santa ou viro doida

Quem sabe viro onça

Viro a mesa, viro o jogo, viro a página,

Viro a vida ao avesso e viro outras

Sim, eu me viro.

Yohana Sanfer

RESUMO

LEMOS, Siomara Dias da Costa. **Desenvolvimento e produção de metabólitos de arruda (*Ruta graveolens* L.) exposta a substratos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** 150 p. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A indução da síntese de moléculas biologicamente ativas é conhecida como uma estratégia de defesa do organismo vegetal às condições adversas, onde plantas medicinais e/ou aromáticas são foco de pesquisa na terapêutica médica, na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. A possibilidade de que os hidrocarbonetos de petróleo presentes no solo possam agir como agentes elicitores do metabolismo vegetal tem despertado interesse científico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), considerando as respostas morfológicas e metabólicas na presença de petróleo e derivados. Além disso, verificar o potencial de desenvolvimento dessa espécie em áreas contaminadas, com base na hipótese de que tais substâncias podem influenciar na produção de substâncias de interesse, sem que haja redução significativa da biomassa vegetal. Foram realizados experimentos de (i) germinação *in vivo* em solo contaminado e parcialmente biorremediado, assim como solo com contaminação recente com óleo cru (0,8 % e 2,8 %) e diesel comercial S50 (0 % a 6,0 %), sendo que neste último foi avaliado o desenvolvimento e a produção de biomassa das plântulas; (ii) germinação *in vitro* em meio MS contaminado com fenantreno (1,0; 5,0 e 10,0 mg/L de meio) ou benzo[a]pireno (0,001; 0,010 e 0,100 mg/L de meio), sendo avaliado o desenvolvimento e a produção de biomassa; e (iii) resposta fisiológica de plantas oriundas do estoque *in vitro* à exposição de fenantreno ou benzo[a]pireno. *R. graveolens* teve redução significativa da germinação em solos contaminados, principalmente os solos parcialmente biorremediados pelo do processo de bioestímulo; não teve redução significativa da germinação *in vivo* nos solos contaminados com óleo cru, biorremediado e contaminado com diesel, porém o desenvolvimento pós-germinação foi afetado. Na exposição *in vitro* aos hidrocarbonetos, não houve alteração significativa na germinação nem na capacidade de desenvolvimento e produção de biomassa nas concentrações testadas de até 10 mg/L de fenantreno e até 0,1 mg/L de benzo[a]pireno. Em relação à propagação *in vitro*, foi possível a multiplicação de plantas em meio de cultura sem suplementação hormonal, na presença dos contaminantes. A presença de fenantreno e benzo[a]pireno *in vitro* não promoveu mudanças significativas nos níveis de compostos fenólicos e flavonoides totais produzidos, não havendo também alteração no perfil fitoquímico da espécie, quanto à presença de rutina. Pelo exposto, conclui-se que a espécie tem potencial para uso em biomonitoramento de solos contaminados, considerando a sua capacidade de produzir metabólitos e tolerar a presença dos hidrocarbonetos selecionados, sendo indicada ao cultivo em áreas contaminadas nos níveis investigados.

Palavras-chave: Arruda. Solo. Biorremediação. Cultivo *in vitro*. Metabolismo vegetal.

ABSTRACT

LEMOS, Siomara Dias da Costa. **Physiological and anatomical responses of rue (*Ruta graveolens* L.) exposed to substrates contaminated with petroleum hydrocarbons.** 150 p. PhD Thesis - University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The synthesis of biologically active molecules by some plant species is known as a defence strategy in response to adverse environmental conditions. Due to this synthesis, plant species have been the focus of research in medical therapy, pharmaceutical, cosmetic and food industries. The possibility that petroleum hydrocarbons released in the soil can act as elicitor agents of plant metabolism has raised scientific attention. The present study aimed to evaluate the germination and plant growth, as well as morphological and metabolic responses of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) in the presence of crude oil and oil-based products. The study also aimed to assess growth potential of this species in contaminated areas, based on the hypothesis that such contaminants are able to increase the production of substances of interest, without significant reduction in biomass. The studies included (i) *in vivo* germination in contaminated partially bioremediated soils, as well as in soil recently contaminated with crude oil (0.8% and 2.8%) and commercial diesel S50 (0% to 6.0%), being the last one used for evaluation of biomass production; (ii) *in vitro* germination on MS medium contaminated with phenanthrene (1.0; 5.0 and 10.0 mg/L) and benzo[a]pyrene (0.001; 0.010 and 0.100 mg/L), where plant development and biomass production were evaluated; (iii) physiological responses to the exposure to phenanthrene or benzo[a]pyrene. The germination was significantly reduced in contaminated soils, especially in the soil partially bioremediated by biostimulation. No significant reduction were observed in germination *in vivo* in soil contaminated with crude oil, bioremediated and contaminated with diesel. However, the post-germination development was significantly affected under these conditions. There were no significant changes in the germination capacity, plant growth or biomass production *in vitro* in concentrations up to 10 mg/L of phenanthrene and up to 0.1 mg/L of benzo [a] pyrene. Plant propagation *in vitro* could be achieved in presence of the contaminants with no hormonal supplementation. The presence of phenanthrene and benzo[a]pyrene *in vitro* did not significantly changed the levels of phenolic compounds and total flavonoids synthesized, and there was no change (qualitatively) in the phytochemical profile of the species, based on the presence of rutin. It was concluded is that the *R. graveolens* has potential to be used in biomonitoring of contaminated soils, and since it is able to produce specific metabolites and it is tolerant to the presence of selected hydrocarbons *in vitro*, it might be able to grow on soils contaminated at the levels investigated in the present study.

Keywords: Rue. Soil. Bioremediation. *In vitro* culture. Plant metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Estrutura de molécula dos compostos monoaromáticos	24
Figura 02 -	Eventos físicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (fases I e II) e desenvolvimento da plântula (fase III).	31
Figura 03 -	Fatores ambientais que podem afetar o conteúdo final de metabólitos especiais	37
Figura 04 -	Rota de biossíntese dos flavonoides, incluindo a rutina, flavonoide predominante de <i>Ruta graveolens</i>	38
Figura 05 -	<i>Ruta graveolens</i>	39
Figura 06 -	Estrutura molecular da Rutina.	40
Figura 07 -	Perfil fitoquímico de extrato metanólico de <i>R. graveolens</i>	41
Figura 08 -	Características da cultura de tecidos vegetais, cultivo hidropônico e em campo.	42
Figura 09 -	Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente estudo.	46
Figura 10 -	Embalagem das sementes comerciais de <i>R. graveolens</i> da marca ISLA®	47
Figura 11 -	Sementes de <i>R. graveolens</i> utilizadas para a germinação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	47
Figura 12 -	Contaminação do solo com petróleo cru (P2,8) para a germinação de <i>R. graveolens</i>	49
Figura 13 -	Pesagem do OD para contaminação do solo fornecido pela Embrapa-Solos. ...	50
Figura 14 -	Desinfestação das sementes <i>R. graveolens</i> por imersão em hipoclorito	51
Figura 15 -	Substrato distribuído em caixa plástica.	52
Figura 16 -	Germinação <i>in vivo</i> de <i>R. graveolens</i> em Câmara de germinação	52
Figura 17 -	Semeadura de <i>R. graveolens</i> em solo contaminado artificialmente com OD. ...	53
Figura 18 -	Estante de germinação em sala climatizada do LABIFI/UERJ.	53
Figura 19 -	Sementes de <i>R. graveolens</i> inoculadas em tubos de ensaio com meio MS, suplementado ou não com a solução de FEN.	55
Figura 20 -	Sementes de <i>R. graveolens</i> germinadas em meio MS0.	57
Figura 21 -	Plântulas de <i>R. graveolens</i> oriundas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	58
Figura 22 -	Estoque <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> oriundas de sementes germinadas <i>in vitro</i> ...	58

Figura 23 -	Brotos de <i>R. graveolens</i> oriundas de sementes germinadas <i>in vitro</i> , utilizadas nos experimentos de avaliação das respostas a fenantreno e benzo(a)pireno sob condições <i>in vitro</i>	59
Figura 24 -	Fluxograma do presente experimento demonstrando todas as suas fases.	65
Figura 25 -	Início (linha cinza) e término (linha preta) da germinação de sementes de <i>R. graveolens</i> expostas a diferentes solos contaminados ao longo de 28 dias.....	67
Figura 26 -	Índice de germinação (IG) de <i>R. graveolens</i>	69
Figura 27 -	Desenvolvimento (média \pm d.p.) das partes aérea e radicular das plântulas desenvolvidas em solo contaminado com óleo diesel (OD), após 60 dias.	70
Figura 28 -	Nódulos observados na raiz das plântulas de <i>R. graveolens</i> após 60 dias em solo contaminado com óleo diesel (OD).	71
Figura 29 -	Número médio (\pm d.p.) de folíolos (barras escuras) e média (\pm d.p.) de massa fresca (barras em cinza) de plântulas mantidas em solo contaminado com óleo diesel (OD), após 60 dias	71
Figura 30 -	Desenvolvimento de plântulas de <i>R. graveolens</i> obtidas por germinação em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (A) e benzo[a]pireno (B), aos 15, 30 e 45 dias	82
Figura 31 -	Desenvolvimento após dois meses das partes aérea e radicular de plântulas de <i>R. graveolens</i> obtidas por germinação em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (a) e benzo[a]pireno (b)	83
Figura 32 -	Desenvolvimento radicular <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno e benzo[a]pireno.	84
Figura 33 -	Brotos <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno aos 7, 14 e 21 dias	91
Figura 34 -	Brotos <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> em meio de cultura MS contaminado artificialmente com benzo[a]pireno aos 7, 14 e 21 dias.	92
Figura 35 -	Conteúdo de compostos fenólicos em brotos de <i>R. graveolens</i> cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de fenantreno (A) e benzoapireno (B)	94
Figura 36 -	Conteúdo de flavonoides em brotos de <i>R. graveolens</i> cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de fenantreno (A) e benzoapireno (B)	96

Figura 37 -	Relação entre a média de biomassa fresca (massa fresca) das amostras vegetais e a síntese de flavonoides de brotos <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno aos 7, 14 e 21 dias.	98
Figura 38 -	Relação entre a média de massa fresca das amostras vegetais e a síntese de flavonoides de brotos <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i> em meio de cultura MS contaminado artificialmente com benzo[a]pireno aos 7, 14 e 21 dias	99
Figura 39 -	Cromatogramas por CLAE-UV--EM (Cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria no ultravioleta e espectrometria de massas) dos extratos metanólicos de <i>R. graveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de benzo(a)pireno mostrando o pico de rutina (íon molecular 609.17)	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Algumas propriedades físico-químicas dos 16 HPAs prioritários, segundo US EPA	25
Tabela 02 -	Valores de prevenção e intervenção de HPAs listados no CONAMA nº 420/2009	28
Tabela 03 -	Caracterização química do solo utilizado no experimento de germinação de <i>R. graveolens</i> em solo contaminado com petróleo	49
Tabela 04 -	Caracterização química do solo utilizado no experimento de germinação de <i>R. graveolens</i> em solo contaminado com óleo diesel	50
Tabela 05 -	Porcentagem de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG) e entropia de sementes de <i>R. graveolens</i> germinadas na presença de diferentes contaminantes em solos ao longo de 28 dias	68
Tabela 06 -	Taxa de germinação (% G), índice de velocidade de germinação (IVG) e entropia de sementes de <i>R. graveolens</i> germinadas em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (FEN) e benzo[a]pireno (B[a]P)	80
Tabela 07 -	Desenvolvimento radicular (cm) de plântulas de <i>R. graveolens</i> germinadas em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (FEN) e benzo[a]pireno (B[a]P), durante quatro semanas	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% G	Porcentagem de germinação
2,4-D	Fitormônio 2,4 diclorofenoxiacético
AIB	Fitormônio Ácido indolbutírico
BioA1	Solo remediado através de bioestímulo (ajuste de pH) e bioaumento (adição de composto de resíduo sólidos urbanos com 7 meses de maturação fornecido pela COMLURB-RJ)
BioA2	Solo remediado através de bioestímulo (ajuste de pH) e bioaumento (adição de composto de resíduo sólidos urbanos com 2 meses de maturação fornecido pela COMLURB-RJ)
BioS	Solo remediado através de bioestímulo (ajuste de pH)
B[a]P	Benzo(a)pireno
B[a]P1	Meio MS suplementado com 0,001 mg/L de benzo[a]pireno
B[a]P2	Meio MS suplementado com 0,010 mg/L de benzo[a]pireno
B[a]P3	Meio MS suplementado com 0,100 mg/L de benzo[a]pireno
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno
COMLURB	Companhia Municipal de Limpeza Urbana do Rio de Janeiro
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTV	Cultura de tecidos vegetais
DCM	Diclorometano
DMS	Diferença mínima significativa
EAG	Equivalente de ácido gálico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER	Equivalente de rutina
FEN	Fenantreno
FEN1	Meio MS suplementado com 1,0 mg/L de fenantreno
FEN2	Meio MS suplementado com 5,0 mg/L de fenantreno
FEN3	Meio MS suplementado com 10,0 mg/L de fenantreno
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IG	Índice de germinação
IVG	Índice de velocidade de germinação
LABIFI	Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias - UERJ

LABPLAN	Laboratório de Biotecnologia de Plantas - UERJ
MS	Meio de cultura <i>in vitro</i> Murashige e Skoog (1962)
MS0	Meio MS sem suplementação
MSDCM	Meio MS suplementado contendo apenas diclorometano
NaClO	Hipoclorito de sódio
<i>ni</i>	número de sementes germinadas
OD	Óleo diesel comercial S50
O-glic-ramn	Oxigênio-glicosil-ramnosil
O-glic	Oxigênio-glicosil
P0,8	Solo argiloso contaminado com petróleo na concentração de 0,8%
P2,8	Solo argiloso contaminado com petróleo na concentração de 2,8%
RAS	Regras de Análise de Sementes do Ministério da Agricultura
RSU	Resíduo sólido urbano
SC	Solo comercial New solo - Verdi Max Art Paisagismo Ltda.
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency)

SUMARIO

	INTRODUÇÃO GERAL	21
1	PETRÓLEO	23
1.2	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	23
1.2.1	<u>Benzo[a]pireno</u>	26
1.2.2	<u>Fenantreno</u>	26
1.2.3	<u>Óleo Diesel</u>	26
2	LEGISLAÇÃO AMBIENTAL	28
3	RESPOSTAS VEGETAIS À CONTAMINAÇÃO	29
3.1	Respostas fisiológicas dos vegetais aos contaminantes	29
3.1.1	<u>Respostas vegetais aos HPAs</u>	29
3.1.2	<u>Germinação de sementes</u>	30
3.1.3	<u>Desenvolvimento vegetal</u>	31
3.1.4	<u>Desenvolvimento radicular</u>	32
3.1.5	<u>Desenvolvimento foliar</u>	33
4	METABOLISMO SECUNDÁRIO OU ESPECIAL	36
5	<i>RUTA GRAVEOLENS L.</i>	39
6	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	42
6.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>R. graveolens</i>	43
7	OBJETIVOS	45
7.1	Geral	45
7.2	Específicos	45
8	METODOLOGIA GERAL	46
8.1	Desenvolvimento vegetal em substrato contaminado	47
8.1.1.	<u>Material vegetal</u>	47
8.1.2	<u>Germinação <i>in vivo</i> em solo contaminado</u>	48
8.1.2.1	Substrato biorremediado e contaminado com petróleo	48
8.1.2.2	Substrato contaminado com óleo diesel	49
8.1.2.3	Desinfestação das sementes	51
8.1.2.4	Semeadura no experimento com solo biorremediado e contaminado com petróleo ..	51
8.1.2.5	Semeadura no experimento com solo contaminado com óleo diesel	53

8.1.3	<u>Germinação <i>in vitro</i> em meio de cultura contaminado com hidrocarbonetos</u>	54
8.1.3.1	Soluções de HPAs	54
8.1.3.2	Meio de cultura contaminado	54
8.1.3.3	Desinfestação das sementes.....	55
8.1.4	<u>Parâmetros de avaliação do processo germinativo</u>	56
8.1.5	<u>Cultura de tecidos vegetais</u>	57
8.1.5.1	Fonte de explantes	57
8.1.5.2	Meios de cultura	58
8.1.5.3	Resposta de plantas à presença dos contaminantes	59
8.1.6	<u>Avaliação da produção de metabólitos</u>	60
8.1.6.1	Quantificação dos Compostos Fenólicos	60
8.1.6.2	Quantificação dos Flavonoides Totais	60
8.1.6.3	Análise por CLAE-UV-EM.....	60
8.1.7	<u>Análise Estatística</u>	61
9	GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>RUTA GAVEOLENS</i> L. EM SOLO BIORREMEDIADO E SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO E DERIVADOS	62
9.1	Introdução	62
9.2	Material e Métodos	63
9.3	Resultados	66
9.3.1	<u>Velocidade do processo germinativo</u>	66
9.3.2	<u>Porcentagem de germinação</u>	67
9.3.3	<u>Sobrevivência das plântulas e alterações morfológicas</u>	69
9.4	Discussão	71
9.5	Conclusão	74
10	GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL <i>IN VITRO</i> DE ARRUDA SOB INFLUÊNCIA DE FENANTRENO E BENZO[A]PIRENO ...	76
10.1	Introdução	76
10.2	Material e Métodos	77
10.3	Resultados e Discussão	79
10.4	Conclusão	84
11	COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS PRODUZIDOS POR <i>RUTA GRAVEOLENS</i> L. COM EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> A FENATRENO E BENZO[A]PIRENO	86
11.1	Introdução	86
11.2	Materiais e Métodos	87

11.3	Resultados e Discussão	90
11.4	Conclusão	97
	CONCLUSÕES GERAIS	101
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	103
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE A - Trabalho apresentado no II Workshop Energy and Environment, 04 a 06 de julho de 2011, Rio de Janeiro/RJ.....	113
	APÊNDICE B - Trabalho apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 19 a 22 de setembro de 2011, Búzios/RJ.....	115
	APÊNDICE C - Trabalho apresentado no XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18 a 21 de setembro de 2012, Bento Gonçalves/RS.....	116
	APÊNDICE D - Trabalho apresentado no 63º Congresso Nacional de Botânica, 11 a 16 de novembro de 2012, Joinville/SC.	117
	APÊNDICE E - Artigo publicado no periódico “Desenvolvimento e Meio Ambiente”, v. 28, p. 41-55, jul./dez. 2013. Editora UFPR.	118
	APÊNDICE F - Comprovante de submissão de artigo no periódico “Pesquisa Agropecuária Brasileira” em 06 de fevereiro de 2015.....	134
	APÊNDICE G - Comprovante de submissão de artigo no periódico “Revista Brasileira de Ciência do Solo” em 11 de fevereiro de 2015.	136
	APÊNDICE H - Desenvolvimento pós-seminal de <i>R. graveolens</i> após 60 dias em solo contaminado artificialmente com OD.	138
	APÊNDICE I - Plântulas de <i>R. graveolens</i> após 60 dias em solo contaminado artificialmente com OD.....	139
	APÊNDICE J - Organogênese direta de <i>Ruta graveolens</i>	140
	APÊNDICE K - Cromatograma de <i>Ruta graveolens</i> expostas a benzo[a]pireno <i>in</i> <i>vitro</i> por 21 dias (MS0).....	141
	APÊNDICE L - Cromatograma de <i>Ruta graveolens</i> expostas a benzo[a]pireno <i>in</i> <i>vitro</i> por 21 dias (MSDCM).....	142
	APÊNDICE M - Cromatograma de <i>Ruta graveolens</i> expostas a benzo[a]pireno <i>in</i> <i>vitro</i> por 21 dias (B[a]P1).	143
	APÊNDICE N - Cromatograma de <i>Ruta graveolens</i> expostas a benzo[a]pireno <i>in</i> <i>vitro</i> por 21 dias (B[a]P2).	144
	APÊNDICE O - Cromatograma de <i>Ruta graveolens</i> expostas a benzo[a]pireno <i>in</i> <i>vitro</i> por 21 dias (B[a]P3).	145

ANEXO A - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) - óleo diesel S50.....	146
--	-----

INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação é um problema mundial que afeta ecossistemas terrestres, aquáticos e marinhos, atingindo, particularmente, a biomassa microbiana do solo e contribuindo para a bioacumulação de vários contaminantes na cadeia alimentar (GRATÃO et al., 2005). Entretanto, os poluentes químicos do solo também podem agir como agentes elicitores do metabolismo vegetal, ativando genes específicos nas rotas metabólicas e induzindo a formação de produtos secundários, o que normalmente funciona como uma estratégia de defesa da planta exposta a tais condições, consideradas estressantes (PLETSCH et al., 1999; TESTER e BACIC, 2005).

A tolerância dos vegetais às condições de estresse envolve respostas adaptativas relacionadas a processos moleculares e celulares (TESTER e BACIC, 2005). Tais condições podem afetar de diferentes formas o metabolismo vegetal, que responderá produzindo substâncias, por exemplo, com papel na sobrevivência da espécie no ecossistema (MARASCHIN e VERPORTE, 1999). Sendo assim, pode-se dizer que a biossíntese de metabólitos especiais está intimamente relacionada às condições ambientais, podendo ocasionar alterações, tanto nas rotas de síntese e degradação de compostos, quanto na expressão gênica em resposta a algum tipo de estresse (WILT e MILLER, 1992; NAGHDI BADI et al., 2004). Também são observadas alterações no crescimento e na quantidade, ou qualidade, dos produtos especiais produzidos (NAGHDI BADI et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Desta forma, estes vegetais desde ervas até árvores, são assim classificadas pela capacidade de produzir moléculas biologicamente ativas por meio de seu metabolismo especial. Estas moléculas, denominadas metabólitos especiais, estão presentes em extratos vegetais, sendo utilizadas tanto na terapêutica médica, como na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, servindo como fármacos, aromatizantes, flavorizantes e antioxidantes (YUNES et al., 2001). Os metabólitos secundários ou especiais não participam diretamente do crescimento e do desenvolvimento do vegetal, mas são responsáveis pela sobrevivência do organismo no meio que o cerca, garantindo a adaptação e sobrevivência da espécie no ecossistema (MARASCHIN e VERPORTE, 1999; SERAFINI et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004).

As condições consideradas estéreis, como na cultura de tecidos vegetais (CTV), permitem selecionar espécies vegetais com potencial para a fitorremediação/bioindicação. Além disto, possibilita a distinção das respostas do vegetal daquelas que são derivadas de microrganismos nativos existentes no solo. Entretanto, deve-se lembrar de que a resposta vegetal nestas condições não pode prever a reação do vegetal na exposição às substâncias químicas presentes no meio ambiente natural (REYNOSO-CUEVAS et al., 2008).

A investigação de alterações metabólicas e morfológicas em espécies vegetais, decorrentes da exposição aos agentes contaminantes é importante para elucidar o impacto que a contaminação ambiental pode causar no desenvolvimento vegetal, oferecendo alternativas para o uso de plantas em estratégias de recuperação e monitoramento ambiental (LASAT, 2002; MELO et al., 2009). Deste modo, o presente trabalho tem como finalidade estudar aspectos do desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de *R. graveolens*, baseando-se no conhecimento prévio de que espécies medicinais e/ou aromáticas podem responder fisiologicamente a determinadas situações de estresse ambiental aumentando a síntese de compostos de interesse.

1 PETRÓLEO

O uso do petróleo pela humanidade é citado na BÍBLIA (1988) desde a arca de Noé, a qual foi impermeabilizada com betume (Gênesis 7,14). Há cerca de 6.000 anos os povos bíblicos e os chineses utilizavam o petróleo para o cozimento, a iluminação e o aquecimento. Porém, até o século XIX a utilização deste recurso para tais fins se tornou escassa, o que impulsionou as primeiras tentativas de sua produção comercial (FARAH, 2008).

Originado da transformação de deposições fósseis, quando o petróleo entra em contato com o ambiente ele altera as suas características devido a fatores físicos, químicos e biológicos. Sendo assim ele se torna um poluente persistente no ambiente por um longo período, devido à lenta biodegradação dos hidrocarbonetos (MARANHO et al., 2006). Este poluente prejudica as condições hidrológicas e as propriedades químicas e físicas do solo, reduzindo drasticamente os conteúdos disponíveis de nitrogênio e fósforo para os organismos vegetais (CHUPAKHINA e MASLENNIKOV, 2004).

1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

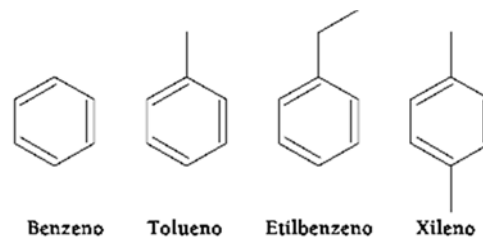
Considerados como substâncias pouco comuns na natureza, segundo a teoria de Engler-Höfer, os hidrocarbonetos do petróleo originam-se da combustão incompleta de matéria orgânica, principalmente proteínas, carboidratos e lipídios, que são os maiores precursores do petróleo. Esta matéria orgânica é convertida por bactérias e reações químicas de baixa temperatura (diagênese) em moléculas orgânicas de alto peso molecular contendo oxigênio e nitrogênio. No estágio seguinte (catagênese) ocorre a formação do betume, os chamados hidrocarbonetos complexos, que são “craqueados” em moléculas leves do petróleo líquido (SWERDLOW, 2000).

Os hidrocarbonetos representativos do petróleo incluem os alcanos (metano, etano e propano); os aromáticos conhecidos como grupamento BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) (Figura 1) e os policíclicos aromáticos conhecidos como HPAs (GERMIDA et al., 2002). Entretanto, nos derivados de petróleo 75% são hidrocarbonetos saturados derivados de parafina e 25% são hidrocarbonetos aromáticos (NJOKU et al., 2009; OGBO et al., 2009).

Caracterizados por serem compostos químicos constituídos basicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos, os HPAs possuem baixa solubilidade em água devido a suas moléculas apolares e hidrofóbicas. Isto ocasiona baixas taxas de metabolização do poluente quando este se encontra no meio

ambiente e caracteriza a sua persistência na contaminação (FISMES et al., 2002; LEMOS et al., 2009; MACHADO et al., 2013). Como existe a possibilidade de fusão dos anéis aromáticos e de suas várias posições (fazendo com que estes anéis possam ligar entre si), atualmente existem mais de 100 HPAs reconhecidos pelas instituições internacionais de química. Desde 1983 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) fixou 16 HPAs como poluentes prioritários, que são considerados possíveis ou prováveis carcinógenos (Tabela 1) (JACQUES et al., 2007).

















Figura 1 - Estrutura de molécula dos compostos monoaromáticos.



Determinados HPAs são mais fáceis de serem degradados que outros. Em geral os HPAs, como benzeno e xileno, são facilmente remediados porque são facilmente degradados na presença de oxigênio, são relativamente solúveis (o que os caracteriza como biodisponíveis) e podem servir como doadores primários de elétrons para muitas bactérias do solo. Entretanto, moléculas lipofílicas (como HPAs de quatro e cinco anéis) são mais difíceis de remediar, devido a sua baixa bioviabilidade, a forte absorção destes compostos no solo e a sua limitada habilidade de atravessar as membranas celulares (o que evita sua entrada no tecido vegetal e de microrganismos) (GERMIDA et al., 2002).

Em consequência das atividades industriais e antrópicas, o solo recebe quantidades relativamente altas de HPAs, fato que vem despertando interesse da comunidade científica devido a sua interferência no ecossistema (poluindo o solo, o ar, a fauna, a flora, as águas superficiais e subterrâneas). Estes compostos se tornam recalcitrantes e tendem a permanecer longos períodos no ambiente, aumentando a possibilidade de exposição de organismos vivos a estes compostos (JACQUES et al., 2007; MACHADO et al., 2013).

Tabela 1 - Algumas propriedades físico-químicas dos 16 HPAs prioritários, segundo US EPA.

HPA	Número de anéis	Fórmula química	Estrutura química	Peso mol (g/mol)	Solubilidade (mg/L)	Log K _{ow}
Naftaleno	2	C ₁₀ H ₈		128,17	31	3,17 - 3,45
Acenaftaleno	3	C ₁₂ H ₁₀		154,21	3,8	3,92
Acenaftileno	3	C ₁₂ H ₈		152,20	16,1	3,55 - 4,10
Antraceno	3	C ₁₄ H ₁₀		178,23	0,045	3,45 - 4,80
Fenantreno	3	C₁₄H₁₀		178,23	1,1	4,30 - 4,63
Fluoreno	3	C ₁₃ H ₁₀		166,22	1,9	3,91 - 4,32
Flouranteno	4	C ₁₆ H ₁₀		202,26	0,26	4,47 - 5,23
Benzo[a]antraceno	4	C ₁₈ H ₁₂		228,29	0,011	5,33 - 5,91
Criseno	4	C ₁₈ H ₁₂		228,29	0,0015	5,73 - 5,91
Pireno	4	C ₁₆ H ₁₀		202,26	0,132	4,50 - 5,32
Benzo[a]pireno	5	C₂₀H₁₂		252,32	0,0038	6,04 - 6,78
Benzo[b]fluoranteno	5	C ₂₀ H ₁₂		252,32	0,0015	5,78
Benzo[k]fluoranteno	5	C ₂₀ H ₁₂		252,32	0,0008	5,94 - 7,20
Dibenzo[a,h]antroceno	6	C ₂₂ H ₁₄		278,35	0,0005	5,80 - 6,88
Benzo[g,h,i]pireleno	6	C ₂₂ H ₁₂		276,34	0,00026	6,22 - 7,10
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	6	C ₂₂ H ₁₂		276,34	0,062	6,72 - 7,66

Fonte: Modificado de BOJES & POPE, 2007.

1.2.1 Benzo[a]pireno

O benzo[a]pireno (B[a]P) caracteriza-se por ser um composto irritante do sistema respiratório para humanos. Após ser absorvido pelo organismo, devido a sua característica lipofílica, pode causar danos nas hemoglobinas, resultando em anemia e supressão do sistema imunológico. Também é irritante da pele, podendo causar alergias e fotossensibilidade, além de ser carcinogênico (LUTTRELL e THOMAS, 2007).

Caracterizado por ser lipossolúvel à membrana celular, é rapidamente absorvido no organismo e descrito como metabolizado em culturas celulares de diferentes espécies vegetais. Por causa de sua alta hidrofobicidade, estes compostos apresentam uma estreita ligação às partículas do solo e são dificilmente biodisponíveis, sendo assim as plantas possuem a capacidade de sequestrar estes HPAs do solo (ALKIO et al., 2005).

1.2.2 Fenantreno

Apesar de ser um dos HPAs prioritários da US EPA, o fenantreno (FEN) não é mutagênico ou carcinogênico, porém é considerado tóxico para organismos aquáticos. Normalmente é encontrado em altas concentrações em amostras ambientais contaminadas por HPAs, por esta razão é considerado o composto modelo para estudos de degradação ambiental. Este composto também possui características semelhantes a outros HPAs que são carcinogênicos e é um dos menores que possui regiões específicas para enzimas em suas moléculas (GARCÍA e DORANTES, 2008).

1.2.3 Óleo Diesel

O óleo diesel (OD) é uma complexa mistura de hidrocarbonetos que podem ser persistentes no solo e no ambiente, contendo compostos voláteis, alcanos de baixo peso molecular e naftaleno. Os alcanos são potencialmente fitotóxicos e os naftaleno são compostos que podem interferir no desenvolvimento normal nos vegetais (ADAM e DUNCAN, 1999).

Dos óleos combustíveis de destilação média, o OD é o que tem maior conteúdo de HPAs e aromáticos totais, o que pode tornar mais difícil a sua remediação em casos de acidentes ambientais (ADAM e DUNCAN, 1999). Este óleo é constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos (10 - 40% v/v). Dos HPAs, estão

presentes os 16 listados pela US EPA e os BTEX (GAZZONI et al., 2010; ROJAS et al., 2011).

Uma alternativa para tornar o OD menos tóxico é a produção de biodiesel. O Biodiesel é originado a partir de fontes renováveis (girassol, soja, mamona), não é tóxico, é mais oxigenado, isento de enxofre e HPAs (GAZZONI et al., 2010). Objetivando deixar o OD comercial menos tóxico, este recebe a adição de 5% de biodiesel quando sai da refinaria, recebendo a denominação de “Diesel S50”. As características deste OD estão listadas no Anexo A.

2 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 420/2009, que “Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas”, determina valores de prevenção de investigação dos HPAs encontrados em solo e na água subterrânea. Dos 16 HPAs listados pela US EPA, 10 estão na listagem do CONAMA (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de prevenção e intervenção de HPAs listados no CONAMA nº 420/2009.

Substância	Nº CAS	Solo mg/kg p.s.				Água subterrânea µg/L
		Prevenção	Agrícola	Residencial	Industrial	Investigação
Antraceno	07/12/20	0,039	---	---	---	---
Benzo[a]antraceno	56-55-3	0,025	9	20	65	1,75
Benzo[k]fluoranteno	207-06-9	0,38	---	---	---	---
Benzo[g,h,i]pirileno	191-24-2	0,57	---	---	---	---
Benzo[a]pireno	50-32-8	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	218-01-9	8,1	---	---	---	---
Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	85-01-8	3,3	15	40	95	140
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	193-39-5	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	91-20-3	0,12	30	60	90	140

Legenda: (CAS) número de registro na Chemical Abstracts Service.

Os valores de referência (prevenção) são utilizados para o diagnóstico do solo e das águas subterrâneas. Estes valores servem para identificar que, em concentrações iguais ou menores a citadas, o solo pode ser considerado “limpo” e ser utilizado para qualquer finalidade. O valor de intervenção indica que existem riscos para a saúde de organismos e para o meio ambiente, sendo que valores acima deste indica a necessidade de implementar no local ações voltadas a sua remediação (JACQUES et al., 2007).

3 RESPOSTAS VEGETAIS À CONTAMINAÇÃO

3.1 Respostas fisiológicas dos vegetais aos contaminantes

Quando o vegetal possui a capacidade de resistir a contaminantes presentes no meio, pode ser capaz de acumulá-los ou transportá-los em seu organismo (GRATÃO et al., 2005). Muitas das respostas de sinalização celular de vegetais expostos a contaminantes, assim como proteínas envolvidas nestes processos, podem contribuir para a resposta efetiva de estresse celular. Estes mesmos mecanismos são necessários para identificar os mecanismos-chave que desencadeiam a rede de respostas celulares nestas situações (GRATÃO et al., 2005).

A poluição induz mudanças nos parâmetros individuais dos vegetais, podendo ser correlacionada com os níveis de contaminantes (OMOSUN et al., 2009). Outros fatores como o estágio de desenvolvimento do vegetal, o tempo de exposição e as diferentes estruturas químicas dos contaminantes, podem interferir nas respostas fisiológicas, refletindo nas concentrações destes contaminantes quando acumulados em diferentes partes do vegetal (SOARES et al., 2001; MACHADO et al., 2013).

Em relação à concentração dos elementos acumulados nos tecidos vegetais, estes estão intimamente relacionados com a disponibilidade do contaminante no meio ambiente. Sendo assim, o teor destes contaminantes nas raízes e nas folhas está vinculado à concentração do contaminante no ambiente (SOARES et al., 2001). A bioacumulação também depende diretamente de propriedades físico-químicas de cada poluente, assim como das espécies vegetais utilizadas e do tipo de tecido vegetal no qual o contaminante poderá ser acumulado (ABHILASH et al., 2008). A taxa de transpiração, inalterada ou aumentada, é considerada uma força que impulsiona a absorção e a translocação dos contaminantes, podendo ser responsável pelo aumento do acúmulo destes nas partes superiores e prevenindo a sua precipitação nas raízes e no sistema vascular (CHANDRA et al., 2009).

3.1.1 Respostas vegetais aos HPAs

Moléculas lipofílicas, como os HPAs de quatro e cinco anéis, são mais difíceis de remediar do que moléculas menores. A dificuldade de degradação destes compostos é um reflexo de sua limitada biodisponibilidade, assim como a sua limitada capacidade de atravessar membranas celulares. O acúmulo de HPAs em tecidos vegetais está relacionado com os constituintes lipídicos do tecido celular, isto é, afinidade deste composto pelos

lipídios. Quanto maior a composição lipídica do tecido, maior será o acúmulo deste poluente (GERMIDA et al., 2002).

O sequestro e o acúmulo de HPAs em vegetais geralmente baseia-se nas características químicas do hidrocarboneto, sendo o grupamento BTEX, moderadamente hidrofóbicos, efetivamente absorvidos pelo tecido vegetal. Vegetais com capacidade de acumular os HPAs podem expressar efeitos de intoxicação, tais como crescimento reduzido, resultado das modificações e fotosensibilização da exposição aos HPAs a radiação ultravioleta solar, quando estes penetram no tecido vegetal (GERMIDA et al., 2002).

Situações em que ocorre a inibição de germinação e do crescimento vegetal, com consequente morte das plantas, são indicadores da toxicidade aos hidrocarbonetos (MARANHO et al., 2006). Estas respostas de intoxicação podem ser resultantes da absorção de voláteis liberados ao redor do vegetal, da deposição de partículas contaminantes no solo e nas folhas (seguido pela retenção na cutícula foliar ou penetração nas folhas) e na transferência solo-raiz seguido pela subsequente translocação pela transpiração do vegetal (FISMES et al., 2002; GERMIDA et al., 2002).

3.1.2 Germinação de sementes

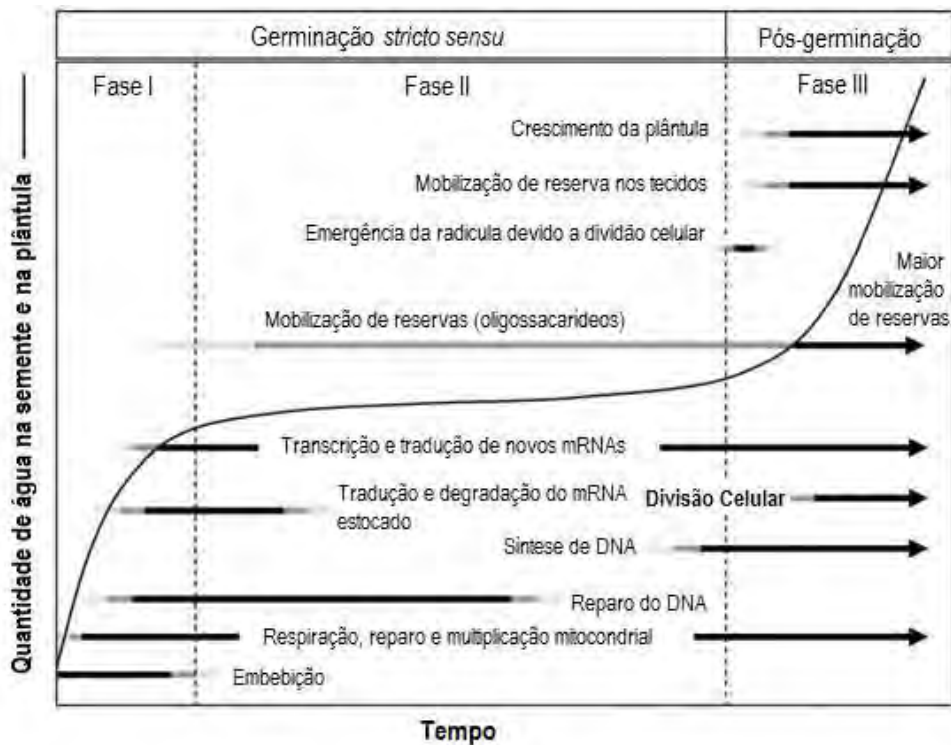
A germinação caracteriza-se por um processo no qual a semente passa por um período em que ocorrem importantes reações enzimáticas. Estes fenômenos permitem a emergência do embrião e manifestam a capacidade de originar um novo vegetal em condições ambientais favoráveis. Para os botânicos e tecnólogos de sementes, a germinação é a retomada de crescimento do embrião, com o rompimento do tegumento da semente pela protrusão de um órgão, como a radícula, manifestando a capacidade de originar uma planta normal (MACHADO et al., 2002).

Segundo Nonogaki e colaboradores (2010), a germinação inicia-se quando a semente absorve água e depois ocorre a emergência do embrião com a radícula e demais estruturas, em um período de tempo em que eventos físicos e metabólicos acontecem (Figura 2). Inicialmente a semente é embebida em água (fase I) até que as matrizes celulares e suas organelas estejam completamente hidratadas. No período seguinte ocorre a absorção de água e a ativação de organelas necessárias para a efetivação da germinação (fase II). O aumento da absorção da água acontece na fase III, onde ocorre a germinação de fato com a emergência da radícula devido ao aumento das divisões mitóticas e da expansão celular. Entretanto, em

algumas espécies, estes fenômenos não são bem definidos e o tempo decorrido entre as fases pode sofrer alterações.

Solos contaminados por óleo podem causar atraso na germinação vegetal. Este fato pode ser resultante da pouca umidade e aeração do solo, assim como pode ser atribuído à absorção do óleo aplicado no solo entrando em contato com as sementes e penetrando nestas, afetando o embrião (OMOSUN et al., 2009). A pouca aeração do solo pode ser decorrente das características hidrofóbicas do óleo, resultando na baixa troca de oxigênio entre o solo e a atmosfera, além do déficit de água que comprometeria a germinação e o desenvolvimento vegetal (NJOKU et al., 2009).

Figura 2 - Eventos físicos e metabólicos que ocorrem durante a germinação (fases I e II) e desenvolvimento da plântula (fase III).



Nota: A curva representa o tempo decorrido para que ocorra a absorção de água.

Fonte: NONOGAKI et al., 2010

3.1.3 Desenvolvimento vegetal

Segundo ALKIO e colaboradores (2005) plantas de *Arabidopsis* cultivadas *in vitro* em presença de FEN exibiram muitas características de estresse, tais como redução do crescimento radicular e do número de folhas. Os tricomas foliares apresentaram deformações anatômicas, além de apresentarem-se em tamanho e número reduzido. Entretanto, os autores

destacam que o pequeno tamanho das plantas pode ser atribuído a uma redução na divisão celular ou taxa de expansão vegetal. Já MALALLAH e colaboradores (1996) verificaram que plantas de *Vicia faba* tiveram uma redução significativa de biomassa quando desenvolvidas em solo contaminado por petróleo, em comparação a plantas que cresceram em solo sem o contaminante. Estas mesmas plantas apresentaram altos níveis de açúcares, fenóis, aminoácidos livres e prolina. O aumento da concentração de proteína é estabilizado em plantas em situações de estresse causado por dióxido sulfúrico, o que leva a crer que a síntese de proteínas e aminoácidos seria um mecanismo de detoxificação de óxidos de nitrogênio nas folhas das plantas.

De acordo com FISMES e colaboradores (2002), somente os HPAs de alto peso molecular são capazes de serem absorvidos pelas raízes e translocados ao xilema. Os autores consideram que os HPAs possuem características lipofílicas e uma estrutura molecular muito próxima a das giberelinas, que são substâncias que estimulam o crescimento do caule.

3.1.4 Desenvolvimento radicular

A existência de um sistema radicular eficiente nos vegetais permite a exploração de um grande volume de solo, assim como o suporte para muitas populações bacterianas nas rizosfera e ao seu redor, produzindo exsudatos que podem afetar diretamente a atividade da população de rizobactérias (GERMIDA et al., 2002). A rizosfera, região imediatamente ao redor da raiz onde ocorre a biodegradação de contaminantes orgânicos, afeta imensamente a atividade microbiana no solo. Neste local existe uma maior concentração dos nutrientes orgânicos oriundos das raízes, o que interfere na microbiota do solo através da liberação de células mortas, mucilagens, exsudatos, entre outras substâncias, que podem ser liberadas pelas raízes (DIAB, 2008).

A atividade de exsudação radicular pode dar indicações sobre as condições de estresse as quais o vegetal está envolvido (BENZARTI et al., 2008). O padrão de exsudatos radiculares é influenciado pela espécie vegetal, assim como seu estágio de desenvolvimento. A liberação dos exsudatos afeta a bioviabilidade dos contaminantes, pois estes atuam como os substratos primários para a degradação co-metabólica de poluentes e estimulam o crescimento de espécies biodegradadoras (GERMIDA et al., 2002).

GERMIDA e colaboradores (2002) destacam que os compostos químicos hidrofóbicos não são facilmente transportados para dentro do vegetal porque ficam aderidos a superfície

radicular, onde a proporção de lipídios é alta. Outros compostos, não tão hidrofóbicos, são facilmente absorvidos pelas raízes.

Os HPAs nos vegetais são absorvidos pela zona cortical das raízes, ou absorvidos pelas células radiculares, sendo posteriormente transferidos para as partes aéreas. Somente HPAs com baixo peso molecular são capazes de migrar para as partes aéreas, enquanto os de alto peso molecular são fortemente absorvidos pela epiderme radicular (FISMES et al., 2002).

Em relação ao óleo, existem situações que este pode formar uma camada hidrofóbica na superfície do solo, evitando a movimentação de oxigênio e ocasionando situações anaeróbicas para as raízes. Neste caso pode ocorrer maior ramificação das raízes, seja pela deficiência de oxigênio ou pela redução da disponibilidade de nutrientes (INCKOT et al., 2008). Outro efeito provocado pela presença do óleo no solo é a formação de uma película cobrindo as raízes, alterando a absorção de nutrientes e água, além da interferência do crescimento vegetal (MARANHO et al., 2006).

DIAB (2008) descreve que em estudo realizado com *Vicia faba* em solo contaminado com petróleo foi confirmada a habilidade de as raízes vegetais neutralizarem e/ou removerem os efeitos tóxicos de poluentes do óleo, fato este ocorrendo através dos exudatos, nutrientes e outras substâncias encontradas no solo. INCKOT e colaboradores (2008) em seu trabalho com *Mimosa pilulifera* exposta a solo contaminado por petróleo descrevem que esta planta apresentou visualmente maior densidade de pelos radiculares, o que aumentaria a superfície de absorção. Tal fato indicaria menor retenção de água no solo contaminado e baixa disponibilidade de fósforo. Os autores ainda observaram nas secções longitudinais da raiz que a região meristemática estava menos desenvolvida, provavelmente devido à presença de partículas tóxicas no petróleo (hidrocarbonetos).

3.1.5 Desenvolvimento foliar

Em ambientes com escassez de água, a área foliar é reduzida, tornando as folhas mais compactas. Esta característica adaptativa seria uma consequência de alterações morfológicas nos tecidos internos, como mesófilo espesso e parênquima paliçádico com células mais alongadas, impedindo a perda de água e conservando o suprimento de água limitado do solo por um período mais longo (TAIZ e ZEIGER, 2004). MARANHO e colaboradores (2006) descreveram que folhas de *P. lambertii* expostas ao petróleo apresentaram um aumento no espessamento, fato decorrente do alongamento das células do parênquima paliçádico,

tornando-o mais esponjoso, e em algumas regiões do limbo a formação de duas a três camadas de parênquima.

Com o objetivo de evitar a dessecação, vegetais expostos a estresse hídrico aumentam a sua capacidade de condução pela ampliação da região da nervura e reduzindo a distância de transporte. Sendo assim a superfície de transpiração torna-se reduzida e a área de sistema condutor aumentada (LARCHER, 2000).

A espessura da cutícula também é influenciada pelas condições ambientais adversas, pois desempenha um importante papel na limitação da evapotranspiração excessiva. Plantas expostas a condições de estresse hídrico, além da cutícula espessa, também podem apresentar paredes celulares mais espessas na epiderme (MARANHO et al., 2006).

Os HPAs podem ser transferidos para o vegetal através de partículas depositadas na cutícula ou ceras das folhas, ou através de gases pelos estômatos. Como os HPA são moléculas lipofílicas, são capazes de ultrapassar a cutícula pela solubilização nas ceras das folhas, mas também por apresentarem baixo peso molecular, possuindo a capacidade de penetrar mais facilmente na cutícula foliar, segundo FISMES e colaboradores (2002). Estes autores descreveram que a proporção de HPAs nas folhas foi reduzida juntamente com a redução da contaminação do solo, assim como HPAs de baixo peso molecular foram simultaneamente assimilados da atmosfera pelas folhas e do solo pelas raízes.

MARANHO e colaboradores (2006) descrevem que as folhas de *Podocarpus lambertii* expostas a solo contaminado com petróleo apresentaram redução de 75% no comprimento, 40% na largura e 78% na área foliar. Tal resultado demonstraria uma adaptação para o desenvolvimento desta espécie nesta condição de estresse, reduzindo a sua superfície de perda de água por transpiração. Esta resposta fisiológica leva a um decréscimo na fotossíntese e consequentemente no crescimento vegetal. Segundo estes autores, *P. lambertii* apresentou uma tendência ao aumento do número de estômatos na condição de estresse hídrico, sendo esta mesma condição apresentada em situações de alta concentração de poluentes e temperatura ambiental.

INCKOT e colaboradores (2008) descrevem alterações foliares em plantas cultivadas em solos contaminados por petróleo. Com *Mimosa pilulifera* estes autores identificaram a redução de espessura de eófilo (primeiros pares de folhas), resultante do menor desenvolvimento ocorrido na parte aérea destes vegetais. Porém, no mesmo trabalho, outros autores são citados, descrevendo deformações nos tricomas, aumento da espessura do limbo (devido ao aumento no tamanho e número de células do parênquima) e maior índice de estômatos (devido a indisponibilidade de água).

OMOSUN e colaboradores (2009) descreveram que a epiderme vegetal, quando exposta a óleo cru, apresentou-se irregular e muito sinuosa, com redução no número de estômatos por unidade foliar. Esta redução pode ser considerada um mecanismo de adaptação para reduzir a perda de água por transpiração.

O aparecimento de áreas de aclorose foi descrito por ALKIO e colaboradores (2005) em plantas de *Arabidopsis* expostas a FEN no cultivo *in vitro*. Estas áreas também apresentaram o aparecimento de necrose quando se ampliava o período de exposição. Estes mesmos autores relataram que o desenvolvimento destes sintomas iniciava-se nos tricomas e que, após um período de acúmulo do HPA nestes, ocorreria uma difusão deste poluente para as bases celulares, sendo posteriormente espalhados para as células adjacentes da base do tricoma, até ocorrer o seu colapso.

A superfície fotossintética e os constituintes foliares de clorofila são os fatores determinantes da produção de biomassa total nos vegetais (CHANDRA et al., 2009). Porém, na presença de contaminantes, como o petróleo, pode ocasionar respostas tóxicas nos vegetais, causando a destruição da clorofila e carotenoides (MALALLAH et al., 1996; CHUPAKHINA e MASLENNIKOV, 2004).

4 METABOLISMO SECUNDÁRIO OU ESPECIAL

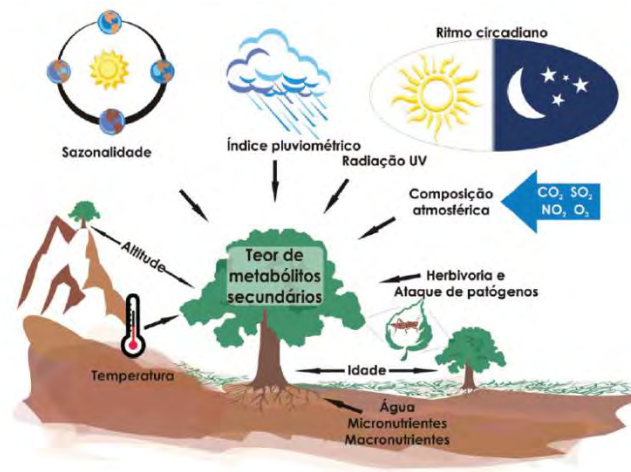
Os vegetais produzem muitos compostos orgânicos, sendo que sua maioria não participa diretamente do crescimento e desenvolvimento do organismo. As vias metabólicas primárias produzem poucos produtos finais, enquanto que as vias metabólicas secundárias produzem uma variedade de produtos, tais como terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos. Sendo assim, no metabolismo primário a célula utiliza os nutrientes circundantes e de baixo peso molecular para a atividade celular do organismo (HUSSAIN et al., 2012).

As rotas bioquímicas secundárias existentes nos vegetais permitem sintetizar muitas substâncias químicas, normalmente em resposta às condições ambientais (KENNEDY e WIGHTMAN, 2011). Este metabolismo, denominado metabolismo secundário ou especial, auxilia no seu crescimento, na defesa contra ataques de outros organismos e contra condições ambientais severas. O interesse na pesquisa destas substâncias se destaca pela produção de compostos de interesse para indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, quando possibilita incrementar a qualidade nutricional de alguns vegetais (nutracêuticos) (RODRÍGUEZ e INFANTE, 2011; HUSSAIN et al., 2012). Atualmente esta investigação mostra-se urgente, principalmente no caso dos antibióticos, devido à rápida propagação de bactérias e cepas patogênicas resistentes, o que resulta em graves problemas de saúde pública (DICKSCHAT, 2011).

Os metabólitos especiais representam uma interface química, caracterizada pela ampla interação molecular, entre os vegetais e o meio em que se encontra, sendo a maior rota na adaptação vegetal ao ambiente (Figura 3). Como a sua síntese é frequentemente afetada pelas condições ambientais e pela forte interação entre genótipo e fenótipo, a constância de concentração destes metabólitos nunca é uma regra (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; RODRÍGUEZ e INFANTE, 2011).

Os metabólitos podem ser específicos e únicos em uma espécie ou gênero vegetal, mas também podem ser produzidos e não desempenhar nenhum papel no vegetal. Estes metabólitos podem sofrer ação de fatores fisiológicos presentes nos próprios vegetais, tais como a idade e o desenvolvimento da planta, que podem influenciar não somente a quantidade do metabólito, como as proporções dos compostos. Os tecidos novos também podem apresentar maiores taxa fotossintética de metabólitos, assim como sua acumulação pode ocorrer em tipos celulares ou órgãos especiais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; KENNEDY e WIGHTMAN, 2011; MOHAMED e IBRAHIM, 2011).

Figura 3 - Fatores ambientais que podem afetar o conteúdo final de metabólitos especiais.



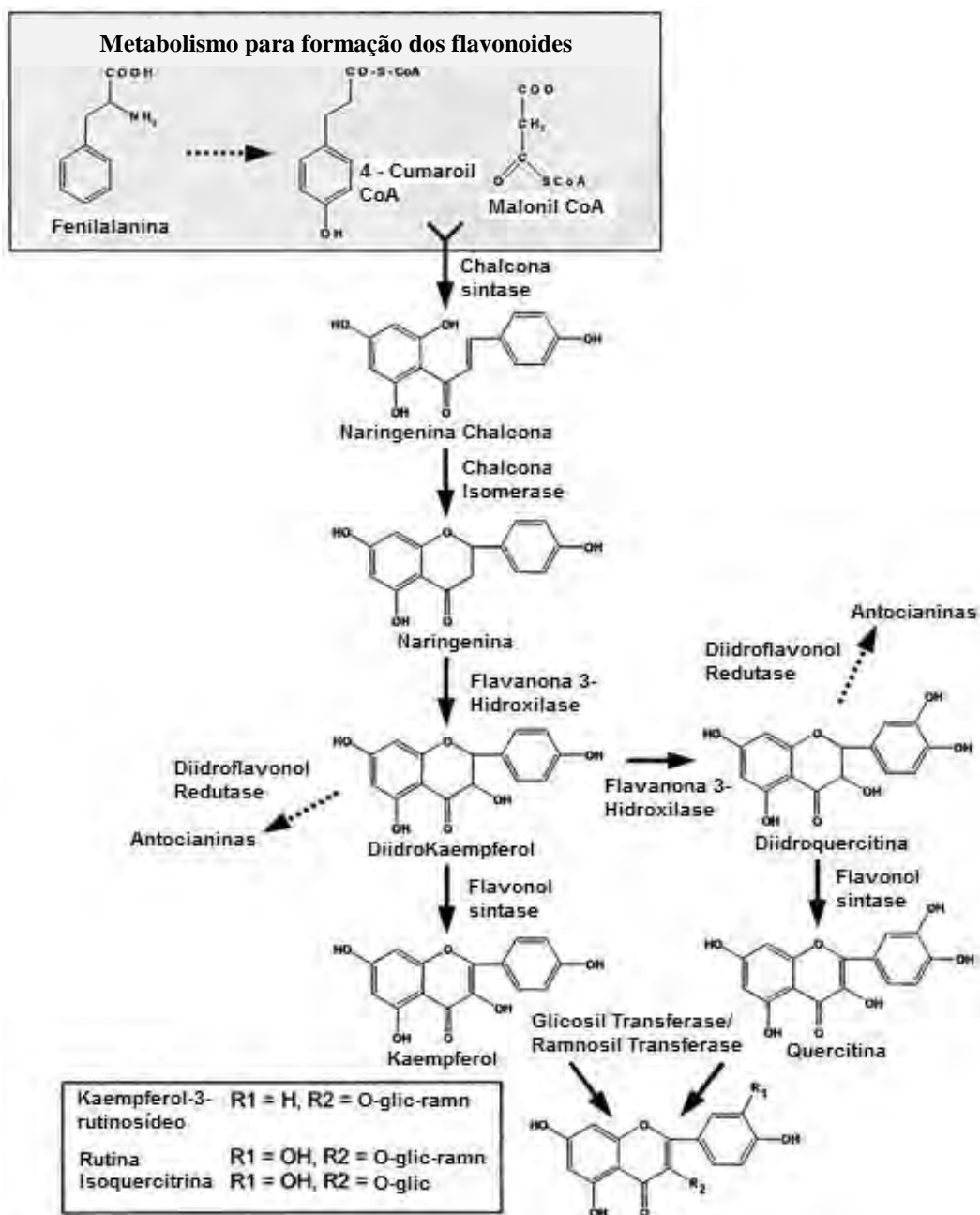
Fonte: GOBBO-NETO & LOPES, 2007.

Os flavonoides são compostos fenólicos de baixo peso molecular que ocorrem naturalmente nos tecidos vegetais, incluindo os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonóides, dihidroflavonois e estilbenos. Normalmente estão localizados na epiderme superior das folhas e possuem funcionalidade contra proteção ambiental, como radiação ultravioleta e defesa contra ataque de patógenos, atração de insetos polinizadores e sinalização de relações simbióticas (VERHOEYEN et al., 2002).

A rota biosintética de formação dos flavonoides (Figura 4) já foi bastante estudada nos vegetais, assim como a sua regulação e as enzimas envolvidas para a produção das variadas classes de flavonóides. Sua via de formação, que se dá por via rotassintética mista, pela via do malonato ou chiquímico (VERHOEYEN et al., 2002; HUSSAIN et al., 2012).

INCKOT e colaboradores (2008) descreveram a redução na quantidade de compostos fenólicos em espécies expostas a solo contaminado por petróleo. Esta redução estaria relacionada com a redução da quantidade de antioxidantes e na resistência da planta à contaminação. Por outro lado, relatou que em situação de estresse causado pela presença de óleo, plantas de *Vicia faba* apresentaram aumento na síntese de compostos fenólicos. Tal fato pode ser explicado pelas propriedades antioxidantes dos fenóis, atuando como fitoalexinas na resistência e estresse causado pelos hidrocarbonetos (MALALLAH et al., 1996).

Figura 4 - Rota de biossíntese dos flavonoides, incluindo a rutina, flavonoide predominante de *Ruta graveolens*.



Fonte: VERHOEYEN et al., 2002.

5 *RUTA GRAVEOLENS L.*

A *Ruta graveolens* L. tem sido uma das plantas-chave da farmacopeia europeia desde os tempos ancestrais. O termo “ruta” é derivado do grego e significa libertar, relacionado à capacidade de “limpeza de maus fluidos”. Suas propriedades foram reconhecidas por grandes autores gregos e romanos, tais como Hipócrates, Dioscórides e Plínio (ASGARPANAH e KHOSHKAM, 2012; DIWAN et al., 2012). É uma planta nativa da região mediterrânea e do sul da Europa que forma subarbustos perenes com aproximadamente 0,6 a 0,9 m de altura (Figura 5A), de ramos e folhas de coloração verde azulada. As folhas com 7,6 a 12,7 cm são compostas e pinuladas com segmentos de forma oblonga (Figura 5B), normalmente são carnudas e com aspecto opaco, formando uma folhagem forte e com cheiro ocre quando são lesionadas. As inflorescências paniculadas são pequenas e com flores amarelas, que florescem no verão cobrindo boa parte do subarbusto. Cada flor tem aproximadamente 1,3 cm com quatro pétalas côncavas (Figura 5C) (OLIVA et al., 2002; YAMASHITA et al., 2009; ASGARPANAH e KHOSHKAM, 2012).

Figura 5 - *Ruta graveolens*



Legenda: (A) *Habitus* arbustivo; (B) Detalhe da filotaxia; (C) Detalhe da inflorescência.

Fonte: ASGARPANAH & KHOSHKAM, 2012.

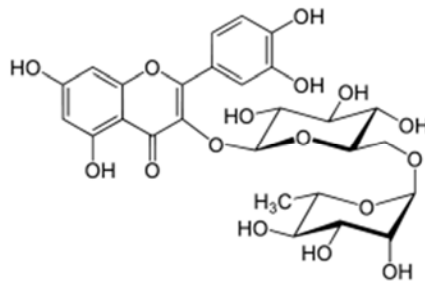
Conhecida popularmente no Brasil como “arruda” ou “ruta de cheiro forte” é uma planta aromática, utilizada na culinária e na medicina popular. Na América do Sul é cultivada como ornamental e medicinal, porém seu uso também se destaca na cultura popular contra situações maléficas (FAISAL et al., 2005), decorrentes de dificuldades das relações humanas.

Sendo mencionada em farmacopeias de 28 países, seu uso medicinal se destaca devido à presença de seus metabólitos especiais, sendo os flavonoides e os alcaloides as substâncias encontradas em maior quantidade. Dentre os compostos já identificados destacam-se os próprios flavonoides (quercitina e rutina), as cumarinas (como o psoraleno e bergapteno), os

ácidos orgânicos (ácido anísico e caprílico), os terpenóides (limoneno e pineno), as lactonas e as várias classes de alcalóides (OLIVA et al., 2002; FAISAL et al., 2005; KUZOVKINA et al., 2009; BENAIZIR et al., 2011). A presença de tais substâncias a permitem ser considerada como estimulante e diurética. Além de ter seu uso investigado em dermatoses, como psoríase e vitiligo, possui das suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (MASSOT et al., 2000; OLIVA et al., 2002; DIWAN et al., 2012).

Os compostos fenólicos compreendem um grupo de substâncias que apresentam estrutura química de carbono, tendo sua biossíntese e bioatividade afetadas pela a radiação ultra-violeta (PAVARINI et al., 2012). Os flavonoides, pertencentes ao grupo de compostos fenólicos, são descritos como substâncias antioxidantes, protegendo os tecidos contra radicais livres e peroxidação. A rutina (Figura 6), um dos constituintes mais conhecidos de *R. graveolens*, possui a capacidade de aumentar a resistência dos capilares sanguíneos evitando a ruptura destes e, conseqüentemente, as hemorragias (CRUZ et al., 2010; BENAIZIR et al., 2011). Esta substância também já foi descrita com propriedade antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória (BENAIZIR et al., 2011).

Figura 6 - Estrutura molecular da Rutina.

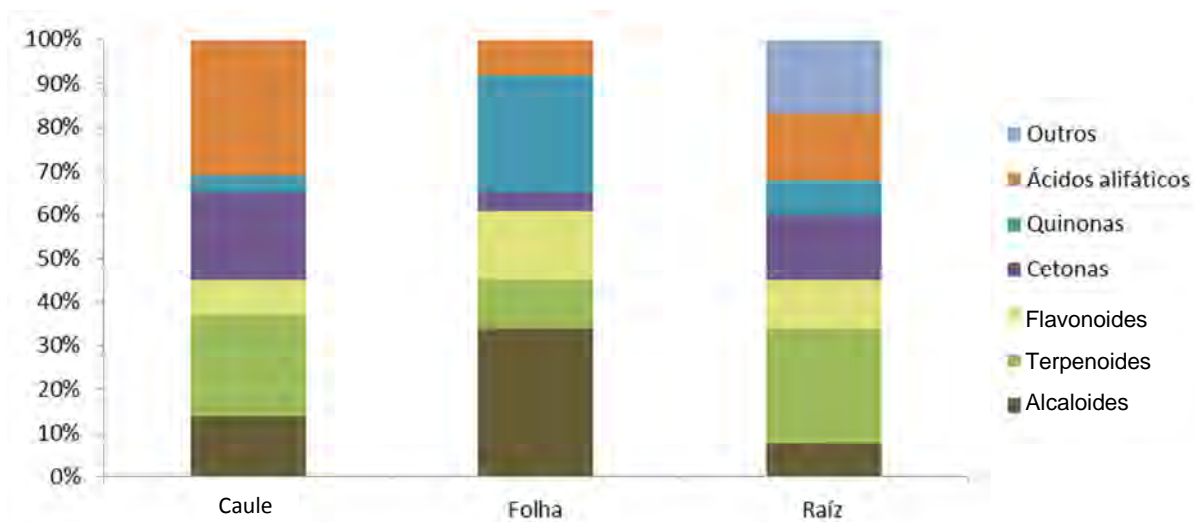


Todos os órgãos de *R. graveolens* possuem princípios ativos, que são-sintetizados nas raízes e nos brotos (Figura 7). Boa parte dos compostos fenólicos é encontrada nas folhas, principalmente depois da época de floração, porém o nível destes compostos pode variar conforme a estação, idade e local onde o vegetal se encontra (FAISAL et al., 2005; KUZOVKINA et al., 2009; BENAIZIR et al., 2011).

O óleo essencial de *R. graveolens*, devido à presença de glândulas pelúcidas, possui odor forte e um tanto pungente, sendo utilizado como anti-helmíntico, antiespasmódico, antiepilético e rubefaciente, devido a presença de cetonas, álcoois, ésteres e terpenos (FAISAL et al., 2005; SANTOS et al., 2009; BENAIZIR et al., 2011). Seu uso também se destaca na indústria farmacêutica e de cosméticos. Sabonetes de arruda são indicados no

controle de ectoparasitas (piolho) e a presença de metil-nonil-cetona no seu óleo essencial (80% a 90%), induz contrações uterinas e congestão pélvica levando a hemorragias uterinas, e, conseqüentemente, ao abortamento (FAISAL et al., 2005). Por esta razão é considerada tóxica e seu uso deve ser controlado.

Figura 7 - Perfil fitoquímico de extrato metanólico de *R. graveolens*.

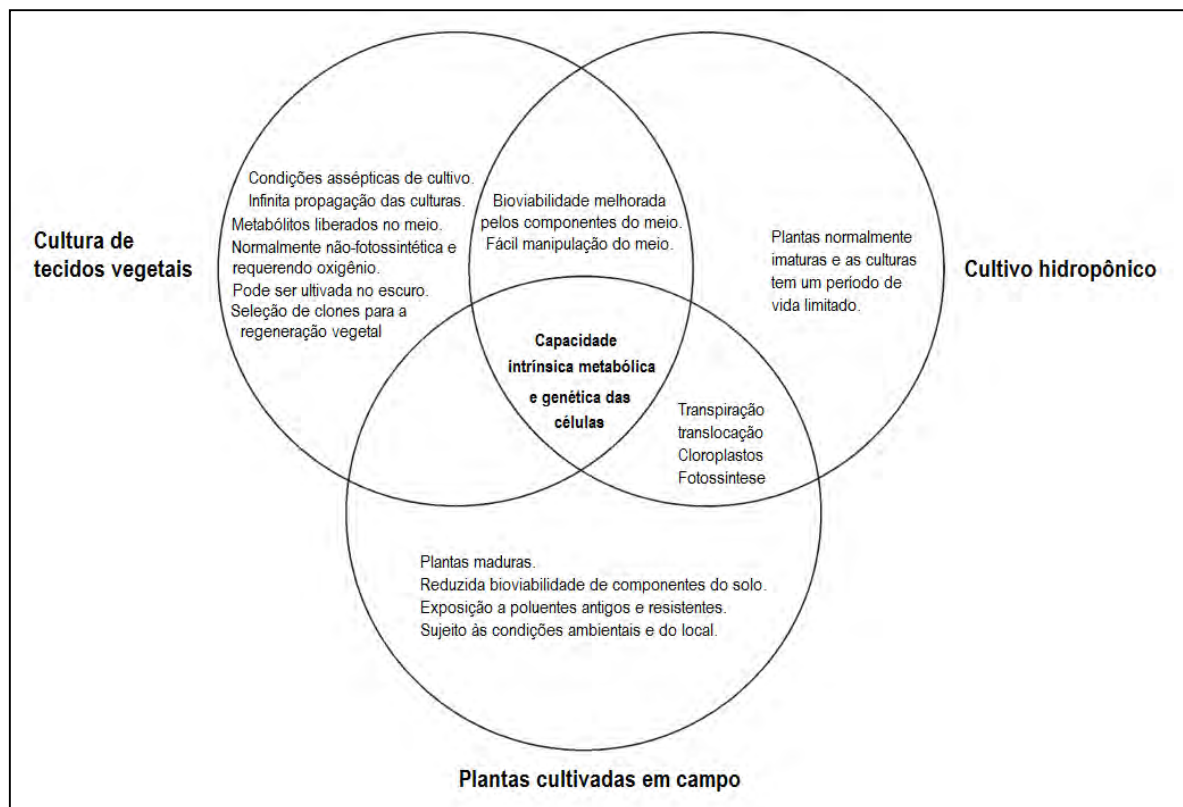


Fonte: BENAZIR et al., 2011.

6 CULTIVO *IN VITRO*

A pesquisa do cultivo vegetal *in vitro* tem sido aplicada como tecnologia alternativa para a produção de metabólitos especiais, viabilizando a síntese de diferentes produtos em relação à planta mantida em ambiente natural (CAI et al., 2011). Além disto, esta biotecnologia permite monitorar a capacidade das células vegetais em tolerar, assimilar, detoxificar e estocar muitos compostos orgânicos e poluentes. O ponto em comum desta técnica com outras mais convencionais está em favorecer a capacidade de expressão metabólica e genética das células vegetais, porém destaca-se pelas condições de cultivo assépticas, pela otimização da produção de metabólitos que podem ser liberados no meio de cultura e pela seleção de clones para a regeneração vegetal, entre outros aspectos (Figura 8) (DORAN, 2009).

Figura 8 - Características da cultura de tecidos vegetais, cultivo hidropônico e em campo.



Fonte: DORAN, 2009.

A cultura de tecidos vegetais (CTV) oferece uma boa alternativa para a obtenção de uma população vegetal estável, permitindo ainda a produção de moléculas bioativas em condições controladas e a possibilidade real de protocolos reproduzíveis. Nestas condições, alguns metabólitos vegetais podem ser acumulados em quantidades maiores do que na planta

parental, o que sugere que a produção de metabólitos especiais *in vitro* possui um grande potencial de uso em grande escala (CAI et al., 2011).

Esta técnica também se destaca devido ao tempo requerido para obter uma resposta ser reduzido, quando comparada com outros métodos de cultivo. Devido aos vegetais serem cultivados em um meio asséptico, as espécies utilizadas podem ser utilizadas para identificar as respostas e as capacidades metabólicas das células vegetais aos organismos que são encontrados na rizosfera (DORAN, 2009).

HUSSAIN e colaboradores (2012) destacam numa revisão sobre a abordagem para a produção *in vitro* de metabólitos especiais em plantas, que a principal vantagem da CTV é fornecer uma contínua e confiável fonte de produtos fitofarmacêuticos, podendo ser aplicada técnicas, onde os metabólitos demandados possam ser extraídos e ter a sua produção controlada.

Uma estratégia bastante utilizada na produção *in vitro* de metabólitos especiais é a utilização de elicitores bióticos ou abióticos. Na CTV este recurso pode desencadear a formação dos metabólitos ou incrementar a sua produção. Elicitor pode ser definido como uma substância que, quando introduzido em pequenas concentrações em um sistema celular vivo, inicializa ou induz a biossíntese de compostos específicos. Sendo assim, objetivando o rendimento elevado de compostos para a comercialização, muitas pesquisas têm focado no isolamento de substâncias, sua biossíntese em culturas celulares e a avaliação de suas atividades, selecionando plantas com alta produção de compostos. A adição de precursores ao meio de cultivo, métodos de transformação vegetal e técnicas de imobilização celular são algumas estratégias biotecnológicas empregadas (CAI et al., 2011; HUSSAIN et al., 2012).

6.1 Cultivo *in vitro* de *R. graveolens*

A CTV de *R. graveolens* desperta interesse devido à potencialidade de produção de metabólitos especiais de importância medicinal da espécie e também devido à manutenção das suas propriedades celulares e de seus tecidos (FAISAL et al., 2005; KUZOVKINA et al., 2009). MASSOT e colaboradores (2000) relatam que brotos de *R. graveolens* produzidos *in vitro* são ricos em furocumarinas. Já DIWAN e colaboradores (2012) descrevem que a CTV desta espécie tem sido investigada como uma fonte alternativa de antioxidantes naturais.

KUZOVKINA e colaboradores (2009) através do cultivo de raízes transformadas desta espécie sintetizaram metabólitos especiais que são típicos de raízes da planta intacta. Com isto demonstraram que estes metabólitos podem estar disponíveis por um longo período de

cultivo, assim como a possibilidade de dispor de material vegetal para análises de perfil fitoquímico e fisiológicas.

Embora as pesquisas sobre a propagação *in vitro* de *R. graveolens* já estejam bastante avançadas, incluindo respostas morfogênicas com diferentes tipos de meios de cultura (BOHIDAR et al., 2008), não há relato sobre a produção *in vitro* da espécie considerando o cultivo em presença de HPA e a avaliação de metabólitos de interesse por possível processo de elicitação.

Face ao exposto, o presente trabalho tem como finalidade estudar os aspectos do desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de *R. graveolens*, baseando-se no conhecimento prévio de que espécies medicinais e/ou aromáticas podem responder fisiologicamente a determinadas situações de estresse ambiental aumentando a síntese de compostos de interesse.

Tendo em vista a diversidade de temas estudados, o trabalho será apresentado em itens que correspondem aos manuscritos elaborados de cada tema abordado. Um quarto trabalho resultante das pesquisas que compõem a fundamentação teórica já foi publicado e encontra-se nos Apêndices.

7 OBJETIVOS

7.1 Geral

Este trabalho tem como finalidade avaliar as respostas morfológicas e metabólicas de *Ruta graveolens* (Rutaceae), sob ação dos hidrocarbonetos de petróleo fenantreno e benzo(a)pireno, tendo em vista o conhecimento prévio que espécies medicinais/aromáticas podem responder fisiologicamente a determinadas situações de estresse ambiental aumentando a síntese de compostos de interesse.

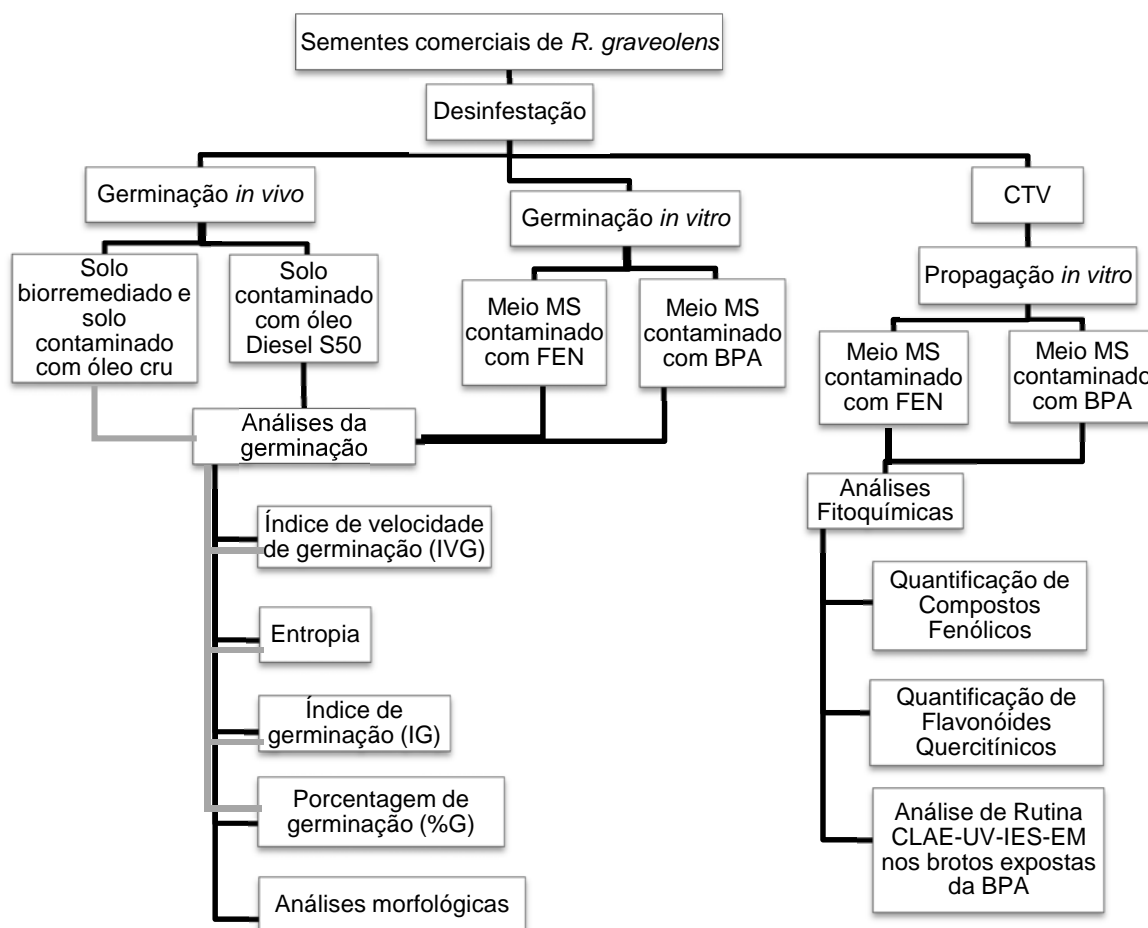
7.2 Específicos

- Avaliar o efeito do petróleo cru, do solo biorremediado e do óleo diesel sobre o processo germinativo sob condições *in vivo*;
- Avaliar o efeito de fenantreno e benzo(a)pireno sobre o processo germinativo sob condições *in vitro*;
- Avaliar o efeito de fenantreno e benzo(a)pireno sobre o desenvolvimento de brotos e a produção de rutina, sob condições *in vitro*;
- Analisar a influência de fenantreno e benzo(a)pireno sobre a produção de compostos fenólicos totais e flavonoides totais em brotos sob condições *in vitro*.

8 METODOLOGIA GERAL

O estudo foi desenvolvido em três etapas. A primeira etapa consistiu em avaliar a germinação de *R. graveolens* sob condições *in vivo* em solo biorremediado e solo contaminado com óleo cru. Depois foi avaliada a germinação em solo contaminado com óleo diesel. A segunda etapa consistiu em avaliar a germinação sob condições *in vitro* e seu desenvolvimento em meio contaminado com dois hidrocarbonetos selecionados (fenantreno e benzo[a]pireno). A terceira etapa envolveu experimentos de cultura de tecidos vegetais, para avaliar a capacidade de propagação e produção de metabólitos *in vitro* em meio contaminado com os hidrocarbonetos selecionados (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente estudo.



8.1 Desenvolvimento vegetal em substrato contaminado

8.1.1. Material vegetal

Para os testes de germinação *in vivo* e *in vitro*, assim como para o início da CTV, foram adquiridas sementes comerciais de *R. graveolens* da marca ISLA® (Figura 10). Para a CTV, as sementes (Figura 11) foram previamente desinfestadas e germinadas *in vitro*, conforme metodologia descrita nos itens 8.1.2.3 para o cultivo *in vivo* e 8.1.3.3 para o cultivo *in vitro*. Das plântulas obtidas *in vitro*, foram retirados os hipocótilos que se tornaram os explantes para a produção de brotos a serem utilizados na avaliação das respostas dos vegetais nos demais estudos *in vitro*.

Figura 10 - Embalagem das sementes comerciais de *R. graveolens* da marca ISLA®

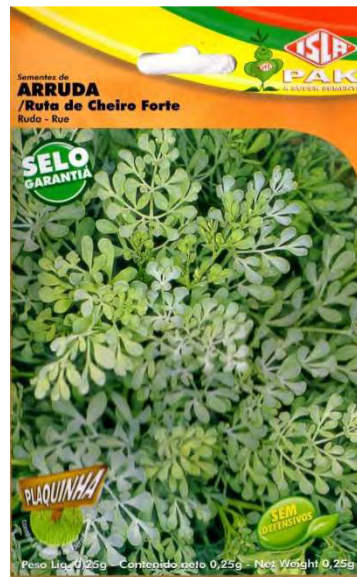
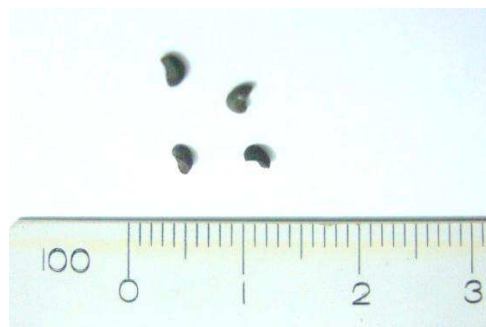


Figura 11 - Sementes de *R. graveolens* utilizadas para a germinação *in vivo* e *in vitro*.



8.1.2 Germinação *in vivo* em solo contaminado

Os testes de germinação *in vivo* e a contaminação do solo foi conduzida no Laboratório de Fitorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) da Faculdade de Engenharia.

8.1.2.1 Substrato biorremediado e contaminado com petróleo

A germinação *in vivo* foi conduzida em sete tipos de substrato: areia; solo comercial (SC) (New solo – Verdi Max Art Paisagismo Ltda.); solo argiloso contaminado com petróleo nas concentrações de 0,8% (P0,8) e 2,8% (P2,8) (peso/peso seco), sendo esta última contaminação feita de modo artificial; solo remediado através de bioestímulo (BioS) (ajuste de pH) e através de bioaumentação (com composto de resíduo sólidos urbanos - RSU - com 2 (BioA2) e 7 (BioA1) meses de maturação fornecido pela Companhia Municipal de Limpeza Urbana do Rio de Janeiro - COMLURB), fornecido pela equipe de Biorremediação do LABIFI.

Devido à consistência maça dos solos biorremediados, foi adicionado a todos os solos 2% de casca de coco (Nutriplast) (v.v-1) para permitir melhor drenagem no solo. No substrato areia, considerado o substrato controle, não foi adicionado casca de coco, visto que este é o substrato indicado para a realização de testes de germinação segundo as “Regras de Análise de Sementes do Ministério da Agricultura” (RAS) (Brasil, 2009).

Como a areia foi utilizada como substrato padrão, segundo metodologia indicada na RAS (Brasil, 2009), foi peneirada em peneira de 2,0 mm e autoclavada a 1 atm por 1 hora.

O solo contaminado com petróleo foi fornecido por uma empresa do setor (nome não divulgado), proveniente de uma mina de carvão, o qual apresentava contaminação de 0,8% com petróleo cru (dado fornecido pela empresa). A caracterização do solo franco-argiloso, análises químicas e físicas, foi realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Solos do Rio de Janeiro, sendo as características expostas na Tabela 3.

Parte do solo sofreu contaminação artificial com petróleo cru, também fornecido pela empresa (Figura 12). A contaminação consistiu de adicionar 2% (p/p seco) de óleo ao solo utilizado no teste e homogeneizar a solução manualmente. Após 15 dias para volatilização, o solo foi colocado nas caixas plásticas com subdivisão em células para semeadura e, posteriormente, semeado.

Tabela 3 - Caracterização química do solo utilizado no experimento de germinação de *R. graveolens* em solo contaminado com petróleo.

	Solo
Areia	404 g/kg
Argila	300 g/kg
pH	5,4
Ca ²⁺	7,2 cmol _c /kg
Mg ²⁺	1,5 cmol _c /kg
K ⁺	0,17 cmol _c /kg
Al ³⁺	0 cmol _c /kg
P assimilável	8 mg/kg
C orgânico	41,6 g/kg
N	1,8 g/kg

Nota: Realizada pela EMBRAPA Solos/Rio de Janeiro.

Figura 12 - Contaminação do solo com petróleo cru (P2,8) para a germinação de *R. graveolens*.



8.1.2.2 Substrato contaminado com óleo diesel

O solo utilizado para a contaminação com óleo diesel foi fornecido pela Embrapa Solos/RJ, caracterizado como areia-franca, sendo que a sua caracterização e análises químicas e físicas, foram realizadas pela Embrapa Solos do Rio de Janeiro (Tabela 4).

O óleo diesel (OD) comercial classificado como diesel metropolitano (S50) (Figura 13) foi adquirido em posto de venda de combustível da cidade do Rio de Janeiro/RJ e com características químicas e físicas detalhadas no Anexo I.

Tabela 4 - Caracterização química do solo utilizado no experimento de germinação de *R. graveolens* em solo contaminado com óleo diesel.

	Solo
Areia	812 g/kg
Argila	108 g/kg
pH	5,0
Ca ²⁺	1,7 cmol _c /kg
Mg ²⁺	0,5 cmol _c /kg
K ⁺	0,19 cmol _c /kg
Al ³⁺	0,4 cmol _c /kg
P assimilável	46 mg/kg
N	4,8 g/kg

Nota: Realizada pela EMBRAPA Solos/Rio de Janeiro.

Figura 13 - Pesagem do OD para contaminação do solo fornecido pela Embrapa-Solos.



Devido as diferentes concentrações de contaminação utilizadas, o experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa do experimento foram utilizadas as concentrações de 0%; 0,25%; 0,5%; 1,0% e 2,0% de OD (p/p seco), enquanto que na segunda etapa foram utilizadas as concentrações de 0%; 3,0%; 4,0%; 5,0% e 6,0% de OD (p/p seco).

Realizada a contaminação, o solo foi mantido em capela de exaustão a fim de volatilizar o OD por 15 dias. Após este período, o solo foi acondicionado nas bandejas de germinação contendo 60 células, previamente desinfestadas com NaClO 0,5 % e álcool 70% antes de receberem os substratos.

8.1.2.3 Desinfestação das sementes

Antes da semeadura, as sementes foram mantidas refrigeradas a 5-10 graus por sete dias, segundo descritas na RAS (BRASIL, 2009). Após este período as sementes foram previamente desinfestadas por imersão, em três ciclos de dez minutos em solução de hipoclorito de sódio (5%) e água destilada (Figura 14).

Figura 14 - Desinfestação das sementes *R. graveolens* por imersão em hipoclorito.



Nota: Sob agitação com agitador magnético

8.1.2.4 Semeadura no experimento com solo biorremediado e contaminado com petróleo

Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram mantidas nos substratos em pequenas estufas plásticas, cada uma contendo duas caixas plásticas com subdivisões em células para semeadura. As estufas plásticas e as caixas plásticas (Figura 15) foram previamente desinfestadas com NaClO 0,5 % e álcool 70% antes de receberem os substratos.

A germinação foi realizada em câmara de germinação (Figura 16) durante 28 dias para *R. graveolens*, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009). A estufas plásticas, contendo duas caixas plásticas com subdivisões em seis células para semeadura cada, mantidas durante o

período de análise na câmara de germinação, com fotoperíodo de oito horas e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Figura 15 - Substrato distribuído em caixa plástica.



Nota: Caixa plástica com subdivisão em células para semeadura.

A irrigação foi feita por aspersão manual de água destilada diariamente, segundo a necessidade de manter o substrato úmido para a germinação das plântulas e uma lâmina de água nas estufas plásticas.

Figura 16 - Germinação *in vivo* de *R. graveolens* em Câmara de germinação.



8.1.2.5 Semeadura no experimento com solo contaminado com óleo diesel

Feita a semeadura (Figura 17), as bandejas com o solo foram mantidas em estante de germinação (Figura 18), em sala climatizada, com temperatura média de 21°C, fotoperíodo de 8 h de luz (branca/Growlux®) e hidratadas diariamente com água destilada através de aspersão manual.

Figura 17 - Semeadura de *R. graveolens* em solo contaminado artificialmente com OD.



Figura 18 - Estante de germinação em sala climatizada do LABIFI/UERJ.



8.1.3 Germinação *in vitro* em meio de cultura contaminado com hidrocarbonetos

Os experimentos de germinação *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), ambos localizados no Campus Maracanã da UERJ.

As culturas foram mantidas em sala climatizada com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com 16 h de fotoperíodo durante a realização dos experimentos.

8.1.3.1 Soluções de HPAs

Devido a serem substâncias modelo utilizadas usualmente na pesquisa científica em solos contaminados por hidrocarbonetos e apresentarem diferenças químicas quanto a presença de anéis aromáticos, foram selecionados os hidrocarbonetos fenantreno (FEN) e benzo[a]pireno (B[a]P) para a realização dos experimentos *in vitro*. O padrão de FEN (98% de pureza) e B[a]P (96 pureza – grau HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Brasil. Estes padrões foram dissolvidos em diclorometano (DCM) (Tedia grau HPLC) para posterior adição ao meio de cultura.

8.1.3.2 Meio de cultura contaminado

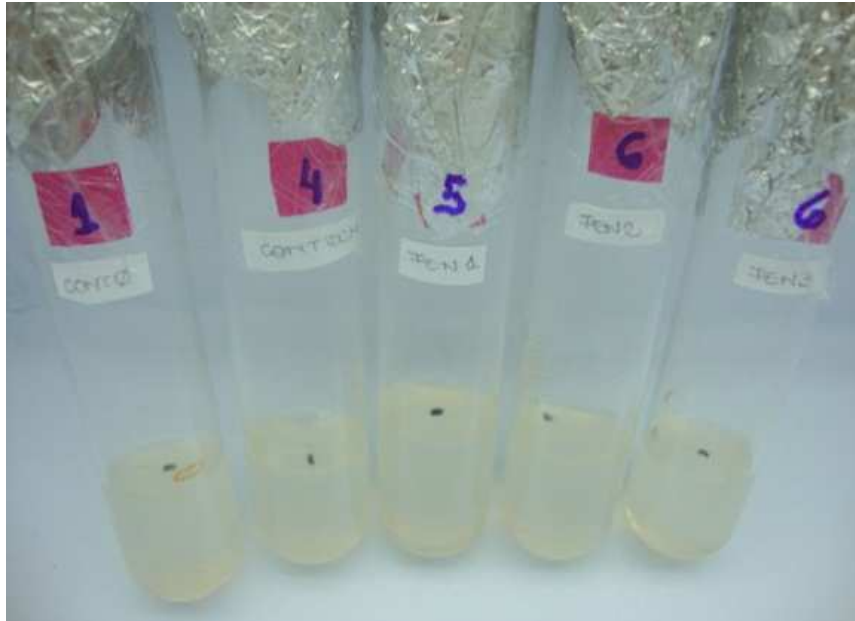
A germinação *in vitro* foi avaliada nos meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar, sendo o pH do meio ajustado com 0,1 M de ácido clorídrico (HCl) para 5,8. Este meio de cultura foi, ou não, suplementado com os HPAs isoladamente (FEN e B[a]P) após a autoclavagem.

As concentrações das soluções escolhidas serão de 1,0, 5,0 e 10,0 mg/L de meio para FEN-DCM e 0,001, 0,010 e 0,100 mg/L de meio para B[a]P-DCM. Para estes experimentos houve dois controles, um com DCM puro adicionado ao meio MS e outro composto de MS sem nenhuma suplementação. O meio MS suplementado com os HPAs, após a adição ao meio de cultura foi previamente autoclavado em capela de fluxo laminar, sendo mantido em sala climatizada por três dias, a fim de evitar a utilização de meio contaminado por manipulação errônea.

Após três dias, as sementes previamente desinfestadas foram adicionadas aos tubos de ensaio (15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) com 10 mL de meio MS contaminado

artificialmente com os HPAs. Os tubos de ensaio foram fechados com tampa de papel alumínio e selados com filme plástico (Figura 19).

Figura 19 - Sementes de *R. graveolens* inoculadas em tubos de ensaio com meio MS, suplementado ou não com a solução de FEN.



Nota: Tubos marcados com tarja vermelha, com meio MS suplementado com solução de FEN

Os tubos de ensaio com as sementes foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com 16 h de fotoperíodo por 28 dias para a análise da germinação e 60 dias para análises de crescimento e sobrevivência.

8.1.3.3 Desinfestação das sementes

As sementes adquiridas comercialmente foram desinfestadas através do seguinte procedimento, segundo protocolo modificado de FIGUEIREDO et al. (2001):

1°. Na bancada, as sementes foram separadas, lavadas com peneira em água corrente por cinco minutos. Após a lavagem, as sementes foram imersas em solução de água e detergente comercial (10 %) e agitadas por 10 minutos. Novamente as sementes foram lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada a fim de passarem pela continuação do processo de desinfestação na capela de fluxo laminar.

2°. Na capela de fluxo laminar, previamente esterilizada, as sementes foram colocadas em um frasco estéril com solução de NaClO (2,5 %) e uma gota de Tween® 20. Foram mantidas em

agitação por 20 minutos e depois lavadas três vezes em água destilada estéril por 5 minutos (cada banho). Após o último banho com água destilada estéril, as sementes foram colocadas para secar em papel filtro estéril, para posterior inoculação nos frascos.

8.1.4 Parâmetros de avaliação do processo germinativo

As análises foram realizadas periodicamente, em dias alternados, sendo registrado o número de sementes germinadas em cada substrato. Foram consideradas germinadas as sementes em que houve a protusão de uma das partes do embrião de dentro dos envoltórios, no caso a radícula (critério botânico). No caso das sementes germinadas em solo contaminado, as mesmas foram retiradas do solo e armazenadas para posterior análise, metodologia indicada na RAS (BRASIL, 2009) para não haver interpretação errônea no número de sementes germinadas.

Foram calculados a porcentagem final de sementes germinadas (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo a fórmula de Maguire (1962) (Equação 1), na qual G_1 , G_2 e G_n correspondem ao número de sementes germinadas nas contagens 1, 2 e n, respectivamente, enquanto o N_1 , N_2 e N_n correspondem ao número de dias após a semeadura.

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n} \quad \text{Equação 1}$$

A frequência relativa de germinação e a entropia (índice de sincronização) foram calculadas segundo estabelecido por LABORIAU & AGUDO (1987) (Equação 2), onde f_i corresponde à frequência relativa da germinação (Equação 3) e K corresponde ao último dia de observação da germinação.

$$E = \sum_{i=1}^K f_i \cdot \log_2(f_i) \quad \text{Equação 2}$$

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad \text{Equação 3}$$

O índice de germinação (IG) para as duas espécies nos diferentes substratos foi calculado segundo MARQUES et al. (2010) (Equação 4).

$$IG = \frac{\text{média de germinação no tratamento } X}{\text{média da germinação no tratamento controle}} \quad \text{Equação 4}$$

No experimento utilizando solo contaminado com OD, assim como na CTV, ao final do período de germinação, as plântulas germinadas foram mantidas por mais 30 dias no solo a fim de avaliar o comprimento da parte aérea e radicular, a massa fresca e a quantidade de folíolos desenvolvidos. Ao final deste período, as plântulas foram retiradas do solo, as raízes lavadas e secas manualmente. Estas plântulas tiveram a parte aérea e radicular medidas com régua milimétrica, número de folíolos desenvolvidos contados e pesadas em balança analítica eletrônica de precisão para avaliar a sua massa fresca.

8.1.5 Cultura de tecidos vegetais

8.1.5.1 Fonte de explantes

Foram germinadas 180 sementes de *R. graveolens* em meio MS0 para a obtenção de plântulas como fonte de explantes. Das sementes germinadas (Figura 20), após um mês, foram obtidas plântulas (Figura 21) das quais foi excisados os hipocótilos com 1 cm (parte do caule da plântula situada entre o ponto de inserção dos cotilédones e início da radícula) e recultivados para meio MS sem suplementação para estabelecimento de população clone. As plantas oriundas destes cultivos eram recultivadas a cada 15-20 dias para meio MS sem suplementação hormonal para manutenção do estoque *in vitro* (Figura 22).

Figura 20 - Sementes de *R. graveolens* germinadas em meio MS0.



Figura 21 - Plântulas de *R. graveolens* oriundas de sementes germinadas *in vitro*.



Nota: Plântulas das quais foram retirados os hipocótilos para estabelecimento de população clone

Figura 22 - Estoque *in vitro* de *R. graveolens* oriundas de sementes germinadas *in vitro*.



Nota: Estoque recultivado a cada 15/20 dias para meio MS sem suplementação hormonal

8.1.5.2 Meios de cultura

Para a germinação das sementes, utilizou-se meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar, sendo o pH do meio ajustado com 0,1 M de ácido clorídrico (HCl) para 5,8. O meio foi distribuído em frascos pequenos 10

mL fechados com tampa plástica e selados com filme plástico, sendo autoclavados por 15 min a uma atmosfera.

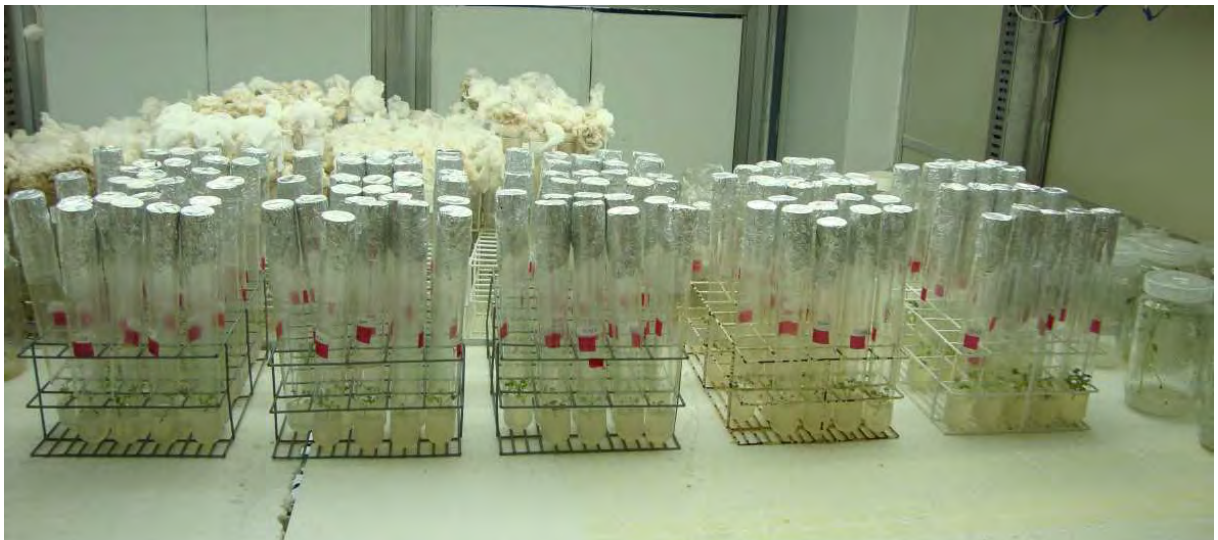
8.1.5.3 Resposta de plantas à presença dos contaminantes

A resposta *in vitro* dos brotos de *R. graveolens* foi avaliada nos meios de cultura MS suplementado e não suplementado com os HPAs isoladamente (FEN e B[a]P) e ao mesmo tempo, seguindo o mesmo procedimento descrito nos itens 8.1.3.1 e 8.1.3.2.

Os brotos provenientes de população clonal já estabelecida *in vitro*, foram adicionados aos frascos (10 cm de altura e 7 cm de diâmetro) com 30 mL de meio MS contaminado artificialmente com os HPAs. Os frascos foram fechados com tampa plástica e selados com filme plástico (Figura 23).

Durante o período de 30 dias, a cada dois dias, foram realizadas análises do perfil fitoquímico, da quantificação de compostos fenólicos e de flavonoides totais.

Figura 23 - Brotos de *R. graveolens* oriundas de sementes germinadas *in vitro*, utilizadas nos experimentos de avaliação das respostas a fenantreno e benzo(a)pireno sob condições *in vitro*.



8.1.6 Avaliação da produção de metabólitos

8.1.6.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos

A quantidade de compostos fenólicos totais em cada repetição foi determinada através de técnica colorimétrica Folin-Ciocalteu (adaptada de SINGLETON et al., 1999) .

O material vegetal fresco (1g) foi submetido a extração em 10 mL de metanol 80%, colocado no ultrassom por 10 min, filtrado a vácuo e centrifugado a 7.000 rpm por 7 min a 20°C. Em 100 µL de extrato (sobrenadante do filtrado) foi adicionado 1,5 mL de água e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu e, após 2 minutos, 300 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Após 30 minutos a 20°C no escuro foi realizada a leitura a 765 nm, sendo o branco composto de 70 µL de água. A quantidade de compostos fenólicos totais foi calculada utilizando curva analítica estabelecida com ácido gálico (5 µg/ml a 25 µg/ml) e expressa em mg em equivalente de ácido gálico (EAG)/g de peso fresco.

8.1.6.2 Quantificação dos Flavonoides Totais

A quantidade de flavonoides em cada repetição foi determinada através de técnica colorimétrica (adaptada de PARK et al., 1998 e NAGAI et al. 2003).

O material vegetal fresco (1g) foi macerado em 10 mL de metanol 80%, colocado no ultrassom por 10 min, filtrado a vácuo e centrifugado a 7.000 rpm por 7 min a 20°C. Em 250 µL de extrato (sobrenadante do filtrado) foi adicionado 2,5 mL de álcool 96°, 50 µL de acetato de potássio 1 M (CH₃COOK) e 50 µL de nitrato de alumínio 10 % (p/v) (AlNO₃). A solução foi lida a 415 nm, sendo o branco composto de metanol 80 %. A quantidade de flavonóides foi calculada utilizando curva analítica estabelecida com rutina (10 µg/ml a 50 µg/ml) e expressa em mg em equivalente de rutina (ER)/g de peso fresco.

8.1.6.3 Análise por CLAE-UV-EM

As análises por CLAE-UV-EM (cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria no ultravioleta e espectrometria de massas) foram realizadas na central analítica do Instituto de Química da UERJ, através de técnica adaptada de WAKSDMUNDZKA-HAJNOS e SHERMA (2011).

Para esta análise foi utilizado o equipamento Shimadzu® composto pelo degaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC), detector de UV comprimento de onda fixo (SPD20A) em 254 nm, forno (CTO20A) e interface (CSM20A). Coluna Thermo Scientific® RP18 (25 cm x 4,6 mm X de 5µm). O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min sem programação de temperatura, enquanto a fase móvel teve gradiente do tipo rampa que iniciou com 100 % de água MilliQ acidificada com ácido acético glacial (Sigma-Aldrich®) a pH 3,0 e 0 % de acetonitrila (Tedia®) e em 120 minutos inverteu-se para água acidificada 0 % e acetonitrila 100 %, finalmente em 126 minutos foi restabelecida a condição inicial.

A identificação da rutina (98% de pureza- adquirido da Sigma-Aldrich®) foi realizada através da comparação dos tempos de retenção do padrão rutina e dos seus respectivos espectros de massas, sendo esta a forma segura de identificação das substâncias quando é utilizado padrão adequado. Segundo estas análises, pode-se comprovar que não houve variação na composição química das plantas expostas às condições testadas.

8.1.7 Análise Estatística

Para os experimentos de germinação em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado foram realizadas duas repetições com 24 sementes cada, totalizando 48 sementes em cada tratamento. Nos experimentos com OD foram realizados cinco repetições com 60 sementes cada, totalizando 300 sementes em cada tratamento. Nos experimentos de germinação *in vitro* foram realizados quatro repetições com 20 sementes cada, totalizando 80 sementes em cada tratamento. E nos experimentos de resposta da síntese de metabólitos secundários *in vitro* foram realizados quatro repetições com 18 brotos cada, totalizando 72 brotos em cada tratamento. Em todos os experimentos foram realizadas três análises em cada período por tratamento.

Os dados de cada experimento foram processados utilizando o software Microsoft® Office Excel e os resultados analisados através da Análise de Variância (ANOVA - one-way) utilizando-se o software IBM SPSS Statistics 20®. As médias foram separadas pelo teste de Tukey ou DMS (Diferença Mínima Significativa), ao nível de 95 % ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi proposto avaliar os aspectos do desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de *R. graveolens*, na presença de petróleo e derivados, assim como de hidrocarbonetos de petróleo. Do exposto, foi possível concluir:

a) Desenvolvimento *in vivo*:

- As sementes de arruda apresentaram menor capacidade de germinação em solos contaminados e em seguida biorremediados com contaminação remanescente, principalmente em solos biorremediados através do processo de bioestímulo;
- Em solos recém-contaminados por óleo cru e óleo diesel, as sementes de arruda apresentaram capacidade de germinar, porém o desenvolvimento pós-seminal foi afetado nas concentrações acima de 0,5% de óleo diesel;
- O comportamento germinativo das sementes de arruda nas condições testadas indica que a espécie tem potencial para uso em biomonitoramento de solos contaminados.

b) Desenvolvimento *in vitro*:

- Na exposição *in vitro* aos hidrocarbonetos selecionados, as sementes de arruda germinaram e apresentaram capacidade de desenvolvimento e produção de biomassa nas concentrações de até 10 mg/L de fenantreno e de até 0,1 mg/L de benzo[a]pireno;
- A tolerância demonstrada pela espécie para germinar *in vitro* na presença dos dois hidrocarbonetos selecionados, a habilita para o cultivo em áreas contaminadas nos níveis investigados;
- Nos experimentos de propagação *in vitro*, a morfogênese ocorreu na ausência de fitoreguladores e com suplementação de contaminantes;
- A propagação e multiplicação *in vitro* não foi prejudicada pela presença dos dois hidrocarbonetos no meio de cultura e os brotos mantiveram o seu desenvolvimento na presença das substâncias.

c) Análises fitoquímicas:

- Mesmo na presença dos contaminantes, foi observada a produção de metabólitos de interesse, sem mudanças significativas nos níveis de compostos fenólicos e flavonoides totais produzidos;
- A suplementação do meio com benzo[a]pireno não alterou o perfil fitoquímico da espécie quanto à presença de rutina, marcador fitoquímico da espécie, segundo análises cromatográficas dos extratos metanólicos;
- *R. graveolens* demonstrou tolerância e adaptação fisiológica à presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos protocolos propostos e, portanto, possui potencial para o cultivo em áreas contaminadas nos níveis investigados, sem alterar seu perfil fitoquímico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram avaliados aspectos relacionados ao desenvolvimento e ao metabolismo dos fenilpropanóides no cultivo *in vivo* e *in vitro* de *R. graveolens* à exposição de derivados de petróleo, assim como de seus hidrocarbonetos. Foi verificado que a espécie apresentou tolerância nas duas condições (*in vitro* e *in vivo*) aos hidrocarbonetos selecionados (fenantreno e benzo[a]pireno) e ao óleo cru, respectivamente. Dessa forma, torna-se viável o planejamento de futuros experimentos a campo com plantas adultas, a fim de avaliar a resposta da espécie neste estágio de desenvolvimento. A análise de plantas em experimentos sob condições naturais pode ser útil na avaliação da síntese de metabólitos de importância medicinal, dentro da perspectiva de interesse da indústria farmacêutica, que exige produção em maior escala.

Nos experimentos realizados *in vitro*, tanto de germinação quanto de propagação, foram obtidas plantas com aspecto fenotipicamente normal, o que permite o uso destes materiais em experimentos para avaliação de outros contaminantes e condições. O monitoramento fitoquímico pode indicar a seleção de plantas com alta atividade metabólica, levando à investigação de substâncias de interesse que possam ser induzidas na presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Os estudos realizados apontam para a possível utilização de espécies aromáticas/medicinais, além da espécie estudada, no biomonitoramento de áreas degradadas, assim como na pesquisa mais aprofundada de produção de metabólitos de interesse que possam ser produzidos sob tais condições.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area. *Chemosphere*, v. 72, n. 1, p. 79-86, May 2008.
- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2014.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental pollution*, v. 120, n. 2, p. 363-370, 12// 2002.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. . *Environmental Geochemistry and Health*, v. 21, p. 353-357, 1999.
- AHAMMED, G. J. et al. The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 80, p. 132-139, 2012.
- ALKIO, M. et al. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of experimental botany*, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, 2005.
- ASGARPANA, J.; KHOSHKAM, R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta Graveolens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 6, n. 23, p. 3942-3949, 2012.
- ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- BENAZIR, J. F. et al. Phytochemical profiling, antimicrobial and cytotoxicity studies of methanolic extracts from *Ruta graveolens*. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, n. 5, p. 1407-1409, 2011.
- BENZARTI, S.; MOHRI, S.; ONO, Y. Plant response to heavy metal toxicity: Comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfafa. *Environmental Toxicology*, v. 23, n. 5, p. 607-616, 2008.
- BÍBLIA. *A Bíblia sagrada / tradução na linguagem de hoje*. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 1988. 384
- BOHIDAR, S.; THIRUNAVOUKKARASU, M.; RAO, T. V. Effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of 'garden rue' (*Ruta graveolens* L.). *International Journal of Integrative Biology*, v. 3, n. 1, p. 36-43, 2008.
- BOJES, H. K.; POPE, P. G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 47, n. 3, p. 288-95, 2007.

BRASIL. *Regras para análise de sementes*. Brasil: MAPA/ACS, 2009. 339 p.

CAI, Z. et al. Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 7, p. 1411-1416, 2011.

CHANDRA, R. et al. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, n. 2-3, p. 1514-1521, 3/15/ 2009.

CHUNLONG, C. et al. Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in Ejina oasis, Inner Mongolia, China. *Acta Ecologica Sinica (International Journal)*, v. 28, n. 1, p. 69-75, 2008.

CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V. Plant Adaptation to Oil Stress. *Russian Journal of Ecology*, v. 35, n. 5, p. 290-295, 2004/09/01 2004.

CONAMA. *Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 420*. “Dispõe sobre os critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas”. Resolução Diário Oficial da União, n. 249, 30 dez., 2009.

CRUZ, E. L. L. O. et al. Atividade estrogênica de *Ruta graveolens* em ratas. *Revista Interdisciplinar NOVAFAPI*, v. 3, n. 4, p. 14-17, 2010.

DEBIANE, D. et al. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 120-127, 2008.

DIAB, E. A. Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the rhizosphere effects. *Global Journal of Environmental Research*, v. 2, n. 2, p. 66-73, 2008.

DICKSCHAT, J. S. Biosynthesis and function of secondary metabolites. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 7, p. 1620-1621, 2011.

DIEZ LAZARO, J.; KIDD, P. S.; MONTERROSO MARTINEZ, C. A phytogeochemical study of the Tras-os-Montes region (NE Portugal): possible species for plant-based soil remediation technologies. *The Science of the total environment*, v. 354, n. 2-3, p. 265-77, Feb 1 2006.

DIWAN, R.; SHINDE, A.; MALPATHAK, N. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

DORAN, P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and bioengineering*, v. 103, n. 1, p. 60-76, May 1 2009.

EZE, C. N. et al. Effects of Bonny light crude oil contamination on the germination, shoot growth and rhizobacterial flora of *Vigna unguiculata* and *Arachis hypogea* grown in sandy loam soil. *Scientific Research and Essays*, v. 8, n. 2, p. 99-107, 2013.

EZE, C. N. et al. Evaluation of germination, shoot growth and rhizofungal flora of *Zea mays* and *Sorghum bicolor* in soil contaminated with varying levels of Bonny light crude oil *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* v. 3, n. 1, p. 253-263, 2014.

FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M. *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. - A multipurpose shrub. *HortScience*, v. 40, n. 5, p. 1478-1480, August 2005 2005.

FARAH, M. A. *Caracterização do petróleo e seus produtos*. Rio de Janeiro: Petrobras, 2008.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (jacq.) Baill. *In Vitro Cell Developmental Biology*, v. 37, p. 471-475, 2001.

FISMES, J. et al. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* v. 31, p. 1649-1656, 2002.

GAO, Y.; LI, H.; GONG, S. Ascorbic acid enhances the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in roots of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *PloS one*, v. 7, n. 11, p. e50467, 2012.

GARCÍA, M. H.; DORANTES, A. M. R. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. *Polibotânica*, v. 25, p. 101-119, 2008.

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

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. Netherlands: 2008.

GERMIDA, J. J.; FRICK, C. M.; FARRELL, R. E. Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Developments in Soil Science*, v. 28, n. 2, p. 169-185, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOGOSZ, A. 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.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, p. 53-64, 2005.

HAIDA, K. S. et al. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 28, p. 11-19, 2011.

HUSSAIN, M. S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2012.

INCKOT, R. C. et al. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. *Rodriguésia*, v. 59, n. 3, p. 513-524, 2008.

IZBIAŃSKA, K.; ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; DECKERT, J. Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 110, p. 61-67, 2014.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, v. 2, p. 32-50, 2011.

KORADE, D. L.; FULEKAR, M. H. Effect of organic contaminants on seed germination of *Lolium multiflorum* in soil. *Biology and Medicine*, v. 1, n. 1, p. 28-34, 2009.

KUMMEROVÁ, M. et al. Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea *in vitro* using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. *Plant Growth Regulation*, v. 61, n. 2, p. 161-174, 2010.

KUMMEROVÁ, M. et al. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere*, v. 71, n. 11, p. 2050-9, May 2008.

KUZOVKINA, I. N. et al. Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 56, n. 6, p. 846-851, 2009.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of germination in *Salvia hispanica* L. temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 59, n. 11, p. 37-56, 1987.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa, 2000. 365

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, v. 31, p. 109-120, 2002.

LEMOS, J. L. S.; SCHLITTLER, L. A. F. S.; PEREIRA JR, N. Técnicas de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. *Diálogos Ciência - Revista da Rede de Ensino FTC*, n. 11, p. 47-58, 2009.

LEMOS, R. C. D.; SANTOS, R. D. D. *Manual de descrição e coleta no campo*. 3a. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. 84 p.

LEMOS, S. D. C. *Avaliação de eliciadores do metabolismo dos fenilpropanoides em Melissa officinalis L. (Lamiaceae)*. 2006. 85 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LENCINA, K. H. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grábia. *Ciência Rural*, v. 44, p. 1025-1030, 2014.

LOPES, J. A. *Estudo em escala piloto de parâmetros de monitoramento e operação de biopilhas no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo*. 2012. 243 p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LOPES, R. R.; FRANKE, L. B. Aspectos térmicos-biológicos da germinação de sementes de cornichão anual sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 10, p. 2091-2096, 2011.

LUTTRELL, W.; THOMAS, C. Toxic tips: benzo(a)pyrene. *Journal of Chemical Health and Safety*, v. 14, n. 6, p. 21-22, 2007.

MACHADO, C. F. et al. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). *CERNE*, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

MACHADO, C. J. S. et al. Legislação ambiental e degradação ambiental do solo pela atividade petrolífera no Brasil. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, v. 28, p. 41-55, 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination and in selection and evaluation for seedling and vigour. *Crop Science*, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIA, A. B. R. A. *Isolamento e caracterização de princípios ativos em própolis e produtos*. RHAEB-BIOMINAS. Belo Horizonte. 1997

MALALLAH, G. et al. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. *Environmental pollution*, v. 92, p. 213-217, 1996.

MARANHO, L. T. et al. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex. Endl., Podocarpaceae. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, n. 3, p. 615-624, 2006.

MARASCHIN, M.; VERPORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* v. 10, p. 24-28, 1999.

MARQUES, M. et al. Seedling emergence and biomass growth of oleaginous and other tropical species in oil contaminated soil. *The Open Waste Management Journal*, v. 3, p. 26-32, 2010.

MASSOT, B. et al. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 62, p. 11-19, 2000.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p. 455-465, 2009.

MELO, R. F. et al. Behavior of *Eucalyptus grandis* and *E. cloeziana* seedlings grown in arsenic-contaminated soil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, p. 985-992, 2010.

MENESES, C. H. S. G. et al. Germination of cotton cultivar seeds under water stress induced by polyethyleneglycol-6000. *Scientia Agricola*, v. 68, p. 131-138, 2011.

MOHAMED, M. A. H.; IBRAHIM, T. *In vitro* mass production of *Ruta graveolens* L. for secondary products production. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 33, n. 5, p. 1945-1951, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, v. 80, n. 1, p. 29-33, 1// 2003.

NAGHDI BADI, H. et al. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, v. 19, n. 3, p. 231-236, 5// 2004.

NJOKU, K. L.; AKINOLA, M. O.; IGE, T. O. Comparative effects of diesel fuel and spent lubricating oil on the growth of *Zea mays* (maize). *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, v. 3, n. 3, p. 428-434, 2009.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - Still a mystery. *Plant Science*, v. 179, n. 6, p. 574-581, 12// 2010.

NOORI, M.; ASKARI, M.; BEIGI, F. *Robinia Pseudoacacia* L. Flavonoids in defence of plant against soil crude oil pollution. *International Journal of Ecosystem*, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

OFFOR, U. S.; IYAGBA, A. G.; ONWUGBUTA-ENYI, J. Biostimulative effects of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) mulch on the germination of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) grown in a crude oil contaminated soil. *European Scientific Journal*, v. 9, n. 21, p. 168-176, 2013.

OGBO, E. M.; ZIBIGHA, M.; ODOGU, G. The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalum scrobiculatum* L.) – phytoremediation potential of the plant. *African Journal of Environmental Science and Technology*, v. 3, n. 9, p. 229-233, 2009.

OLIVA, A. et al. Effects of *Ruta graveolens* leaves on soil characteristics and on seed germination and early seedling growth of four crop species. *Annals of Applied Biology*, v. 141, n. 1, p. 87-91, 2002.

OMOSUN, G.; EDEOGA, H. O.; MARKSON, A. A. Anatomical changes due to crude oil pollution and its heavy metals component in three *Mucuna* species. *Recent Research in Science and Technology*, v. 1, n. 6, p. 264-269, 2009.

ORLITA, A. et al. Effective biotic elicitation of *Ruta graveolens* L. shoot cultures by lysates from *Pectobacterium atrosepticum* and *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, v. 30, n. 3, p. 541-5, Mar 2008.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Food Science and Technology*, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, v. 176, n. 1-4, p. 5-16, 2012.

PEREIRA, G. P.; CARVALHO, R. I. N.; BIASI, L. A. Qualidade fisiológica de sementes de uva-do-japão após envelhecimento acelerado e armazenamento. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 32, n. 2, p. 527-532, 2010.

PLETSCH, M.; CHARLWOOD, B. V.; ARAÚJO, B. S. Fitorremediação de águas e solos poluídos. *Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v. 11, p. 26-29, 1999.

REYNOSO-CUEVAS, L. et al. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource technology*, v. 99, n. 14, p. 6379-85, Sep 2008.

RIGON, J. P. G. et al. Allelopathic effects of aqueous extract of *Brassica napus* on germination of seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 7, n. 3, p. 451-455, 2012.

RODRÍGUEZ, A.; INFANTE, D. Characterization in silico of flavonoids biosynthesis in *Theobroma cacao* L. *IAEES*, v. 1, n. 1, p. 34-45, 2011.

ROJAS, N. Y.; MILQUEZ, H. A.; SARMIENTO, H. Characterizing priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in particulate matter from diesel and palm oil-based biodiesel B15 combustion. *Atmospheric Environment*, v. 45, n. 34, p. 6158-6162, 11// 2011.

SANTOS, L. M. et al. Avaliação da atividade alelopática de *Ruta graveolens* (Rutaceae) na germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* cv. Babá. *Visão Acadêmica*, v. 10, n. 1, p. 29-34, 2009.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biotechnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2001.

SIDWA-GORYCKA, M. et al. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of

coumarins and furanocoumarins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 97, n. 1, p. 59-69, 2009.

SILVA, G. *Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado – escala piloto*. 2010. 144 p. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SINGH, M.; CHATURVEDI, R. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from *in vitro* cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Industrial Crops and Products*, v. 36, n. 1, p. 321-328, 3// 2012.

SOARES, C. R. F. S. et al. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

SWERDLOW, N. M. Thomas Gold's deep hot biosphere and the origin of petroleum. . *Perspectives in Biology and Medicine*, v. 43, n. 4, p. 598-608, 2000.

SZOPA, A. et al. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 110, n. 3, p. 329-336, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*, v. 137, p. 791-793, 2005.

TONEL, F. R. et al. Physiological and biochemical changes in seeds and seedlings of red clover submitted to diesel oil. *Iheringia - Série Botânica*, v. 68, n. 2, p. 195-201, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERHOEYEN, M. E. et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.*, v. 53, n. 377, p. 2099-2106, 2002.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 3, p. 400-405, 2009.

WAKSDMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis - Chapter 21 - HPLC of flavonoids*. Florida, USA: CRC Press, 2011. 995.

WILT, F. M.; MILLER, G. C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 20, n. 1, p. 53-67, 1// 1992.

YAMASHITA, O. M. et al. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 2, p. 202-208, 2009.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZARINKAMAR, F.; REYPOUR, F.; SOLEIMANPOUR, S. Effect od diesel fuel contaminated soil on the germination and the growth of *Festuca arundinacea*. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, v. 1, n. 2, p. 37-41, 2013.

ZHANG, Z.; RENGEL, Z.; MENEY, K. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182, n. 1-3, p. 689-695, 2010.

APÊNDICE A - Trabalho apresentado no II Workshop Energy and Environment, 04 a 06 de julho de 2011, Rio de Janeiro/RJ.

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Melissa officinalis* L. E *Ruta graveolens* L. EM SOLO BIORREMEIADO E POTENCIAL DE USO COMO BIOINDICADORAS DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO LUBRIFICANTE USADO

Siomara Dias da Costa Lemos¹, Graciane Silva², Norma Albarello³, Marcia Marques⁴

Introdução

A fitorremediação é uma tecnologia de aplicação *in situ*, a custos baixos, que utiliza plantas na imobilização e/ou estabilização dos elementos tóxicos do solo a fim de atingir sua recuperação [Germida et al 2002; Melo et al 2009]. Sendo assim, a investigação da tolerância de diferentes espécies quanto à germinação e o crescimento em solo contaminado, como indicador do potencial para uso na fitorremediação é essencial e fornece subsídios para a compreensão da fisiologia e bioquímica dos processos envolvidos no desenvolvimento vegetal [Lasat 2002; Melo et al. 2009]. O conhecimento proveniente de tal investigação permite o uso de espécies vegetais como bioindicadores e em projetos de revegetação de áreas degradadas [Prasad 2005].

A possibilidade de produzir plantas medicinais e/ou aromáticas em solos contaminados que sofrem várias limitações de uso, sem prejuízo para a qualidade do(s) composto(s) a serem extraídos para a indústria é relevante, pois reduz a pressão sobre solos férteis que devem ser prioritariamente destinados à produção de alimentos e preservação de ecossistemas. O desempenho da germinação de espécies em solos contaminados que foram submetidos a procedimentos físicos, químicos e/ou biológicos de remediação também se constitui em abordagem valiosa para verificação da eventual permanência do efeito tóxico no solo tratado, mesmo após altas remoções dos contaminantes originais.

O presente trabalho tem como objetivo analisar a germinação de sementes de *Melissa officinalis* (melissa) e *Ruta graveolens* (arruda) em solos contaminados por óleo lubrificante usado e biorremediados em reatores piloto, identificando se tais condições do solo inibem a germinação destas espécies.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida de setembro a novembro de 2010 no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os testes foram conduzidos em quatro tipos de substrato: areia esteril (ARE); solo biorremediado por 12 meses em biorreatores aerados através de bioestímulo com ajuste de pH (BioS); solo remediado por 12 meses em biorreatores aerados que receberam 10% de composto de resíduos sólidos urbanos com 7 meses de maturação fornecido pela Comlurb (BioA1); solo biorremediado por 2 meses em biorreatores aerados por meio de bioaumento (BioA2).

O substrato areia (controle) foi peneirado e autoclavado a 1 atm por 1 hora [Brasil 2009].

As sementes foram adquiridas comercialmente e mantidas refrigeradas a 5-10° C por 7 dias [Brasil, 2009] e em seguida foram desinfestadas com NaOCl 0,5 % com posterior lavagem em água destilada. Tais sementes foram mantidas nos substratos em caixas plásticas previamente desinfestadas com NaOCl 0,5 % e álcool 70%.

Foram utilizadas 2 repetições com 24 sementes cada, totalizando 48 sementes em cada tratamento. A germinação foi realizada em câmara de germinação Tecnal TE-401 durante 21

dias para melissa e 28 dias para arruda [Brasil, 2009]. A irrigação foi feita por aspersão de água destilada diariamente.

As contagens foram realizadas periodicamente, sendo registrado o número de sementes germinadas em cada substrato. Foram consideradas germinadas as sementes nas quais houve a protrusão da radícula (critério botânico).

Foi calculada a porcentagem final de sementes germinadas (%G) em cada unidade experimental e o índice de germinação (IG) calculado (equação 1) para as duas espécies nos diferentes substratos, segundo Marques et al/e colaboradores [2010].

Equação 1:

$$\text{Índice de Germinação} = \frac{\text{Média da germinação em cada tratamento}}{\text{Média da germinação no tratamento controle}}$$

Resultados e Discussão

A emergência das sementes de melissa iniciou-se 4 dias após a semeadura em todos os substratos, enquanto que para as sementes de arruda, a emergência ocorreu somente após 6 dias nos solos BioA1 e BioA2. No solo BioS a emergência foi tardia, ocorrendo aos 8 dias (Figura 1), sugerindo que o atraso observado na germinação das sementes de arruda nesse solo possa ser uma resposta ao possível efeito tóxico de contaminantes remanescentes no solo tratado por bioestímulo, não presente no solo tratado por bioaumento.

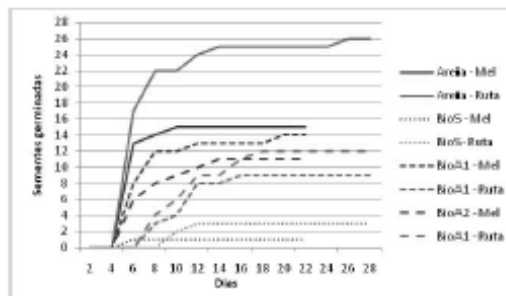


Figura 1. Número de sementes de melissa e arruda germinadas no período de 21 e 28 dias nos substratos: areia, BioS, BioA1 e BioA2. Cada curva da coluna representa a média de 2 repetições.

Em relação ao IG, a germinação das sementes nos solos biorremediados não chegou a atingir o IG do tratamento controle. Tal fato sugere que as espécies sofreram redução na taxa de germinação nos solos contaminados, mesmo após os mesmos terem sido biorremediados (Figura 2). O bioaumento foi aparentemente mais eficaz na remoção da toxicidade do que o bioestímulo.

As duas espécies estudadas, portanto, apresentaram redução na germinação em todos os solos contaminados e posteriormente biorremediados, o que pode ser explicado pela presença de hidrocarbonetos orgânicos.

1. Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente PPGMA, UERJ. lemos.sdc@uerj.br

2. Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI), gracianesilva@gmail.com

3. Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), Departamento de Biologia Vegetal, UERJ, labplan_uerj@yahoo.com.br

4. Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI), Departamento de Engenharias Sanitária e do Meio Ambiente, UERJ, marciam@uerj.br

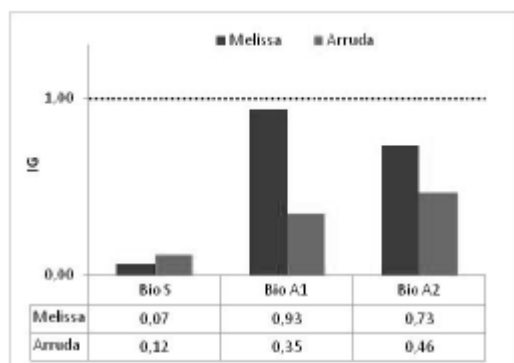


Figura 2. Índice de Germinação (IG) das sementes de melissa e arruda nos substratos: BioS, BioA1 e BioA2. A linha tracejada representa o tratamento considerado controle (areia), o qual representa valor 1,00.

Mundialmente, existem dois tipos de abordagem utilizadas na proteção da qualidade do solo, o primeiro trabalha com valores de referência de qualidade e intervenção, e o outro, com a avaliação de risco ao ser humano e ao meio ambiente, entretanto utilizando os dados obtidos em sítios contaminados específicos (Seabra, 2005). Uma das legislações em vigor mais restritiva em relação à contaminação de solo por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs), é a Lista de Berlim, onde os valores de intervenção variam de 300 a 5000 mg kg⁻¹ de HPTs, todavia depende da sensibilidade ambiental do local.

Os solos biorremediados foram avaliados pelas contaminações finais de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs), após o período experimental, onde observou-se: 573,05 mg kg⁻¹ (BioS), 461,02 mg kg⁻¹ (BioA₁) e 295,71 mg kg⁻¹ (BioA₂), estes valores não apresentam diferença estatística significativa. Visto que, a concentração do tratamento BioA₂ está abaixo do limite de intervenção, segundo a lista de Berlim, diferencia os tratamentos, BioS e BioA₁.

No entanto, ao comparar estes resultados aos testes de germinação, a semente de arruda apresenta um comportamento esperado, apresentando uma ordem de qualidade de solo, BioA₂ > BioA₁ > BioS, porém apresentam índice de germinação extremamente inferior ao controle. Já a semente de melissa apresenta o tratamento BioA₁ superior ao tratamento BioA₂, porém ambos apresentam resultados mais próximos ao controle.

A presença do óleo pode formar uma camada hidrofóbica na superfície do solo, restringindo o movimento de oxigênio, resultando em uma condição anaeróbica [Chupakhina & Maslennikov, 2004]. Este fato estaria de acordo com os resultados encontrados por Adam & Ducan [2002] que descrevem que altas concentrações de óleo ocasionam um impedimento físico da germinação, dificultando a transferência da água e de oxigênio do solo para as sementes. Sendo assim, o estresse ocasionado pela redução de oxigênio disponível afeta a respiração do embrião e, conseqüentemente, a sua visibilidade [Gogosz et al. 2010].

Conclusão

O estudo realizado indica maior capacidade de germinação das sementes de melissa do que das sementes de arruda nos solos biorremediados, sobretudo naqueles que receberam bioestímulo, através da adição de composto a partir de resíduos sólidos urbanos (BioA1 e BioA2). Embora em termos de remoção de hidrocarbonetos com base em

cromatogramas (n-alcenos e demais frações de HTPs), o bioestímulo não tenha apresentado resultados significativamente superiores ao bioestímulo, a toxicidade removida pelo bioestímulo foi superior, pelo menos segundo as espécies aqui estudadas.

A germinação das espécies estudadas ocorreu na presença dos contaminantes, ainda que o índice de germinação tenha sido reduzido, indicando seu potencial uso no biomonitoramento de solos remediados. Estudos de acompanhamento do desenvolvimento da planta, com análise de biomassa e quantificação de hidrocarbonetos no solo e nos tecidos vegetais permitirão a elaboração de uma resposta mais ampla acerca do comportamento destas espécies em solos contaminados.

Referências

- ADAM, G. & DUNCAN, H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* 120:363-370.
- BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria da Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 339p.
- CHUPAKHINA, G.N. & MASLENNIKOV, P.V. 2004. Plant adaptation to oil stress. *Russian Journal of Ecology* 35 (5): 290-295.
- GERMIDA, J.J.; FRICK, C.M.; FARRELL, R.E. 2002. Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Developments in Soil Science* 28(B):169-185.
- GOGOSZ, A.M.; BONA, C.; SANTOS, G.O.; BOTOSSO, P.C. 2010. Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Brazilian Journal of Biology* 70 (4): 977-986.
- LASAT, M.M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- MARQUES, M.; ROSA, G.S.; AGUIAR, C.R.C.; CORREIA, S.M.; CARVALHO, E.M. 2010. Seedling Emergence and Biomass Growth of leguminous and Other Tropical Species in Oil Contaminated Soil. *The Open Waste Management Journal* 3: 26-32.
- MELO, R.F.; DIAS, L.E.; MELLO, J.W.V.; OLIVEIRA, J.A. 2009. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33: 455-465.
- OMOSUN, G.; EDEOGA, H.O.; MARKSON, A.A. 2009. Anatomical changes due to crude oil pollution and its heavy metals component in three *Mucuna* species. *Recent Research in Science and Technology* 1(6): 264-269.
- PRASAD, M.N.V. 2005. Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1): 113-128.
- SEABRA, P.N.C. 2005. Aplicação de biopilhas na biorremediação de solos argilosos contaminados por petróleo. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

APÊNDICE B - Trabalho apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 19 a 22 de setembro de 2011, Búzios/RJ.

CD014

Germination of *Melissa officinalis* L. and *Ruta Graveolens* L. seeds in both oil-contaminated soil and bioremediated soil

Lemos, S.D.C.^{1,2}, Silva, G.², Marques, M.^{2,3}, Albarello, N.⁴

¹. Programa de Pós-Graduação de Meio Ambiente. UERJ. Rua São Francisco Xavier 524, PJLF, Bloco F, sala 12.005, 20.550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. lemos.sdc@uerj.br ². Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI). Rua São Francisco Xavier 524, PJLF, Bloco E, sala 5024, 20.550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. graciesilv@gmail.com ³. Departamento de Engenharias Sanitária e do Meio Ambiente. Rua São Francisco Xavier 524, PJLF, Bloco E, sala 5024, 20.550-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. marciam@uerj.br

⁴. Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN). Departamento de Biologia Vegetal. Rua São Francisco Xavier 524, PHLC, sala 509, 20.550-013, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. labplan_uerj@yahoo.com.br

The phytoremediation is described as an efficient mean of elimination pollutants from soil. With the aim of studying species for phytoremediation, in this work, we evaluate the germination of *M. officinalis* (lemon balm) and *R. graveolens* (rue) seeds in oil-contaminated soil and bio-remediated soil. The germination tests were carried out in seven substrates: sterilized sand; commercial potting mixes (SC); clay soil spiked with 0.8% (P0.8) and 2.8% (P2.8) mass/mass of crude oil; soil contaminated with with 5% of used lubricating oil after bioremediation with bio-stimulation meaning pH adjustment (BioS) and; bio-augmentation, meaning same adjustments as bio-stimulation plus addition of 10% (m/m) compost obtained from urban solid waste after two months (BioA1) and seven months (BioA2) of maturation in composting piles. Two replicates with 24 seeds each were set up for each one of the seven experimental conditions, resulted in 48 seeds for each experimental condition and species. The number of seeds that sprout was registered every 21 days to lemon balm and every 28 days for rue. SC and BioS substrates appear to delay germination of lemon balm seeds, while rue seeds showed the same behavior in all conditions. The highest germination percentages for lemon balm were achieved in sterilized sand (31.25%), BioA1 (27.19%) and P2.8 (27.08%), while the rue seeds showed the highest in SC (62.50%) and sterilized sand (54.14%). According to entropy evaluation, which reflects the homogeneity of germination, and the germination velocity index, both species showed capacity to germinate in contaminated soils and wasn't influenced by the experimental conditions.

Keywords: contaminated soil, Lamiaceae, Rutaceae, phytoremediation.

APÊNDICE C - Trabalho apresentado no XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18 a 21 de setembro de 2012, Bento Gonçalves/RS.

Germinação de *Ruta graveolens* L. em solo contaminado por óleo diesel

LEMOS, S.D.C.^{1,3,4}, LYRA, J.², ALBARELLO, N.³, MARQUES, M.^{1,4}

¹ PPGMA – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, ² IFRJ - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, ³ LABPLAN - Laboratório de Biotecnologia de Plantas, ⁴ LABIFI - Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias.

Palavras-chave: diesel, germinação, entropia, arruda, IVG.

Resumo:

Introdução: Alterações no desenvolvimento vegetal, como a inibição da germinação e redução do crescimento causados pela contaminação do solo podem ser consideradas um fitoindicador. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a germinação de *Ruta graveolens* (arruda) em solo artificialmente contaminado com diferentes concentrações de óleo diesel S50 (OD), objetivando a investigação dos efeitos desse eliciador/elicitador abiótico sobre essa etapa do desenvolvimento vegetal *in vivo*.

Experimento: Dois experimentos foram conduzidos com OD comercial (com 5% de biodiesel). Utilizaram-se as concentrações de 0% (controle C1), 0,25%, 0,5%, 1,0%, 2,0% de OD (p/p seco) no primeiro experimento e 0% (controle C2), 3,0%, 4,0%, 5,0% e 6,0% OD (p/p seco) no segundo experimento. O solo utilizado foi caracterizado como areia-franca pela EMBRAPA-solos. O delineamento experimental foi de cinco repetições, com 60 sementes cada (300 sementes/tratamento). O número de sementes germinadas foi registrado em dias alternados por 28 dias. Os resultados foram analisados através da Análise de Variância (*one-way*) utilizando-se o software SPSS versão 20.0 e as médias comparadas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Resultados: As porcentagens de germinação mais elevadas foram observadas em todos os tratamentos do primeiro experimento ($\pm 85\%$), C2 (68,7%) e na concentração de 3,0% OD (45,3%). Nas concentrações superiores a 3,0% OD a porcentagem foi de aproximadamente 30%. Em relação à entropia (homogeneidade da germinação) a presença do OD não afetou os tempos de germinação das sementes quando comparados ao controle. O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) demonstrou que acima da concentração 3,0% OD a capacidade de germinar foi significativamente afetada pela presença do contaminante.

Conclusão: A arruda tem capacidade de germinar em concentrações iguais ou inferiores a 3,0% OD no solo, não existindo diferença significativa abaixo desta concentração em relação ao IVG. Serão conduzidos estudos sobre o comportamento da espécie e seu desenvolvimento por 60 dias, a fim de avaliar as possíveis alterações nas características morfológicas (parte aérea/ radicular e número de folhas por plântula) e fitomassa das plântulas germinadas em solo contaminado artificialmente por OD.

Apoio: CNPq, CAPES

Tabela 1. Experimento 1 de arruda em solo contaminado artificialmente com OD.

Tratamento	ni	% germinação	IVG	Entropia
Controle	263	87,67	3,31	2,65
0,25% OD	260	86,67	3,56	2,91
0,5% OD	249	83,00	3,23	2,81
1,0% OD	247	82,33	3,80	2,73
2,0% OD	253	84,33	3,31	2,65

Tabela 2. Experimento 2 de arruda em solo contaminado artificialmente com OD. Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna indicam diferença significativa segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamento	ni	% germinação	IVG	Entropia
Controle 2	179	68,67 A	4,26 A	2,32
3,0% OD	118	45,33 AB	2,27 B	2,60
4,0% OD	86	30,00 B	1,66 B	2,48
5,0% OD	98	33,67 B	1,86 B	2,78
6,0% OD	76	25,67 B	1,23 B	2,64

APÊNDICE D - Trabalho apresentado no 63º Congresso Nacional de Botânica, 11 a 16 de novembro de 2012, Joinville/SC.

Seção: Ecologia Vegetal

Resposta Morfológica de plântulas de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) OBTIDAS POR GERMINAÇÃO em solo contaminado por óleo diesel

Siomara Dias da Costa LEMOS (1,3,4)

Júliana LYRA (2,3)

Thiago José REBELLO (3)

Marcia MARQUES (1,4)

Norma ALBARELLO (3,5)

Alterações no processo germinativo e redução do crescimento de plântulas podem caracterizar algumas espécies vegetais como fitoindicadoras da contaminação do solo. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações morfológicas de *R. graveolens* (arruda) em solo artificialmente contaminado com óleo diesel S50, a fim de investigar os seus efeitos sobre essa etapa do desenvolvimento vegetal sob condições *in vivo*. O substrato, caracterizado pela Embrapa-Solos como areia-franca, foi tratado com óleo comercial (5% de biodiesel) inicialmente nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e depois em 3,0%, 4,0%, 5,0% e 6,0% (p/p seco), mais o controle. Os experimentos foram conduzidos em cinco repetições com 60 sementes cada. Sessenta dias após a semeadura, as plântulas foram avaliadas em relação ao comprimento da parte aérea e radicular, número de folhas por plântula e massa fresca. A germinação teve início cerca de sete dias da semeadura. Os resultados indicaram que as plântulas de *R. graveolens* apresentaram redução significativa em relação ao tamanho da parte aérea e à massa fresca, no substrato em que as concentrações de óleo diesel estavam acima de 0,25%. O número de folhas por plântula e o tamanho da parte radicular foi significativamente reduzido nas concentrações acima de 0,5% e 1,0% de óleo diesel, respectivamente. As plântulas que sobreviveram nas concentrações de 1,0% e 2,0% de óleo diesel apresentaram nódulos nas raízes, o que pode ser decorrente da presença do contaminante. Pode-se concluir que, nas condições estudadas, as sementes de *R. graveolens* possuem a capacidade de germinar, porém o desenvolvimento pós-seminal fica comprometido quando o substrato contém concentrações de óleo diesel acima de 0,5%. Tais resultados podem ser considerados indicativos de potencial uso da espécie na fitoindicação de solos contaminados com óleo diesel.

Palavras-chave: arruda, fitoindicação, planta medicinal

Créditos de Financiamento: FAPERJ, CNPq, CAPES

(1) Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente/UERJ

Rua São Francisco Xavier, 524, Bl. F, sala 12.005, CEP 20550-900, Rio de Janeiro/RJ (lemos.sdc@uerj.br).

(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Rua Senador Furtado, 121, sala 219, CEP 26530-060, Rio de Janeiro/RJ.

(3) Laboratório de Biotecnologia de Plantas/Departamento de Biologia Vegetal/IBRAG/UERJ.

Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC, sala 509, CEP 20551-030, Rio de Janeiro/RJ.

(4) Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias/FEN/UERJ.

Rua São Francisco Xavier, 524, Bl. F, sala 4.105, CEP 20550-900, Rio de Janeiro/RJ

(5) Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal/UERJ.

Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC, sala 224, CEP 20551-030, Rio de Janeiro/RJ.

APÊNDICE E - Artigo publicado no periódico “Desenvolvimento e Meio Ambiente”, v. 28, p. 41-55, jul./dez. 2013. Editora UFPR.

Legislação ambiental e degradação ambiental do solo pela atividade petrolífera no Brasil

Environmental Legislation and Environmental Degradation of the Soil by Oil Activity in Brazil

Carlos José Saldanha MACHADO*
Rodrigo Machado VILANI**
Marcio Gonçalves FRANCO***
Siomara Dias da Costa LEMOS****

RESUMO

Os objetivos deste trabalho são: *i*) analisar a degradação ambiental resultante da intensa atividade antrópica, particularmente a contaminação do solo, sob a perspectiva do desenvolvimento sustentável e da legislação ambiental brasileira, e *ii*) contribuir para a superação das lacunas encontradas na regulamentação e nas políticas públicas voltadas para a proteção dos solos no país e para futuras pesquisas empíricas de avaliação dos impactos ambientais, reais e potenciais, causados pelo petróleo e seus derivados ao solo. Após uma análise bibliográfica de textos sobre solo, políticas públicas, desenvolvimento sustentável, direito ambiental e Política Nacional do Meio Ambiente e do arcabouço legal relativo à legislação federal em vigor até março de 2012, sob a perspectiva do desenvolvimento sustentável, são apontados os pontos de aproximação e distanciamento entre as disposições legais e conceituais acerca da sustentabilidade e a realidade das práticas governamentais em relação à manutenção da qualidade do solo no Brasil. Conclui-se afirmando que há uma ausência de regulamentação clara sobre a poluição do solo causada por petróleo e derivados e o seu tratamento é considerado de forma secundária, o que dificulta uma integração entre o desenvolvimento da atividade petrolífera no país e a conservação da qualidade do solo para as presentes e futuras gerações.

Palavras-chave: degradação ambiental; solo; petróleo; políticas públicas; desenvolvimento sustentável.

* Doutor em Antropologia Social (Université PARIS 5, Sciences Sociales Sorbonne). Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e Professor dos Programas de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde (PPGBS-IOC) da Fiocruz e em Meio Ambiente (Doutorado) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (PPG-MA/UERJ). *E-mail:* saldanha@fiocruz.br

** Doutor em Meio Ambiente (UERJ). Professor do Mestrado em Planejamento Regional e Gestão de Cidades da Universidade Candido Mendes (UCAM/Campos dos Goytacazes). *E-mail:* r_vilani@yahoo.com.br

*** Doutor em Meio Ambiente (UERJ). Professor da Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (FTESM) e da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO). *E-mail:* marciogoncalvesfranco@gmail.com

**** Mestra em Biologia Celular e Molecular (PUC-RS). Doutoranda do Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar de Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). *E-mail:* lemos.sdc@uerj.br

ABSTRACT

The aims of this study are: i) to analyze the environmental degradation resulting from intense anthropic activity, particularly the soil contamination, from the perspective of sustainable development and Brazilian environmental legislation, and ii) to contribute to overcoming the gaps found in the regulation and public policies aimed at soil protection in the country and to future empirical evaluation of actual and potential environmental impacts caused by oil and its derivatives to soil. A literature review was conducted with bibliography on soil, public policies, sustainable development, environmental law, National Environmental Policy, and legal framework related to federal legislation in force until March 2012. Also, based on the perspective of sustainable development, points of approach and distance between legal and conceptual provisions about sustainability and the governmental practices related to soil quality maintenance in Brazil are highlighted. We conclude stating the lack of clear regulation about soil pollution caused by oil and its derivatives, and the treatment of this pollution being considered secondarily, hindering an integration between the development of oil activity in the country and preservation of soil quality for present and future generations.

Keywords: environmental degradation; soil; oil; public policies; sustainable development.

Introdução

Atividades de mineração, práticas agronômicas, aplicação de efluentes industriais ou lodo para irrigação de plantações são as maiores fontes de contaminação em terras para agricultura (CHANDRA *et al.*, 2009, p. 1.514). A cobertura vegetal danificada em áreas contaminadas por elementos tóxicos amplia a degradação do solo, resultando na erosão hídrica e eólica, assim como na lixiviação dos contaminantes para o lençol freático. Este fenômeno pode ocasionar um grau progressivo de contaminação de outras áreas, sendo próximas ou não (MELO *et al.*, 2009, p. 456).

Devido à grande degradação que os recursos naturais vêm sofrendo nas últimas décadas, constata-se uma preocupação crescente de segmentos expressivos da população com a preservação do ambiente e destes recursos. Tal preocupação objetiva conquistar a manutenção da qualidade de vida e buscar um desenvolvimento sustentável por meio de um equilíbrio entre o ambiente natural, o seu uso econômico e a redução das desigualdades sociais (MACHADO, 2012; OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 1).

Nesse sentido, desde a década de 1970 uma série de conferências e iniciativas internacionais tem auxiliado a divulgar conceitos importantes que permitam um melhor entendimento do planeta em que vivemos e criar políticas

públicas para um desenvolvimento sustentável. Esta inter-relação entre várias áreas do saber e vários atores é importante para realizar o estudo do meio ambiente, visto que este estudo é transdisciplinar (OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 1).

Segundo Avanzi e colaboradores (2009, p. 116), a preservação dos recursos naturais, principalmente da água e do solo que seriam interdependentes, é necessária para obter-se uma qualidade ambiental adequada. Esta inter-relação permite a vida dos biomas, assim como os *habitats* das espécies e a variedade das paisagens, florestas e plantações. Segundo os mesmos autores, no Brasil a utilização dos solos caracterizou-se pela atividade agrícola desde a colonização, sempre estimulada pela economia cíclica e migratória (AVANZI *et al.*, 2009).

Mas o surgimento de áreas degradadas no mundo é cada vez mais crescente. No Brasil, esta degradação é basicamente resultado de atividades antrópicas decorrentes do crescimento econômico, tais como construção de estradas, atividades industriais e agrícolas mal planejadas, que têm resultado em 10% da área do país degradada e em processo de desertificação e arenização. Este processo se intensifica com a combinação do regime climático, dos solos frágeis e do rápido desenvolvimento econômico que ocorre no território nacional e em outros países (OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 3).

Além de ser uma superfície que recobre o planeta Terra, o solo é a estrutura responsável pelo suporte bá-

sico à vida no planeta. Tal fato se deve a esta estrutura agir direta ou indiretamente na purificação da água, detoxificando os poluentes ali presentes, restaurando ecossistemas, favorecendo a ciclagem de nutrientes e favorecendo o ciclo da água. O solo também possui organismos, matéria orgânica, sais e minerais que, em equilíbrio, permitem a vida da Terra (DINIZ FILHO *et al.*, 2007, p. 28).

Apesar de sua importância, há uma notável escassez de dados em relação à contaminação dos solos por hidrocarbonetos, compostos considerados persistentes por longo período no ambiente se comparados com aqueles disponíveis para a contaminação de ecossistemas aquáticos (MARANHO *et al.*, 2009, p. 264).

A consolidação de pesquisas para suprir essa lacuna releva-se, por exemplo, da constatação de que:

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos mutagênicos e carcinogênicos aos humanos e aos animais, que são introduzidos no ambiente em grandes quantidades devido às atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados. Apesar disso, a grande maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradá-los, o que resulta na sua acumulação no ambiente e na consequente contaminação dos ecossistemas (JACQUES *et al.*, 2007, p. 1.192).

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho é analisar a degradação ambiental resultante da intensa atividade antrópica, particularmente a contaminação do solo, sob a perspectiva do desenvolvimento sustentável e da legislação ambiental brasileira. Enquanto conceito estruturante do trabalho, desenvolvimento sustentável será definido a partir do texto constitucional (art. 3, II *c/c.* art. 170, *caput*, VI e art. 225, *caput*.) como aquele que se propõe garantir o desenvolvimento nacional em conformidade com uma ordem econômica socialmente justa e ambiental equilibrada. Dessa forma, procura-se contribuir para a superação das lacunas encontradas na regulamentação e nas políticas públicas voltadas para a proteção dos solos no país e para futuras pesquisas empíricas de avaliação dos impactos ambientais, reais e potenciais, causados por petróleo e seus derivados ao solo. Metodologicamente, optamos pela pesquisa biblio-

gráfica (artigos, livros, teses e dissertações) abrangendo os temas centrais do trabalho: solo, políticas públicas, desenvolvimento sustentável, direito ambiental e Política Nacional do Meio Ambiente. Para o aprofundamento dos temas, sob a perspectiva jurídica, foi realizada pesquisa sobre o arcabouço legal relativo à legislação federal em vigor até março de 2012.

Além desta Introdução, o trabalho está organizado em quatro seções. Inicialmente, é apresentado o objeto central do estudo, delimitando os conceitos de solo e qualidade do solo. Em seguida, tratamos sucintamente da industrialização da economia brasileira no século XX, voltando nosso olhar especificamente para a produção de hidrocarbonetos de petróleo e seus impactos sobre o solo. Para se discutir o papel do Estado na gestão e na defesa do uso racional do solo, na terceira seção são analisadas, sob a perspectiva do desenvolvimento sustentável, as políticas públicas nacionais e a legislação ambiental vigente durante o mesmo período. Na última seção, antes de concluir, é feito um breve resumo dos principais eventos mundiais de meio ambiente e seus impactos na mudança ou continuidade do perfil da política nacional de meio ambiente. Do cenário traçado passamos a uma reflexão quanto aos pontos de aproximação e distanciamento entre as disposições legais e conceituais acerca da sustentabilidade e a realidade das práticas governamentais em relação à manutenção da qualidade do solo no Brasil. A título de considerações finais, levantamos as lacunas das políticas ambientais brasileiras para a superação dos desafios relacionados à defesa dos recursos ambientais, em particular, do solo.

Solo e qualidade do solo

Existem vários conceitos de solo, todos estes ligados a várias áreas do saber no qual este elemento está direto ou indiretamente relacionado. Segundo Diniz Filho e colaboradores (2007, p. 28) o solo é definido como:

Conjunto de corpos tridimensionais que ocupa a parte superior da crosta terrestre capaz de servir de suporte para as plantas, apresentando características internas e externas próprias possíveis de descrevê-las e classificá-las.

Segundo a International Organization for Standardization – ISO – 11074/1, o solo é definido como a camada superficial da crosta terrestre constituída por partículas minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos. As interações entre os seus constituintes resultam em suas propriedades químicas, físicas e biológicas, o que permite aos cientistas considerar o solo como um sistema complexo.

Devido a esta complexidade, Rozanski (2004, *apud* OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 1) descreve que:

[...] a fauna do solo tem importante papel na sustentabilidade do sistema através de seus efeitos nos processos do solo, e devido a sua grande sensibilidade às interferências no ecossistema, a composição da comunidade pode refletir o padrão de funcionamento do mesmo.

Deve-se destacar que é importante diferenciar o solo superficial e o subsolo. O primeiro caracteriza-se como a região onde ocorre o desenvolvimento vegetal, onde as plantas desenvolvem as suas raízes, em uma região de 30 cm até 1 m e 50 cm; já o segundo é a região além da anterior, passando de 1 m e 50 cm, que fornece o suporte de nutrientes e umidade, sendo também importante em situações de contaminações da água subterrânea (ADAMS *et al.*, 2008, p. 483).

Caracterizado o solo, podemos deduzir que as suas características físicas e químicas podem ser alteradas dependendo da substância química que entra em contato com ele. Segundo Adams e colaboradores (2008, p. 484), se levarmos em consideração a fertilidade para produção de fitomassa e desenvolvimento de uma população vegetal natural, é provável que muitas áreas com hidrocarbonetos de petróleo residuais possam afetar o solo. Sendo assim, segundo estes autores, seria recomendável realizar nestas áreas um diagnóstico sobre as propriedades químico-físicas e um tratamento para recuperar este solo.

Em suas perfeitas condições, o solo funciona dentro dos limites do ecossistema e permite a produtividade biológica. Doran (1997, *apud* VEZZANI e MIELNICZUK, 2009, p. 744) define qualidade do solo como:

[...] a capacidade de um solo funcionar dentro dos limites de um ecossistema natural e manejado, para sustentar a

produtividade de plantas e animais, manter e aumentar a qualidade do ar e da água e promover a saúde das plantas, dos animais e dos homens.

Segundo Vezzani e Mielniczuk (2009, p. 744), o Serviço de Conservação dos Recursos Naturais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (NRCS/USDA) informa que a “qualidade do solo é expressa como a capacidade do solo em desempenhar suas funções no momento atual e a preservação dessas funções para o uso futuro”. Sendo assim, segundo estes autores, fica expressa no tempo de uso deste recurso a relação que existe entre a qualidade do solo e a sustentabilidade do seu uso.

Sabe-se que a atividade antrópica inadequada tem ocasionado a degradação de imensas áreas, que se tornam improdutivas (OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 2). Sendo assim, segundo Adams e Morales-García (2008, p. 476), nas últimas décadas diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos pelos países de economia desenvolvida, tipicamente de clima temperado, para definição dos limites para remediação de solos degradados em áreas urbanas, comercial, industrial e residencial.

Nesse sentido, a contribuição de nossa proposta se relaciona à discussão dos princípios normativos sobre os quais estão sediadas as políticas ambientais nacionais. Partimos, a seguir, para a contextualização da degradação da qualidade do solo pela atividade petrolífera para, então, discutirmos a incorporação do modelo de desenvolvimento sustentável pelas políticas públicas de meio ambiente.

Industrialização e produção de petróleo no Brasil durante o século XX

A industrialização no Brasil teve um longo período de quase estagnação característica dos países subdesenvolvidos. Este termo foi defendido por Alfred Sauvy (1952) e aceito pela Organização das Nações Unidas (ONU) desde então, porém o termo “em desenvolvimento” tem sido mais largamente utilizado na atualidade pelo fato de muitos países membros da ONU considerarem o termo depreciativo. Desta forma, pode-se dizer que os países em desenvolvimento, como o Brasil, tiveram (em

alguns casos continuam tendo) um processo de industrialização e enriquecimento muito pequeno ao longo do século XX. Em relação à produção de hidrocarbonetos de petróleo, indústria que apresenta alto impacto nas economias mundiais (MONIÉ, 2003), o Brasil, de acordo com dados do Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos (DIEESE, 2008), apresentou a primeira pesquisa (neste caso, chamada de prospecção) de petróleo datada de 1892 na cidade de Bofete-SP, porém a perfuração não revelou quantidade de petróleo considerável. Contudo, o petróleo brasileiro somente foi considerado produzível 40 anos mais tarde, com cerca de 2.000 barris de petróleo, em Lobato, na Bahia (DIEESE, 2008). Comparativamente aos EUA, que apresentaram sua primeira perfuração em 1859 (que continha petróleo de boa qualidade), o Brasil já naquela época esteve atrás tecnologicamente na produção petrolífera (LUCHESE, 1998). O Brasil viveu três fases relacionadas à exploração e produção de petróleo e derivados: a primeira, chamada era pré-PETROBRÁS; a segunda, chamada era de exclusividade da PETROBRÁS, e a terceira (fase atual), a era pós-lei 9.478/97, que determina o fim do monopólio da estatal na exploração e produção de petróleo no país (LUCHESE, 1998). Nestes três momentos, podem-se verificar falhas nas questões relacionadas às questões ambientais, que serão abordadas conjuntamente com a abordagem das três fases. Lucchesi comenta em seu texto que a era pré-PETROBRÁS compreende duas etapas menores: a primeira compreendida entre 1858 e 1938 e a segunda entre 1939 e 1953.

De maior interesse para nosso estudo, na terceira etapa se dá a criação da Lei 9.478/97, conhecida como Lei do Petróleo, que estabelece o fim do monopólio da PETROBRÁS na exploração e produção de petróleo brasileiro e cria o sistema de concessão de blocos exploratórios. Segundo Lucchesi (1998), este marco transitório cria uma perspectiva produtiva para o governo brasileiro sem precedentes. Diante da possibilidade de formação de parcerias com a PETROBRÁS, a saída da PETROBRÁS do mercado de regulação e a criação da Agência Nacional do Petróleo (ANP), a produção de petróleo no Brasil cresce acentuadamente.

Entretanto, essa mudança de cenário envolve o aumento potencial de impactos, visto que a atividade petrolífera apresenta natureza poluidora em sua concep-

ção mais ampla. Desde a atividade de exploração (busca por jazidas de óleo), o início da produção propriamente dita (retirada do óleo dos reservatórios até a superfície), o final da produção (caracterizada pelo refino ou processamento de gases nas refinarias) e sua distribuição e comercialização junto ao mercado consumidor, várias questões relacionadas à agressão ao meio ambiente são observadas. Andrade e colaboradores (2003) e Cachumani (2008) concluem que estes impactos ambientais causados pela atividade petrolífera são inerentes à atividade, pois se trata da produção de combustíveis fósseis.

Ademais, é preciso reconhecer que as “atividades de extração, transporte e refinamento de petróleo têm contribuído para a contaminação do solo com hidrocarbonetos de petróleo em todo o mundo” (LOPES e PIEDADE, 2010, p. 144).

Diante dessa constatação, cumpre analisar, discutir e prevenir os impactos dessa atividade, especialmente aqueles relacionados à poluição do solo, ainda carentes de regulamentação, conforme mostraremos posteriormente.

Em virtude do escopo do trabalho, focalizaremos sobre a contaminação dos solos, que se dá pela dispersão de poluentes sólidos, líquidos e gasosos que se espalham pelo potencial destes poluentes migrarem pelos poros apresentados por estes solos – derramamento (DINIZ, 2005). Na lista de prioridades nacionais dos EUA, por exemplo, existiam em meados da década de 90 mais de 1.200 áreas contaminadas, com possibilidade de esse número aumentar para 32.000 (BACKER e HERSON, 1994).

Devido aos grandes volumes e tipos de hidrocarbonetos produzidos, usados e dispostos em bases globais, não causa surpresa o fato de que grande parte das contaminações superficiais e subsuperficiais atualmente seja causada por estes produtos.

As grandes quantidades de resíduos de petróleo e derivados inadequadamente depositados que têm sido encontradas fornecem uma clara evidência que compostos orgânicos podem permanecer num sítio por longos períodos de tempo. Desta forma, há uma enorme demanda por tecnologias inovadoras envolvendo a remediação ambiental de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Em relação ao derramamento de petróleo bruto e/ou derivados que contaminam o solo,

pouco relato concreto se observa na literatura. Alguns pesquisadores, tais como Gomes e colaboradores (2008), relatam sobre a queima e o descarte inadequado de óleos lubrificantes e o que eles provocam ao meio ambiente, danos quase irreparáveis. Esta é somente uma das formas de contaminação relatadas na literatura. Pequenos vazamentos ocorridos durante o transporte repetidas vezes não são tratados com a seriedade que deveriam, porém, os estudos indicam sérios danos ao solo, tais como redução da concentração de oxigênio disponível, na redução população de micro-organismos aeróbios e na limitação da disponibilidade de micronutrientes no solo, que requerem tratamento específico (MOTA, 1997; BARROS *et al.*, 2008).

Esta preocupação possui relevo diante do fato de as resoluções CONAMA relacionadas ao uso do solo não abordarem a problemática do derramamento de petróleo ou de seus derivados. Em contrapartida, várias resoluções abordam a questão da poluição das águas, conforme será detalhado adiante. As duas que versam sobre derramamento de petróleo referem-se a derramamento de petróleo em mares, privilegiando a questão da produção marítima de petróleo (resoluções CONAMA 269/2000 e 393/2007). Até a criação da ANP, em 1997, as resoluções do CONAMA, em relação à problemática de poluição do solo por petróleo e derivados, eram os dispositivos legais e orientadores dos processos da indústria petrolífera. A ANP, por sua vez, também trata do tema de forma genérica, como nas definições de solo contaminado (Resolução ANP nº 27/2006) e de substância nociva (Resolução ANP nº 44/2009). Importa reconhecer a iniciativa do **Regulamento Técnico de Devolução de Áreas de Concessão na Fase de Exploração** (Resolução ANP nº 13/2011), em que se exige a recuperação ambiental do solo em conformidade com seus usos (agricultura, atividades urbanas) ou para recuperação de suas funções ambientais.

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) também silencia quanto à indústria petrolífera, tratando apenas de um de seus elementos ao exigir dos fabricantes, importadores, distribuidores e comerciantes de óleos lubrificantes, seus resíduos e embalagens a implantação de sistema de logística reversa (art. 33, IV, Lei 12.305/2010). Contudo, a PNRS não tratou de diversos aspectos referentes aos resíduos desse setor, primando

pelos resíduos urbanos, de forma setorizada, conforme crítica realizada por Teixeira e Machado (2012).

Essa ausência de dispositivos e políticas específicas relacionados às questões de poluição do solo, sobretudo a causada pela indústria petrolífera, compromete a indústria brasileira em dois pontos importantes: no investimento estrangeiro em exploração e produção pelo processo de concessão de blocos exploratórios de petróleo e na comunidade internacional, que observa esta como exemplo de fragilidade em outros pontos da política pública brasileira.

Ademais, outro ponto lacunoso refere-se à poluição do solo causada pelo transporte de derivados até a malha consumidora. Em um país como o Brasil, onde o transporte de cargas se faz prioritariamente por rodovias, a questão do vazamento de derivados de petróleo durante o transporte é inegavelmente um item a ser discutido. Outro ponto importante é o vazamento próximo dos centros produtores, onde os caminhões que transportam os derivados ou os dutos são alimentados com os produtos. Estes vazamentos, conforme informações disponíveis no sítio eletrônico da ANP (www.anp.gov.br), ocorrem por derramamento de óleo diesel, gasolina e óleos lubrificantes, preferencialmente.

Traçados os desafios ambientais inerentes à interação entre a atividade petrolífera e a qualidade do solo, analisaremos como as políticas ambientais nacionais têm enfrentado essa questão.

Políticas públicas ambientais no Brasil

Segundo Benjamin (1999) e Monosowski (1989), a política brasileira foi e é até os dias atuais uma mistura de temas que resultou em uma série de regulamentações que sofrem influências de fatores econômicos, sociais e políticos. Avaliando-se as políticas públicas relacionadas às questões ambientais no século XX (MACHADO, 2012), podem-se observar alguns momentos bem distintos: o primeiro deles marcado pela presença incipiente das políticas ambientais (onde estas eram tratadas de forma superficial e ineficiente, caracterizado pelo predomínio da tentativa de crescimento econômico em detrimento da preservação do meio ambiente), baseado na regulação dos recursos naturais. Outro momento bem

distinto foi caracterizado pelo controle da poluição proveniente da industrialização, urbanização e agricultura tecnicista; o terceiro momento foi caracterizado pelo planejamento e regulação de espaços geográficos, num momento posterior marcado pela regulação da natureza como um todo (legislações gerais) e questões ambientais globais, haja vista que a globalização estava tomando conta do mundo no final do século XX.

No início do século XX, são formulados os primeiros diplomas legais relacionados a recursos naturais no Brasil. A definição do domínio dos recursos pelo governo por intermédio de estatais é claramente observada pelo Código de Águas, de Mineração e Florestal, promulgado durante a década de 1930 (ALMEIDA, 2007; MACHADO, 2004). Neste momento histórico persiste a ideia de que os impactos ambientais eram necessários em função do progresso econômico (SOUZA, 2006).

Segundo Almeida (2007), a fase vivida pelo Brasil de início de crescimento econômico se traduz num total desrespeito à preservação ambiental. O Código Florestal (Lei 4.771/1965) marca a mudança da política ambiental protecionista (DRUMMOND e BARROS-PLATIAU, 2006). Na década de 1970, marcada pelo empenho mundial de construir políticas ambientais consistentes, o Brasil institui a Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA) e o Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA). No Rio de Janeiro, ocorre a criação da FEEMA, mais um órgão regulatório no âmbito estadual. Na década de 80, novos órgãos reguladores são criados e ocorre a total reorganização dos já existentes: CONAMA por meio da Lei 6.938/81, integração do CONAMA com o SISNAMA, criação das áreas de proteção ambiental. As leis 7.735/89 e 7.804/89 criam o IBAMA, absorvendo a SEMA, e acrescentam o Conselho Superior do Meio Ambiente, respectivamente.

O final de século XX no Brasil foi marcado pela mudança de paradigmas em relação à política econômica. Nos governos Collor e Fernando Henrique (primeiro mandato), ainda existiam ideias do desenvolvimento a qualquer custo, embora no governo Collor algumas discussões ambientalistas estivessem presentes. Este fato foi corroborado pela Rio-92 e pela assinatura da agenda 21, compromisso assumido por todos os países (MILARÉ, 1999), inclusive o Brasil.

Segundo Almeida (2007), ao final da década de 80, com a Constituição Federal de 1988 (CF/88), as questões ambientais passam a ser tratadas como estruturadoras das políticas brasileiras. A partir deste momento, as políticas públicas passaram a ter direcionamentos diferenciados: ao longo do último mandato de Fernando Henrique e dos mandatos sequenciais de Lula, o Brasil adota uma política de desenvolvimento econômico conservacionista, mesmo que não seja tão conservacionista na prática. Fatos relacionados ao aumento da poluição e redução de investimentos em saneamento básico no país nestes dois governos são discutidos por Souza (2006) em seu artigo. Neste momento, a corrente socioambiental também fazia sua presença de forma mais forte: as questões sociais envolvendo as questões ambientais contribuíram para a mudança no cenário ambiental brasileiro (CHAVES, 2010).

Com o passar do tempo, a atividade regulatória muito importante na segunda metade do século XX e reorganizada por meio de decretos governamentais deixou algumas lacunas atualmente: primeiramente, há falta de regulamentação para inibição de processos industriais poluidores, não há aplicação clara do princípio da precaução (preconizado pelas conferências ambientais ocorridas anteriormente – uso do direito ambiental como ferramenta), falta de rigor na liberação de licenças de funcionamento de empresas diversas, na realização de estudos de impactos ambientais (EIA) e na elaboração de relatórios de impactos no meio ambiente (RIMA).

Na década de 90, acontecem novas reformulações, porém com a permanência sem alterações das funções do IBAMA. Ocorre reorganização do Ministério do Meio Ambiente e este passa a se chamar Ministério do Meio Ambiente e Amazônia Legal, respondendo a críticas da sociedade sobre a falta de legislação dos recursos ambientais da Amazônia. Em 1995, pela medida provisória 813, o Ministério do Meio Ambiente e Amazônia Legal passa a ser chamado de Ministério do Meio Ambiente, Recursos Hídricos e Amazônia Legal, incorporando as águas em seu escopo regulatório. Na segunda metade desta mesma década, são promulgados importantes diplomas do ordenamento jurídico ambiental, como a Lei 9.433/1997 (Política Nacional de Recursos Hídricos), a Lei 9.605/1998 (Lei de Crimes Ambientais) e a Lei 9.795/1999 (Política Nacional de Educação Ambiental).

A questão da regulação das questões ambientais no Brasil passa por uma série de mudanças ao final do século XX e na primeira década do século XXI, porém algumas lacunas ainda podem ser observadas e referem-se diretamente às questões relacionadas à poluição do solo. Estas lacunas se referem a questões que envolvem derramamento de óleo e derivados de petróleo, bem como a poluição do solo causada por fatores diversos.

A partir do contexto jurídico-institucional, podemos passar à análise dos pontos de contato e distanciamento entre as políticas ambientais e as premissas do desenvolvimento sustentável relacionadas à proteção do solo.

Desenvolvimento sustentável e uso racional do solo

Conceituado como alternativa à lógica hegemônica de produção de mercadorias associada à degradação ambiental e à exploração de forma injusta e desigual do trabalho humano, o desenvolvimento sustentável encerra um ideal de racionalização na apropriação dos recursos naturais, inserindo uma variável temporal e uma exigência ética no desenvolvimento econômico.

Pela interpretação do texto normativo constitucional no seu todo (GRAU, 2003, p. 145), entendemos ter sido adotado como modelo para o desenvolvimento nacional aquele definido para o desenvolvimento sustentável. Por essa interpretação, o desenvolvimento visado pela CF/88 no Brasil está fundado sobre os seguintes pilares: *desenvolvimento nacional* (art. 3º, II); *redução das desigualdades regionais e sociais* (art. 3º, III); *ordem econômica tem por fim assegurar a todos existência digna em consonância com a preservação ambiental* (art. 170, *caput* c/c. VI); *meio ambiente ecologicamente equilibrado* (art. 225, *caput*); *responsabilidade intergeracional* (art. 225, *caput*).

A sustentabilidade no uso dos recursos naturais deve ser encarada, nesta ótica, como modelo de desenvolvimento capaz de assegurar condições dignas à sobrevivência das futuras gerações humanas e de todas as demais formas de vida. Sob essa perspectiva, segundo Derani (2001, p. 242):

Desenvolvimento econômico no Estado Brasileiro subentende um aquecimento da atividade econômica dentro de uma política de uso sustentável dos recursos naturais objetivando um aumento de qualidade de vida que não se reduz a um aumento do poder de consumo.

Logo, ao se institucionalizar o uso do adjetivo “sustentável” para o desenvolvimento nacional brasileiro, não se busca criar óbices ao aproveitamento dos recursos naturais, mas, outrossim, construir um modelo de desenvolvimento, com base nos princípios constitucionais, orientado pela “exploração equilibrada dos recursos naturais, nos limites da satisfação das necessidades e do bem-estar da presente geração, assim como de sua conservação no interesse das gerações futuras”. Podemos, por exclusão, ainda seguir o entendimento de que se o “desenvolvimento não elimina a pobreza absoluta, não propicia um nível de vida que satisfaça às necessidades essenciais da população em geral, ele não pode ser qualificado de sustentável” (SILVA, 1994, p. 7-8).

Da leitura proposta, pode-se admitir que o modelo de desenvolvimento em curso não é sustentável – apesar da vasta legislação apresentada anteriormente – se não houver nenhuma que trate especificamente da regulação da qualidade do solo de forma geral ou, especificamente, em relação à poluição por hidrocarbonetos. Isso porque estamos diante de omissão legislativa em relação aos impactos de uma atividade poluidora em franca expansão no país.

Importante, sob essa ótica, reconhecer as características gerais da legislação ambiental sobre o tema. A maior parte da regulação existente no Brasil versa sobre a poluição hídrica, como, por exemplo, a Lei 9.966/2000, que dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional. O sistema de busca do sítio eletrônico do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) aponta uma única Resolução com o critério “solo” (em março de 2012). A título de exemplo, para o critério “água” foram encontradas sete resoluções, sendo duas relacionadas à poluição por atividade petrolífera (em março de 2012).

Constatamos que, enquanto o país caminhou bem em relação ao protecionismo das águas (fato que pode ser verificado pelas várias resoluções CONAMA do

período – Resoluções CONAMA 269/2000, 357/2005, 393/2007, 396/2008, 398/2008 e 430/2011, entre outras) e em relação à proteção do ar (Resoluções CONAMA 403/2008, 432/2011, 433/2011, entre outras), as questões que envolvem a proteção do solo quase são inexistentes, sendo a mais importante a que trata do uso do solo (Resolução CONAMA 005/1995). Algumas apresentam a proteção do solo como item coadjuvante do personagem principal, que é a poluição das águas, fato que pode ser observado na resolução CONAMA 420/2009.

Contudo, isso não quer dizer que o solo esteja fora do ordenamento jurídico brasileiro. Segundo Avanzi e colaboradores (2009, p. 118), o primeiro Código Florestal Brasileiro objetivava a manutenção da cobertura vegetal protetora das terras, a fim de conservar o regime das águas e evitar a erosão das terras pela ação das intempéries. Até este momento, a preocupação da legislação seria de evitar a degradação dos recursos naturais.

A Lei 6.225/1975, segundo este objetivo, facultou ao Ministério da Agricultura a discriminação de regiões onde a exploração econômica estaria vinculada à “prévia execução de planos de proteção ao solo e de combate à erosão” (art. 1º, *caput*, Lei 6.225/1975). Atualmente, o que vigora é o Programa Nacional de Bacias Hidrográficas e Conservação de Solos na Agricultura, programa este que visa diretamente à preservação e ao uso sustentável dos recursos hídricos e do solo (AVANZI *et al.*, 2009, p. 119). No mesmo ano, entra em vigor o Decreto 76.470/1975, que “cria o Programa Nacional de Conservação dos Solos – P.N.C.S. – e dá outras providências”. No seu primeiro artigo, a lei demonstra o seu objetivo, que é “promover, em todo o território nacional, a adoção das práticas de conservação do solo, assim entendidos a manutenção e o melhoramento da sua capacidade produtiva”.

O parcelamento do solo urbano, regulado pela Lei 6.766/1979, por tratar do loteamento e desmembramento do solo urbano e, portanto, mais especificamente relacionado aos aspectos quantitativos do recurso, foge do escopo qualitativo dado ao tratamento da contaminação dos solos. Contudo, a alocação de atividades potencialmente causadoras de significativos impactos sobre a qualidade do solo, como postos de gasolina, deveria merecer tratamento especial. A título de ilustração, apenas o Estado de São Paulo possui legislação específica

para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), segundo Jacques e colaboradores (2007). Continuando com os autores, concordamos que:

Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HAPs, devido aos postos de combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis (JACQUES *et al.*, 2007, p. 1.193).

Apesar dos impactos reais e potenciais a que se encontra submetido, o solo permanece como recurso secundário ou subsidiário, merecendo tratamento jurídico apenas como recurso natural que se presta a alguma atividade econômica principal, como a agricultura, sem o estabelecimento específico de normas, de padrões de emissão e locais das diferentes atividades econômicas.

Apenas com o advento da Lei 6.938/1981 (Política Nacional de Meio Ambiente) o solo passa a receber tratamento diferenciado, assim como toda a temática ambiental. O marco do ordenamento jurídico ambiental denota, pela primeira vez em âmbito federal, a perspectiva holística do ambiente, que seria recepcionada pela CF/88.

Assim sendo, nesta lei federal está estabelecido que:

Art. 2º - A Política Nacional do Meio Ambiente tem por objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento socioeconômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana, atendidos os seguintes princípios:

[...] II - racionalização do uso do solo, do subsolo, da água e do ar;

[...]

Art. 3º - Para os fins previstos nesta Lei, entende-se por: [...] V - recursos ambientais: a atmosfera, as águas interiores, superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo, os elementos da biosfera, a fauna e a flora (Lei 6.938/1981).

Ao reconhecer a importância do solo como recurso ambiental individualizado e definir como princípio da Política Nacional de Meio Ambiente (PNMA) a racionalização do seu uso, devemos interpretar que a Lei 6.938/1981 determina que o recurso ambiental “solo” deve ser preservado e restaurado “com vistas à sua utilização racional e disponibilidade permanente, concorrendo para a manutenção do equilíbrio ecológico propício à vida” (art. 4º, VI, Lei 6.938/1981). Concepção que nos parece ancorada, quando da leitura da legislação ambiental em vigor, nas Leis 7.661/1988, 8.171/1991, 9.433/1997 e 9.605/1998, impregnadas de dispositivos relacionados à gestão e fiscalização do seu uso racional.

Daí compreendermos que o legislador, ainda que não explicitamente ou de forma rudimentar, concebia a perspectiva de longo prazo e, portanto, de sustentabilidade no uso dos recursos ambientais, de forma geral, e do solo, especificamente. Preocupação que, devido ao aumento das atividades humanas e à pressão antrópica sobre os recursos naturais, tais como o solo e a água, vem se destacando nas últimas décadas.

A utilização descuidada e sem planejamento dos recursos naturais ocasionou a degradação e as alterações nos ecossistemas naturais, principalmente devido ao manejo incorreto dos solos, resultando na desvinculação entre crescimento econômico e desenvolvimento sustentável (AVANZI *et al.*, 2009, p. 116; SILVA *et al.*, 2011, p. 2). Estas ações antrópicas, ao longo do tempo, têm alterado a fertilidade dos solos e reduzido a capacidade dos indicadores biológicos em indicar o nível de degradação ambiental (OLIVEIRA e SOUTO, 2011, p. 2).

Ainda assim, a tutela jurídica da qualidade do solo, como ocorre na Lei de Crimes Ambientais (Lei 9.605/98), está inserida em uma interpretação geral do crime de poluição, tipificado no art. 54: “Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora” (no mesmo sentido, as infrações e sanções administrativas previstas no Decreto 6.514/2008, especialmente em seu art. 61).

Especificamente, há a qualificação do crime tipificado no art. 54, § 2º, V, de ocorrência de poluição “por lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, ou detritos, óleos ou substâncias oleosas, em desacordo com

as exigências estabelecidas em leis ou regulamentos” (v. art. 62, V, Decreto 6.514/2008).

Segundo Silva e colaboradores (2011, p. 2), quando os sistemas naturais são modificados pela ação humana, estas áreas tornam-se degradadas e podem ter a sua capacidade melhorada, conservada ou diminuída. Quando a alteração está associada a processos que resultam na perda da capacidade natural do sistema, diz-se que estas áreas estão degradadas. Sendo assim, a qualidade do solo e a sua sustentabilidade podem ser afetadas por fatores tais como o sistema político que norteia a tomada de decisão do Poder Público, as forças sociais, a pressão demográfica, a disputa de terra, as aspirações e as necessidades de cada tipo de cultura.

Nesse sentido, o licenciamento ambiental, configurado como principal instrumento da PNMA (art. 9º, IV, Lei 6.938/81), e a elaboração do Estudo de Impacto Ambiental (EIA), constitucionalmente prevista no art. 225, § 3º, CF/88), constituem-se fundamentais para a qualidade do solo, especialmente em razão da poluição por resíduos da cadeia petrolífera. O licenciamento ambiental do setor está obrigado a elaborar o EIA e respectivo Relatório de Impacto Ambiental (RIMA), conforme disposição da Resolução CONAMA 001/86 (v. art. 2º, III, V e VIII). A previsão dos impactos sobre o solo dessas atividades é item obrigatório do EIA/RIMA, de acordo com os arts. 5º, II, e 6º, II, da mesma Resolução. Cabe, portanto, ao órgão ambiental o acompanhamento e a fiscalização das atividades em conformidade com as condicionantes do licenciamento ambiental e, assim sendo, aumentar a objetividade da proteção desse recurso, suprindo, de certa forma, a lacuna legal discutida.

Para tanto, devemos entender a concepção constitucional de desenvolvimento sustentável – vinculadora para as políticas públicas, especificamente, as políticas ambientais – da maneira mais ampla possível, conforme argumentação de Machado e Vilani (2010; 2011). Partimos da competência da União, dos Estados e do Distrito Federal de legislar concorrentemente sobre defesa do solo (art. 24, VI, CF/88). A partir da construção teórica dos autores e pelo exposto até aqui, podemos aplicar, no que toca ao tema deste trabalho, que o desenvolvimento sustentável nacional pressupõe o cumprimento da função social da propriedade rural e o planejamento e o adequado aproveitamento do solo urbano, de acordo

com os ditames das funções sociais da cidade, para as presentes e futuras gerações (art. 182, *caput*, § 4º e art. 186, *caput*, c/c. art. 225, *caput*, *in fine*, CF/88).

Para tanto, para se pensar em desenvolvimento sustentável é preciso que haja regulamentação específica em relação à qualidade do solo, tanto para as políticas de desenvolvimento urbano como para as políticas agrárias e em suas interfaces com as demais políticas setoriais. A distância que nos encontramos para o estabelecimento de uma política nacional integradora é a mesma para a construção das bases de dignidade para a existência das presentes e futuras gerações.

Ainda que no ordenamento jurídico estejam previstos instrumentos para a proteção do solo, a ausência de normas específicas limita a atuação dos próprios órgãos ambientais encarregados do licenciamento ambiental, visto estarem submetidos ao princípio da legalidade.

No atual momento de expansão da atividade petrolífera no país, com novas refinarias e as expectativas em torno da produção do Pré-sal, a destinação dos resíduos produzidos diretamente pela indústria petrolífera, além daqueles contaminados por seus derivados, como óleos, graxas e combustíveis, deve repercutir diretamente na regulamentação da qualidade do solo. Isso porque a falta de planejamento ou a destinação inadequada em aterros sanitários e industriais, além da disposição em lixões e vazadouros, comprometerá o solo, com seus desdobramentos sobre os recursos hídricos.

Para exemplificar a complexidade do tema e a relevância da discussão, destacamos, a partir de Bona e Santos (*apud* MARANHÃO *et al.*, 2009, p. 268), que o petróleo reduz a capacidade de retenção de água pelo solo, interferindo no crescimento das plantas (v. tb. GOGOSZ *et al.*, 2010; LOPES e PIEDADE, 2010).

A edição de normas específicas e a implementação de políticas públicas precisam, portanto, reconhecer e internalizar a natureza holística da questão ambiental sob uma perspectiva de longo prazo, em respeito ao direito das futuras gerações à qualidade de vida.

A preocupação de longo prazo precisa ser ressaltada e, por isso, encontra-se relevada no conceito de desenvolvimento sustentável sob o manto da responsabilidade intergeracional, diante da magnitude dos impactos relacionados ao solo, como a desertificação. Oliveira e Souto (2011, p. 3) destacam da Convenção

Mundial de Combate à Desertificação (Projeto BRA 93/036 – operacional até 2000, quando começou a ser reestruturado) seu primeiro artigo, com a seguinte definição de degradação de terras:

[...] redução ou a perda da produtividade biológica ou econômica das terras agrícolas de sequeiro das terras de cultivo dos pastos e dos bosques em zonas áridas, semiáridas e subúmidas secas, pelos sistemas de utilização de terra ou por um processo ou uma combinação de processos, incluídos os resultantes de atividades humanas e padrões de povoamento, tais como: [...] (ii) a deterioração das propriedades físicas, químicas e biológicas ou das propriedades econômicas do solo e (iii) a perda duradoura da vegetação natural.

Hillei (1998, *apud* DINIZ FILHO *et al.*, 2007, p. 28) destaca que “a civilização atual cada vez mais dependerá do solo, principalmente porque vem aumentando esta dependência, enquanto os recursos naturais disponíveis de solo vêm diminuindo e sendo deteriorados”.

Kathounian (2001, *apud* VEZZANI e MIELNICZUK, 2009, p. 750) afirma que “a fertilidade é a capacidade de gerar vida, e é da matéria vegetal que se nutrem os complexos de vida”. Sendo assim, o mesmo autor complementaria que “não está no solo, nem nas plantas, nem nos animais, mas no seu conjunto dinâmico, integrado e harmônico, que se reflete em boas propriedades do solo e boa produção vegetal e animal”.

Por meio da preservação, monitoramento e respostas ao uso do solo pode-se perceber as alterações que o ser humano vem causando ao solo de forma cada vez mais intensa e acelerada. Sendo assim, seria interessante relacionar as alterações que vêm ocorrendo ao longo do tempo (que podem resultar na extinção de diversas civilizações) com a sustentabilidade dos sistemas (DINIZ FILHO *et al.*, 2007, p. 28; SILVA *et al.*, 2011, p. 10).

Vezzani e Mielniczuk (2009, p. 750) destacam que o solo, agindo isoladamente, não consegue atingir a sua plena qualidade, necessitando da vegetação que ali se desenvolve para tal. Entretanto, segundo os mesmos autores, não se pode esquecer dos demais sistemas envolvidos no processo para recuperação do solo, tais como seus microrganismos presentes, integrados e adaptados ao seu local no ambiente, tese corroborada por estudos

desenvolvidos, por exemplo, por Maranhão *et al.* (2009), Lopes e Piedade (2010), Jacques *et al.* (2007) e Mariano *et al.* (2007).

Constatamos que a regulamentação do solo em nosso ordenamento ainda carece de maior sistematicidade, apesar dos avanços alcançados na década de 1990, e que esta tarefa demanda urgência diante dos impactos provenientes da gestão inadequada do solo, em área urbana ou rural. Defendemos a necessidade de aplicação do modelo de desenvolvimento sustentável encerrado na Constituição Federal pelas políticas públicas ambientais, em especial aquelas que tratem, direta ou indiretamente, do solo.

Podemos, diante do cenário apresentado, tecer algumas considerações e proposições no sentido de fortalecer esse processo de construção de uma sociedade economicamente desenvolvida e socialmente igualitária em um ambiente ecologicamente equilibrado (MACHADO, 2012).

Considerações finais

O solo é um recurso natural extremamente complexo e que permite que os demais recursos fiquem disponíveis na sua melhor forma. Este recurso, estando ecologicamente equilibrado e com a sua qualidade assegurada, possibilita a produtividade biológica, mantém a qualidade dos outros recursos ambientais e, por fim, permite a sobrevivência do homem em um ecossistema equilibrado por um longo tempo.

O arcabouço ambiental em relação ao solo foi sendo construído aos poucos e vem sendo constantemente ampliado. O passo inicial desta construção foi dado em 1975, demonstrando uma primeira preocupação com o solo propriamente dito, porém mais voltada para a erosão que prejudicaria a vida humana.

A década de 80 foi marcada por dispositivos que fizeram com que este recurso passasse a ser realmente reconhecido. No início da década de 80, o solo foi identificado como recurso ambiental, sendo exigido o seu uso racional. Na década seguinte, teve início a preocupação com o solo pelo uso de agrotóxicos e, posteriormente, seu tratamento vinculado à gestão das águas. A caminhada legislativa, entretanto, apesar destes avanços e do

estabelecimento de penalidades pelos danos causados ao solo, estagnou no processo de erosão e ampliou o rol de danos ambientais, como aqueles inerentes à indústria petrolífera, que podem comprometer a qualidade solo.

As lacunas deixadas pela política ambiental adotada nos últimos anos tornam preocupante a questão da indústria do petróleo no país. Conforme descrito por Silva e colaboradores (2011), a cadeia do petróleo é vasta e extremamente poluente desde os primeiros processos de prospecção até sua distribuição e utilização dos derivados pelo consumidor final.

Ao se fazer uma análise das principais resoluções do CONAMA, se observa claramente a preocupação do órgão em regular questões relacionadas à poluição das águas em primeira instância. Até nas resoluções de abrangência maior, como a Resolução 420/2009, percebe-se claramente o objetivo primário da resolução, que é proteger o solo que entra em contato com ambientes aquáticos. Isto é observado no artigo segundo, parágrafo único. A Resolução 362/2005 é outro dispositivo que trata do descarte de óleo lubrificante usado ou contaminado, porém com enfoque na proteção aos ambientes aquáticos. Esta resolução é uma, entre outras, que não privilegiam o solo como objeto principal do próprio dispositivo jurídico regulamentador. Em todo texto, percebe-se a preocupação com a problematização da poluição do solo alcançar leitos aquáticos. Esta preocupação é válida, porém não deve pautar uma resolução que se propõe regulamentar questões direcionadas à poluição do solo.

Obviamente, a poluição da água, em conjunto com a poluição do solo, é importante e merece o devido tratamento, porém os impactos ambientais de tais poluições são diferentes, alcançam ambientes diferentes e por isto devem ser tratados de forma diferenciada.

Em termos gerais, o desafio central, observado a partir da legislação analisada, é o tratamento esparso do solo em meio às diferentes normas ambientais em vigor, que disciplinam desde aspectos ambientais da agricultura até a gestão das águas. Entretanto, apesar de reconhecida a importância do solo como substrato de atividades econômicas e de conservação de outros recursos naturais, não há, ainda, uma regulamentação que estabeleça as diretrizes, princípios e objetivos do planejamento e gestão de seu uso racional.

Especificamente, duas questões merecem atenção ao se pensar a interface entre o desenvolvimento da atividade petrolífera no país e a conservação da qualidade do solo para as presentes e futuras gerações:

- a. Ausência de regulamentação clara sobre a poluição do solo causada por petróleo e derivados;
- b. Tratamento da poluição do solo como uma poluição secundária.

Passadas três décadas do conceito legal de meio ambiente como o “conjunto de condições, leis, influências e interações de ordem física, química e biológica, que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas” (art. 3º, I, Lei 6.938/1981), não é concebível a permanência de lacunas em relação à visão holística de meio ambiente. Sobretudo, diante de um recurso cuja racionalização de seu uso é considerada essencial para a manutenção do equilíbrio ecológico propício à vida (art. 2º, II c/c. 4º, VI, Lei 6.938/1981).

As resoluções CONAMA precisam urgentemente de reformulações para que tenham abrangência maior do que as regulamentações existentes hoje. Há necessidade clara de tratamento mais detalhado em relação à poluição de solo causada por vazamentos de petróleo e derivados, além de melhor regulamentação sobre os transportes de derivados, quer sejam por navios, caminhões ou dutos de transporte.

O arcabouço judiciário brasileiro voltado para a matéria ambiental vem sendo constantemente revisto e adaptado. Para atingir o seu pleno objetivo, assim como permitir que ocorra um “desenvolvimento sustentável”

de maneira mais eficiente, acreditamos que é importante diferenciar os ambientes (urbanos e rural) e dar uma atenção aos diferentes tipos de solo que temos no país, permitindo com que este não seja cada vez mais degradado por um insistente processo de planejamento imediatista.

Não se trata aqui de proposições oriundas de mera especulação teórica, mas do cumprimento das disposições contidas na PNMA, em especial aquelas relacionadas ao estabelecimento de critérios e padrões de qualidade ambiental e de normas relativas ao uso e manejo do solo, consoante entendimento do objetivo encerrado no art. 4º, III.

As lacunas relacionadas à proteção do solo, em última análise, demonstram o descompasso entre, de um lado, o alcance das leis ambientais e das resoluções do CONAMA, e, de outro, o modelo de desenvolvimento sustentável definido pela Constituição Federal e as disposições da PNMA.

Dessa forma, pode-se admitir que a ausência de padrões e normas específicos para a qualidade do solo, em relação à poluição pela indústria petrolífera particularmente, denota a insustentabilidade da prática político-institucional em andamento no país.

Caminhamos, assim, em meio a um cipoal de normas e políticas ambientais destituídas de preocupação com um substrato vital para o meio ambiente ecologicamente equilibrado e, portanto, sem eficácia no sentido de assegurar existência digna para as presentes e futuras gerações.

Referências

- ADAMS, R. H.; MORALES-GARCÍA, F. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. I: Consideraciones para La salud pública y protección al ganado. *Interciencia*, v. 33, n. 7, p. 476-482, 2008.
- _____; ZAVALA-CRUZ, J.; MORALES-GARCÍA, F. 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.
- ALMEIDA, J. G. A. *Políticas públicas e gestão ambiental*. 2007. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/EA/adm/admarqs/JulianAlmeida.pdf>>. Acesso em: 22/12/2011.
- ANDRADE, M. T.; MARZULLO, A. C.; SANTOS, F. C.; YOUNG, C. E. F. *Emissão de poluentes na indústria do petróleo*. Instituto de Economia da UFRJ. Rio de Janeiro, 2003.
- AVANZI, J. C.; BORGES, L. A. C.; CARVALHO, R. Proteção legal do solo e dos recursos hídricos no Brasil. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v. 2, n. 2, p. 115-128, 2009.
- BACKER, K. H.; HERSON, D. S. *Bioremediation*. New York: McGraw-Hill, 1994.
- BARROS, D.; OLIVEIRA, V.; SANTANA, M. F. E.; CARVALHO, D. D. Caracterização ambiental dos postos de revenda

- de combustíveis no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 15., 2008. Rio Grande do Norte. *Anais*.
- BENJAMIN, A. H. (Org.). *Manual Prático da Promotoria de Justiça do Meio Ambiente*. São Paulo: IMESP, 1999.
- CACHUMANI, R. M. L. Aspectos sobre avaliação ambiental das atividades de exploração e produção de petróleo marítimo da Bacia de Campos. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 4., 2008. Niterói. *Anais*.
- CHANDRA, R.; BHARAGAVA, R. N.; YADAV, S.; MOHAN, D. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, p. 1514-1521, 2009.
- CHAVES, M. P. S. R. *Conflitos socioambientais e identidades políticas na Amazônia*. 2010. Disponível em: <<http://www.achegas.net>>. Acesso em: 31/12/2011.
- DERANI, C. *Direito ambiental econômico*. São Paulo: Max Limonad, 2001.
- DIEESE. *As recentes descobertas de petróleo e gás natural e o marco regulatório da indústria de petróleo no Brasil*. DIEESE, 2008, n. 71.
- DINIZ, A. Poluição de solos, riscos e consequências. *Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UFP*, v. 5, p. 97-106, 2005.
- DINIZ FILHO, E. T.; MESQUITA, L. X.; OLIVEIRA, A. M.; NUNES, C. G. F.; LIRA, J. F. B. A prática da compostagem no manejo sustentável de solos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 2, n. 2, p. 27-36, 2007.
- DRUMMOND, J.; BARROS-PLATIAU, A. F. Brazilian environmental laws and policies, 1934-2002: a critical overview. *Law & Policy*, v. 28, n. 1, p. 83-108, 2006.
- GOGOSZ, A. M.; BONA, C.; SANTOS, G.; BOTOSSO, P. Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Braz. J. Biol.*, v. 70, n. 4, p. 977-986, 2010.
- GOMES, P. L.; OLIVEIRA, V. B. P.; NASCIMENTO, E. A. Aspectos e impactos no descarte de óleos lubrificantes: o caso das oficinas. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 4., 2008. Niterói. *Anais*.
- GRAU, E. R. *A ordem econômica na Constituição de 1988*. São Paulo: Malheiros, 2003.
- JACQUES, R. J. S.; ZAIDA, F. M. B.; ANTONIOLLI, I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- LOPES, A.; PIEDADE, M. T. F. The period of contamination with petroleum influences the regrowth of *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitchcock in varzea soil in Central Amazon. *Biota Neotrop.*, v. 10, n. 4, p. 143-148, 2010.
- LUCHESE, C. Petróleo. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 12, n. 33, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v12n33/v12n33a03.pdf>>. Acesso em 28/12/2011.
- MACHADO, C. J. S. (Org.). *Gestão de águas doces*. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.
- _____. (Org.). *Ciências, políticas públicas e sociedade sustentável*. Rio de Janeiro: E-Papers, 2012.
- _____; VILANI, R. M. Aspectos jurídicos ambientais na exploração do Pré-sal: uma leitura do novo marco regulatório sob a perspectiva constitucional. *Revista Forense*, Rio de Janeiro, v. 412, p. 413-427, 2010.
- _____; _____. O novo marco regulatório brasileiro para a exploração das reservas petrolíferas brasileiras. *Revista da Faculdade de Direito da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 1, p. 101-137, 2011.
- MARANHO, L.; DZIEDZIC, M.; MUÑIZ, G.; KUNIYOSHI, Y.; GALVÃO, F. Effects of the pollution by petroleum on the tracheids along the stem of *Podocarpus lambertii* Klotzsch Ex Endl., Podocarpaceae. *Braz. J. Biol.*, v. 69, n. 2, p. 263-269, 2009.
- MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, n. 38, p. 346-353, 2007.
- MELO, R. F.; DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V.; OLIVEIRA, J. A. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p. 455-465, 2009.
- MILARÉ, E. Direito do ambiente: um direito adulto. *Revista de Direito Ambiental*, São Paulo, ano 4, n. 15, p. 34-55, jul./set. 1999.
- MONIÉ, F. Petróleo, industrialização e organização do espaço regional. In: PIQUET, R. *Petróleo, royalties e região*. Rio de Janeiro: Garamond, 2003. p. 257-286.
- MONOSOWSKI, E. Políticas ambientais e desenvolvimento no Brasil. *Cadernos FUNDAP*, São Paulo, n. 9, v. 16, p. 15-24, 1989.

- MOTA, S. *Introdução à Engenharia Ambiental*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. *Sindicato Nacional dos Editores de Livros*, Rio de Janeiro, 1997.
- OLIVEIRA, E. M.; SOUTO, J. S. Mesofauna edáfica como indicadora de áreas degradadas. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2011.
- SAUVY, A. Trois mondes, une planète. *L'Observateur*. Paris: Ed. Societé Démographie, 1952.
- SILVA, J. A. *Direito Ambiental Constitucional*. São Paulo: Malheiros, 1994.
- SILVA, R. C. S.; ALMEIDA, J. C. R.; BATISTA, G. T.; FORTES NETO, P. Os indicadores físicos, químicos e biológicos da qualidade do solo e da sustentabilidade dos ambientes naturais. *Repositório Eletrônico Ciências Agrárias*, Coleção Ciências Ambientais, p. 1-13, 2011.
- SOUZA, A. C. A. A evolução da política ambiental no Brasil do século XX. 2006. Disponível em: <http://www.achegas.net/numero/vinteeseis/ana_sousa_26.htm>. Acesso em: 28/12/2011.
- TEIXEIRA, B. M.; MACHADO, C. J. S. Marco regulatório brasileiro do processo de descomissionamento ambiental da indústria do petróleo. *Revista de Informação Legislativa*, Brasília, v. 49, n. 196, p. 183-203, out./dez. 2012.
- VEZZANI, F. M.; MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p. 743-755, 2009.

Recebido em 10 de dezembro de 2012.

Aceito em 01 de novembro de 2013.

Publicado em dezembro de 2013.

APÊNDICE F – Comprovante de submissão de artigo no periódico “Pesquisa Agropecuária Brasileira” em 06 de fevereiro de 2015.



[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#)
[NOTÍCIAS](#)

[Capa](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões Ativas](#)

Submissões Ativas

[ATIVO](#) [ARQUIVO](#)

ID	MM-DD ENVIADO	SECÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
21147	02-06	FVG	Lemos, Rebello, Pinto, Marques,...	GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL IN VITRO DE...	Aguardando designação

1 a 1 de 1 itens

Iniciar nova submissão

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

[Embrapa Informação Tecnológica](#)

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final) Caixa Postal 040315 - Brasília, DF - Brasil - 70770-901

Fone: +55 (61) 3448-4231 / 3448-4162 - Fax: (61) 3272-4168

[OPEN JOURNAL SYSTEMS](#)

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como:
sidicole

- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

AUTOR

Submissões

- [Ativo](#) (1)
- [Arquivo](#) (0)
- [Nova submissão](#)

IDIOMA

Português (Brasil) ▼

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos ▼

Procurar

- [Por Edição](#)
- [Por Autor](#)
- [Por título](#)

TAMANHO DE FONTE

INFORMAÇÕES

- [Para leitores](#)
- [Para Autores](#)
- [Para Bibliotecários](#)

APÊNDICE G – Comprovante de submissão de artigo no periódico “Revista Brasileira de Ciência do Solo” em 11 de fevereiro de 2015.

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

 ENGLISH VERSIONUsuário: Senha: [Quero me associar](#) | [Esqueci minha](#)

Consulta de Artigos

ROTOCOLO	FUNÇÃO	TÍTULO
093/15	Autor	"GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Ruta graveolens</i> L. EM SOLO BIORREMEDIADO E SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO E DERIVADOS"

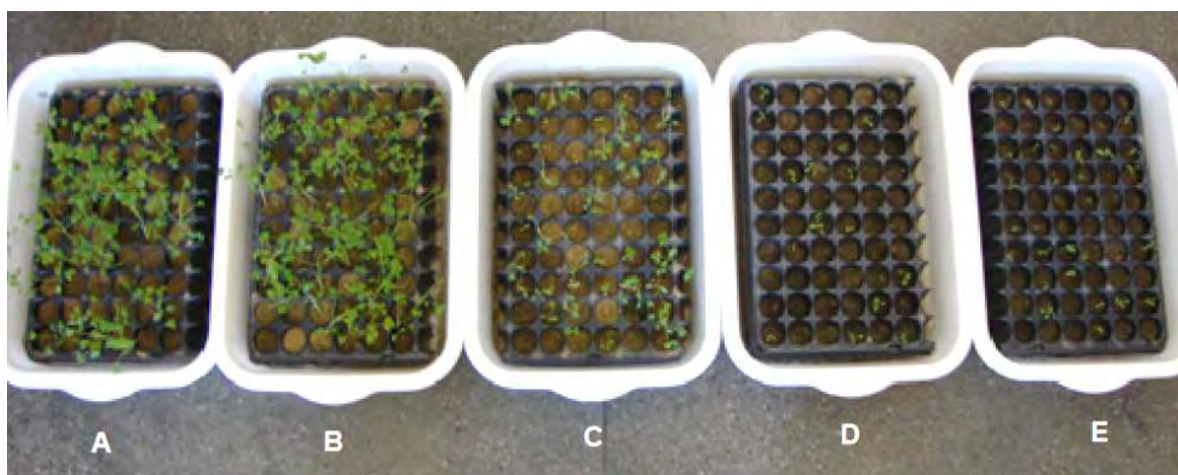


: 04430

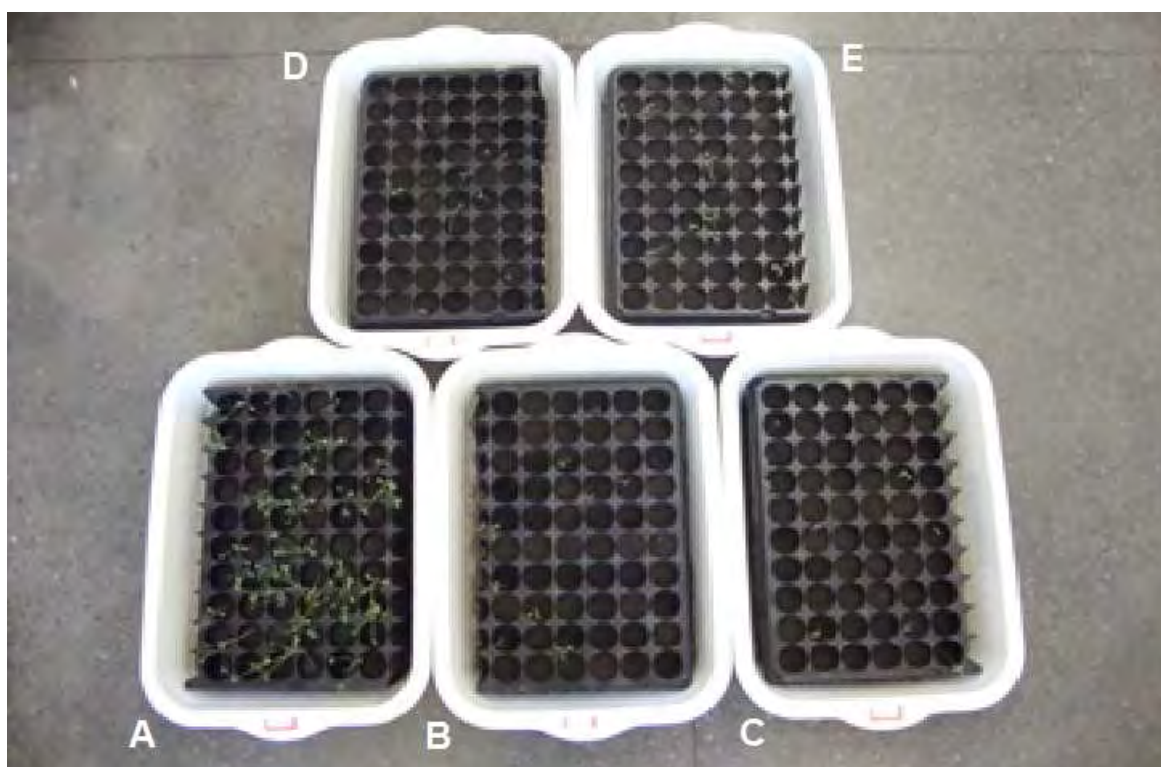


Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Departamento de Solos Edifício Silvio Brandão
Caixa Postal 231 - Campus da UFV
CEP 36570-000 - Viçosa-MG
Telefone: 31 3899-2471 - E-mail: sbcs@sbcs.

APÊNDICE H - Desenvolvimento pós-seminal de *R. graveolens* após 60 dias em solo contaminado artificialmente com OD.

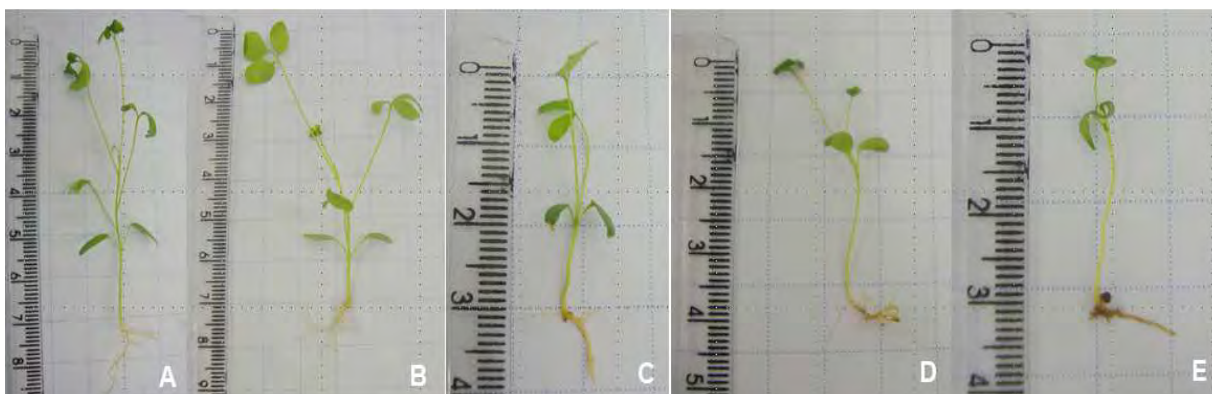


Legenda: (A) solo controle; (B) solo contaminado com 0,25 % OD; (C) solo contaminado com 0,50 % OD; (D) solo contaminado com 1,0 % OD e (E) solo contaminado com 2,0 % OD.



Legenda: (A) solo controle; (B) solo contaminado com 3,0 % OD; (C) solo contaminado com 4,0 % OD; (D) solo contaminado com 5,0 % OD e (E) solo contaminado com 6,0 % OD.

APÊNDICE I - Plântulas de *R. graveolens* após 60 dias em solo contaminado artificialmente com OD.



Legenda: (A) solo controle; (B) solo contaminado com 0,25 % OD; (C) solo contaminado com 0,50 % OD; (D) solo contaminado com 1,0 % OD e (E) solo contaminado com 2,0 % OD.



Legenda: (A) solo controle; (B) solo contaminado com 3,0 % OD; (C) solo contaminado com 4,0 % OD; (D) solo contaminado com 5,0 % OD e (E) solo contaminado com 6,0 % OD.

APÊNDICE J - Organogênese direta de *Ruta graveolens*.



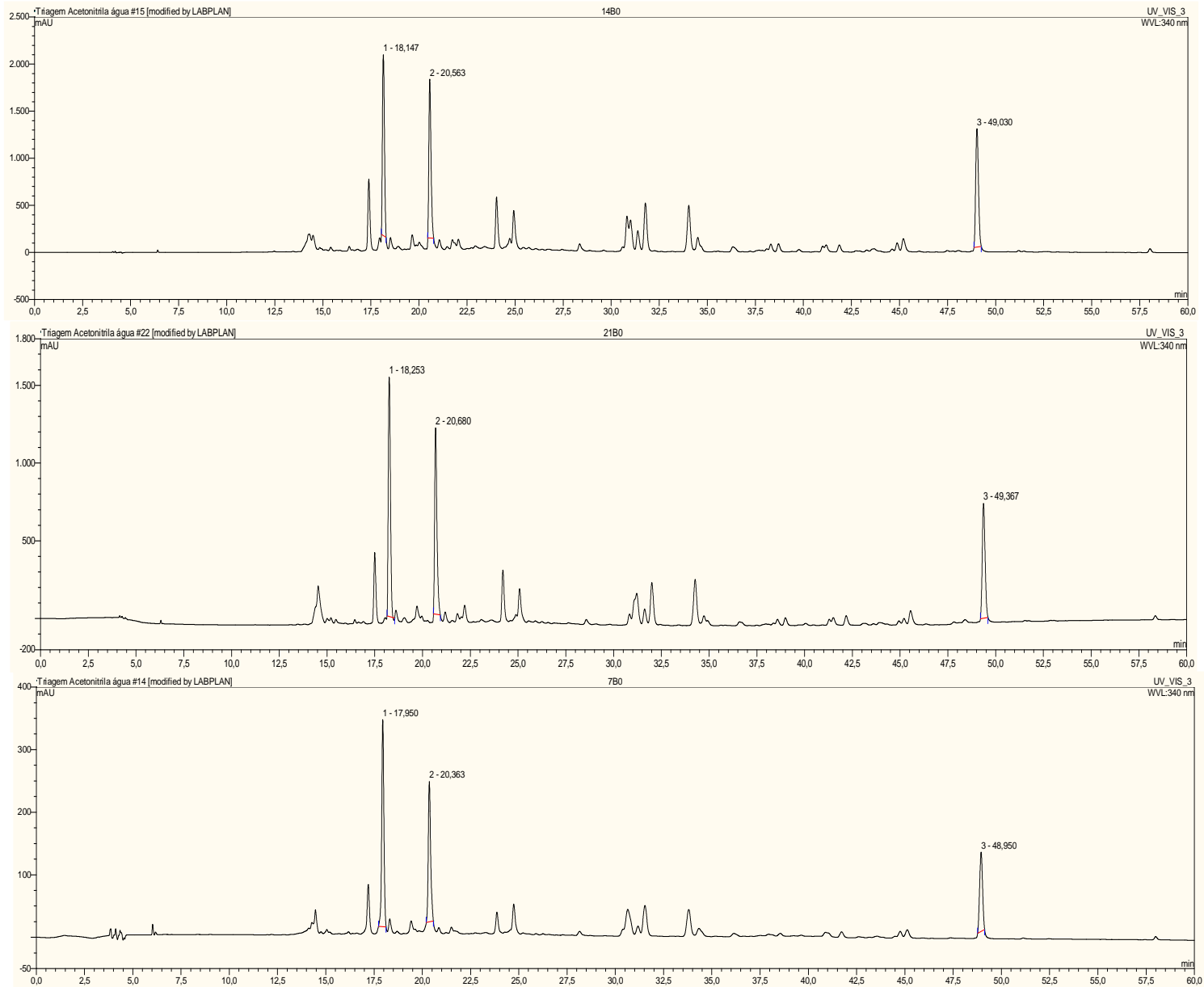
Legenda: brotos multiplicados em MS0.



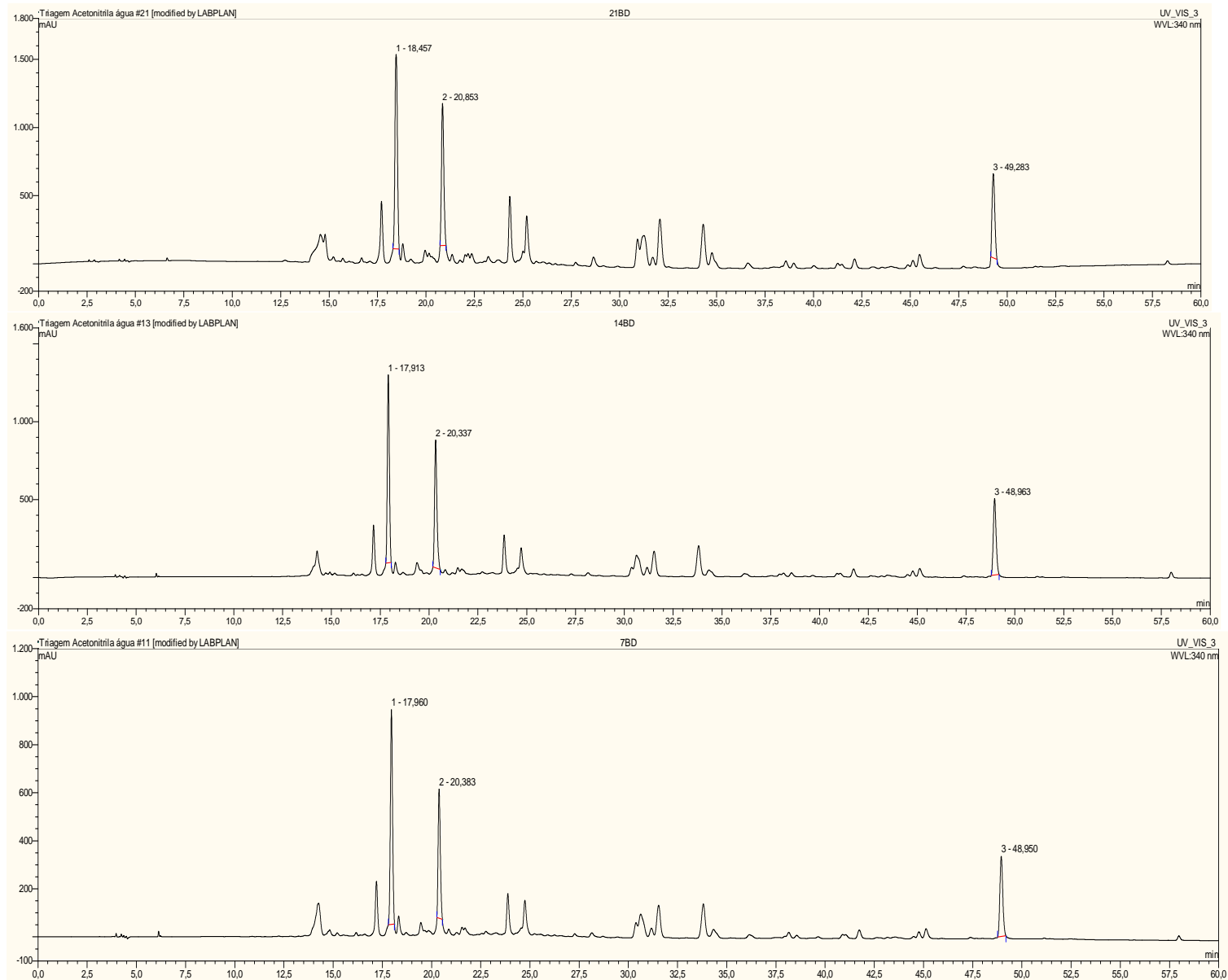
Legenda: plantas mantidas em MS0.



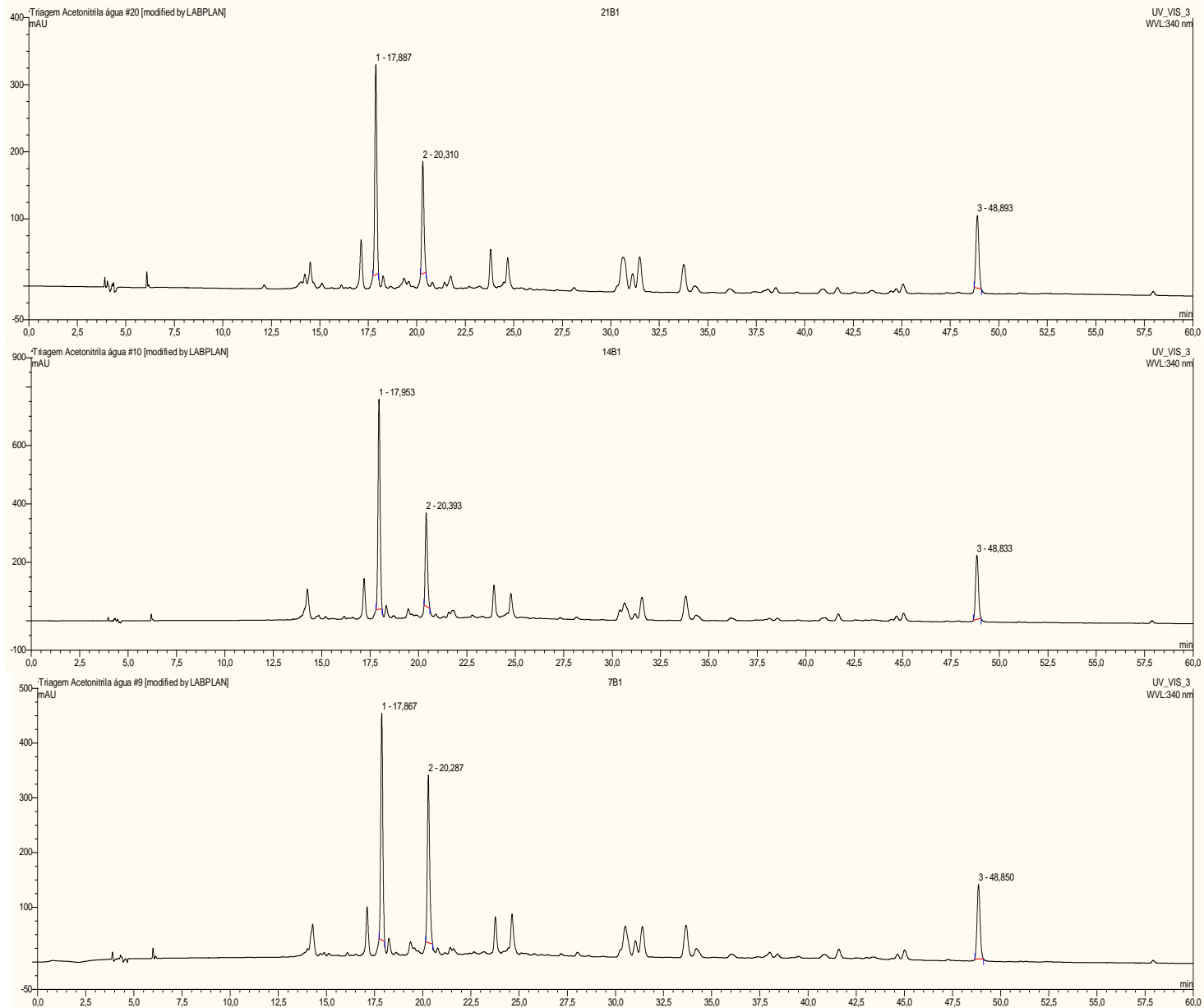
Legenda: Estoque de plantas mantidos *in vitro*.

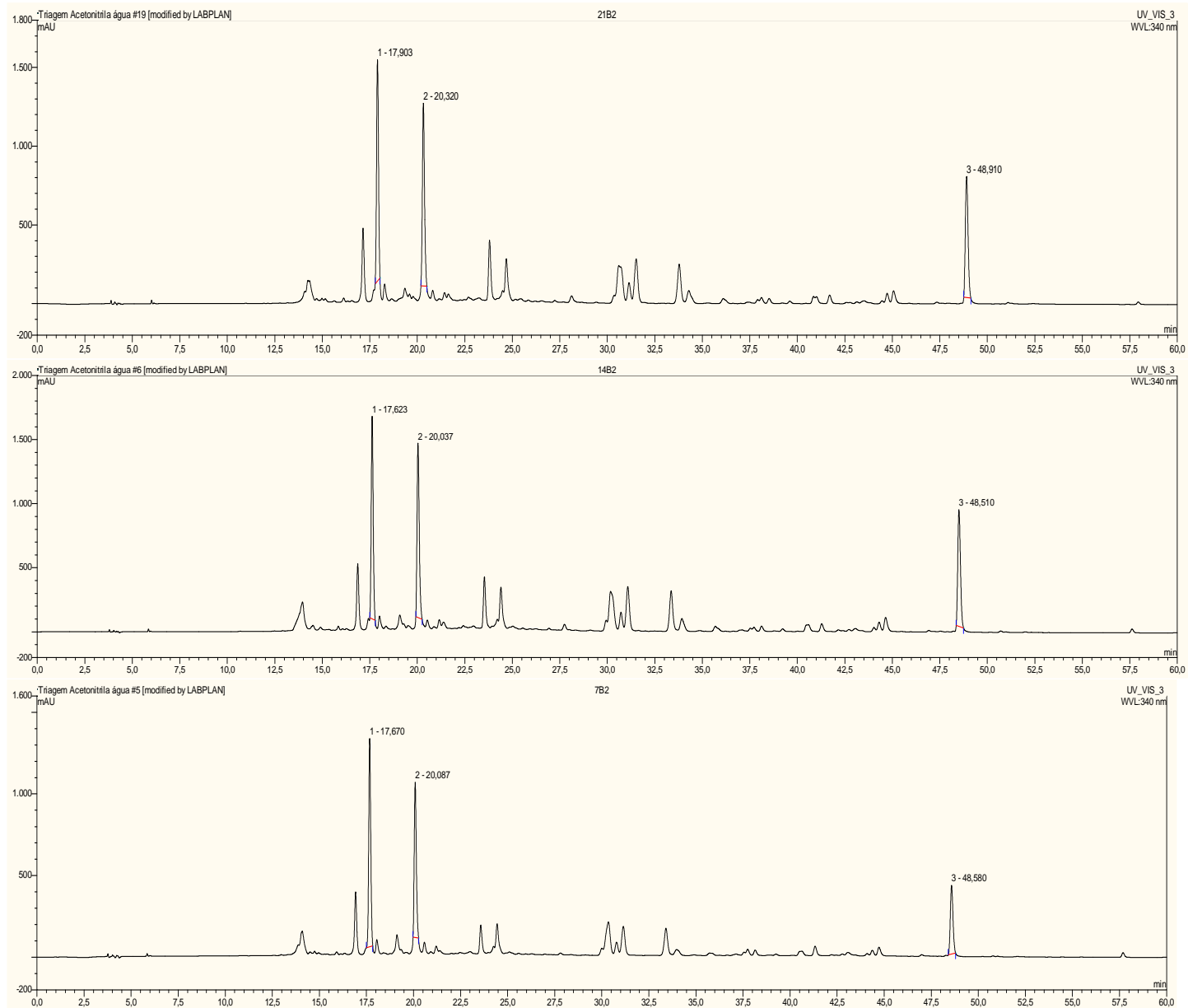
APÊNDICE K - Cromatograma de *Ruta graveolens* expostas a benzo[a]pireno *in vitro* por 21 dias (MSO).

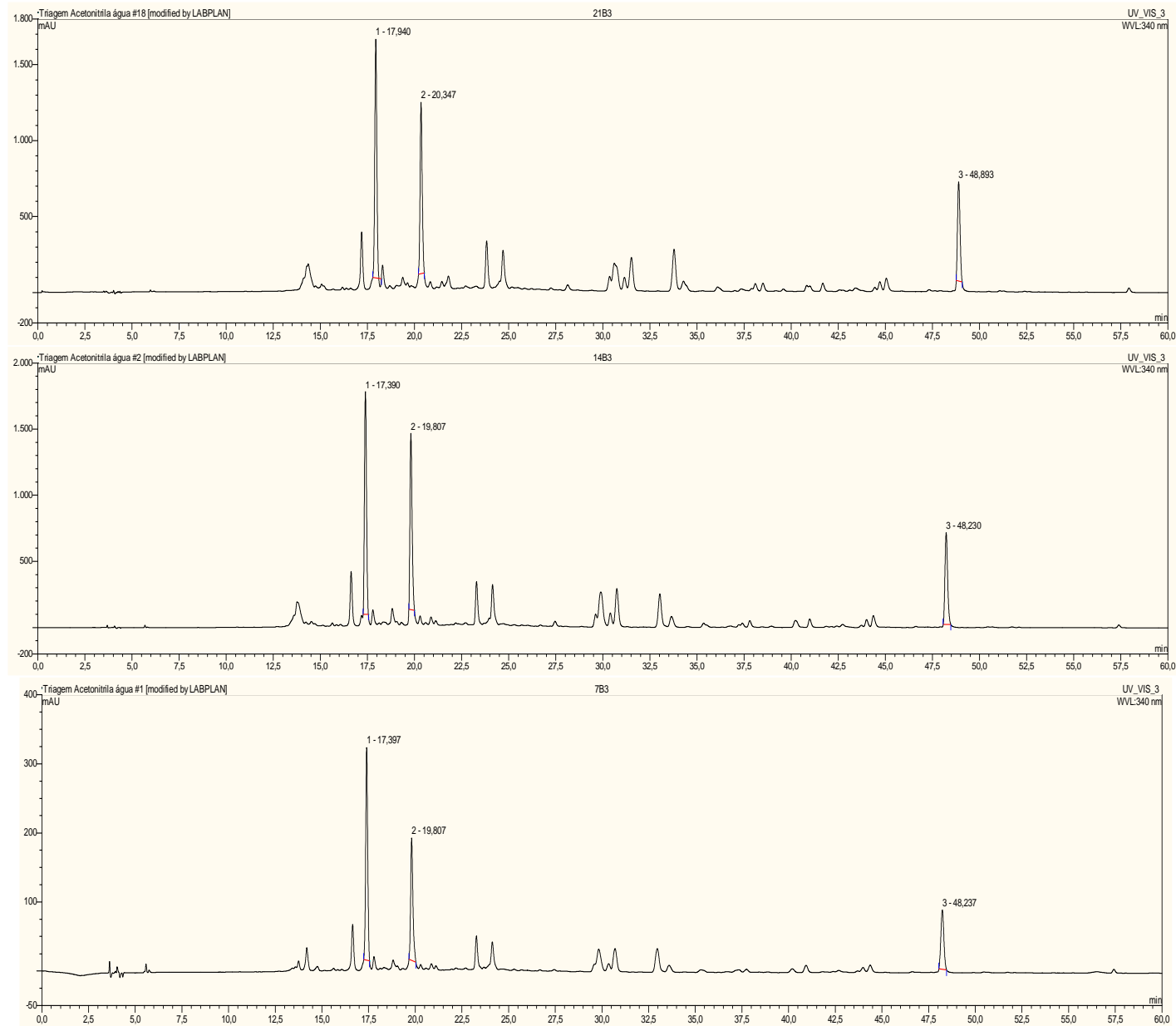
APÊNDICE L - Cromatograma de *Ruta graveolens* expostas a benzo[a]pireno *in vitro* por 21 dias (MSDCM).




APÊNDICE M - Cromatograma de *Ruta graveolens* expostas a benzo[a]pireno *in vitro* por 21 dias (B[a]P1).




APÊNDICE N - Cromatograma de *Ruta graveolens* expostas a benzo[a]pireno *in vitro* por 21 dias (B[a]P2).

APÊNDICE O - Cromatograma de *Ruta graveolens* expostas a benzo[a]pireno *in vitro* por 21 dias (B[a]P3).

ANEXO A - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) – óleo diesel S50

 Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ	
PRODUTO: ÓLEO DIESEL S 50 Página 1 de 10	
Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108 Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores	
1 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA	
Nome do produto:	ÓLEO DIESEL S50
Código interno de identificação:	BR0108
Nome da empresa:	PETROBRAS DISTRIBUIDORA S.A.
Endereço:	Rua General Canabarro 500 20271-900 - Maracanã - Rio de Janeiro (RJ).
Telefone:	0800 78 9001
Telefone para emergências:	08000 24 44 33
2 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS	
PERIGOS MAIS IMPORTANTES:	Líquidos e vapores inflamáveis, Nocivo se inalado, Causa irritação à pele, Causa dano ao trato gastrointestinal, sistema nervoso central e pulmões se ingerido, Pode causar dano ao fígado e rins se ingerido, Pode causar sonolência e vertigem (efeitos narcóticos), Pode causar irritação respiratória (irritação da área respiratória), Pode ser mortal em caso de ingestão e por penetração nas vias respiratórias, Este produto contém gás sulfídrico, extremamente tóxico e inflamável.
EFEITOS DO PRODUTO	
- Efeitos adversos à saúde humana:	O produto pode causar efeitos narcóticos e irritação respiratória se inalado, Pode causar irritação aos olhos, Causa dano ao trato gastrointestinal, sistema nervoso central e pulmões se ingerido, Pode causar dano ao fígado e rins se ingerido, Pode causar morte se aspirado.
- Efeitos ambientais:	Este produto pode apresentar perigo para o meio ambiente em casos de grandes derramamentos.
- Perigos físicos e químicos:	Líquidos e vapores inflamáveis.
- Perigos específicos:	Líquidos e vapores inflamáveis, Recipientes podem explodir se aquecidos, Quando aquecidos, este líquido libera gases irritantes e tóxicos.
- Principais sintomas:	Vermelhidão, dor e lacrimejamento ocular, Náuseas, vômitos e cólicas abdominais, Tosse e insuficiência respiratória severa, Tontura, vertigens, dores de cabeça, confusão mental, perda de consciência, Engasgos e dispnéia.
- Classificação de perigo do produto:	Líquidos inflamáveis – Categoria 3 Toxicidade aguda – Inalação – Categoria 4 Corrosivo/irritante à pele – Categoria 2 Toxicidade sistêmica ao órgão-alvo após única exposição –

 Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ	
PRODUTO: ÓLEO DIESEL S 50 Página 2 de 10	
Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108 Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores	
	Categoria 3 Perigo por aspiração – Categoria 1
- Sistema de classificação adotado:	Norma ABNT-NBR 14725-Parte 2:2009, Adoção do Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, ONU.
- Visão geral das emergências:	LÍQUIDO INFLAMÁVEL E PERIGOSO PARA A SAÚDE HUMANA,
ELEMENTOS APROPRIADOS DA ROTULAGEM	
- Pictogramas:	
- Palavra de advertência:	PERIGO
- Frases de perigo:	Líquidos e vapores inflamáveis, Nocivo se inalado, Causa irritação à pele, Causa dano ao trato gastrointestinal, sistema nervoso central e pulmões se ingerido, Pode causar dano ao fígado e rins se ingerido, Pode causar sonolência e vertigem (efeitos narcóticos), Pode causar irritação respiratória (irritação da área respiratória), Pode ser mortal em caso de ingestão e por penetração nas vias respiratórias.
- Frases de precaução:	Mantenha afastado de calor [fiscas] [e chama] [não fume], Armazene em local fresco/baixa temperatura, em local bem ventilado [seco] [afastado de fontes de calor e de ignição], Nunca aspire (poeira, vapor ou névoa), Quando em uso não [fume] [coma] [ou beba], Não use em local sem ventilação adequada, Evite contato com olhos e pele, Use equipamento de proteção individual apropriado, Se ingerido, lave a boca com água [somente se a vítima estiver consciente], Em caso de indisposição, consulte um médico, Use meios de contenção para evitar contaminação ambiental.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 3 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P

Anula e substitui versão: Todas as anteriores

Não permita o contato do produto com corpos d'água.

3 - COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE OS INGREDIENTES

>>>SUBSTÂNCIA DE PETRÓLEO

Grupo de substância de petróleo:

Gasóleos: Óleo diesel

Gasóleos e óleos destilados são misturas complexas de petróleo, compostas primariamente de hidrocarbonetos saturados (parafínicos ou naftênicos) ou aromáticos com cadeia carbônica composta de 9 a 30 átomos de carbono e ponto de ebulição entre 150 e 471°C.

Número de registro CAS:

68334-30-6

Ingredientes que contribuem para o perigo:

Ingredientes	Concentração (%)	CAS
Composto sulfurado,	-	NA
Composto nitrogenado,	-	NA
Composto oxigenado,	-	NA
Enxofre	Máx 50 mg/Kg	NA

4 - MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Inalação:

Remova a vítima para local arejado e mantenha-a em repouso. Monitore a função respiratória. Se a vítima estiver respirando com dificuldade, forneça oxigênio. Se necessário aplique respiração artificial. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Contato com a pele:

Remova as roupas e sapatos contaminados. Lave a pele exposta com grande quantidade de água, por pelo menos 15 minutos. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Contato com os olhos:

Lave com água corrente por pelo menos 15 minutos, mantendo as pálpebras abertas. Retire lentes de contato quando for o caso. Procure atenção médica imediatamente. Leve esta FISPQ.

Ingestão:

Lave a boca da vítima com água em abundância. NÃO INDUZA O VÔMITO. Procure atenção médica. Leve esta FISPQ.

Proteção do prestador de socorros e/ou notas para médico:

Evite contato com o produto ao socorrer a vítima. Mantenha a vítima em repouso e aquecida. Não forneça nada pela boca a uma pessoa inconsciente. O tratamento sintomático deve compreender, sobretudo, medidas de suporte como correção de distúrbios hidroeletrólitos, metabólicos, além de assistência respiratória.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 4 de 10

Data: 03/01/2011

Nº FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P

Anula e substitui versão: Todas as anteriores

5 - MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios de extinção apropriados:

Produto inflamável. Compatível com pó químico, dióxido de carbono (CO₂) e neblina de água.

Meios de extinção não recomendados:

Jatos d'água. Água diretamente sobre o líquido em chamas.

Métodos especiais de combate:

Contêineres e tanques envolvidos no incêndio devem ser resfriados com jatos d'água.

Perigos específicos no combate:

Recipientes podem explodir quando aquecidos. Vapores podem se dispersar e atingir fontes de ignição e provocar chamas de retrocesso. Risco de explosão em ambientes fechados. Este produto contém gás sulfídrico, extremamente inflamável.

Proteção de bombeiros/brigadistas:

Equipamento de proteção respiratória do tipo autônomo (SCBA) com pressão positiva e vestuário protetor completo.

6 - MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO

Precauções pessoais

Produto inflamável. Remova todas as fontes de ignição. Impeça faíscas ou chamas. Não fume.

Remoção de fontes de ignição:

Produto inflamável. Remova todas as fontes de ignição. Impeça faíscas ou chamas. Não fume.

Prevenção da inalação e do contato com a pele, mucosas e olhos:

Não toque nos recipientes danificados ou no material derramado sem o uso de vestimentas adequadas. Evite inalação, contato com os olhos e com a pele. Utilize equipamento de proteção individual conforme descrito na Seção 8.

Precauções ao meio ambiente:

Evite que o produto derramado atinja cursos d'água e rede de esgotos. Utilize spray d'água para reduzir a concentração de fumos no ar. Utilize sistema de ar forçado para manter as concentrações de gás abaixo da explosiva.

Métodos para limpeza:

Procedimentos a serem adotados:

Colete o produto derramado e coloque em recipientes próprios. Adsorva o produto remanescente, com areia seca, terra, vermiculite, ou qualquer outro material inerte. Coloque o material adsorvido em recipientes apropriados e remova-os para local seguro.

Prevenção de perigos secundários:

Não descarte diretamente no meio ambiente ou na rede de esgoto. A água de diluição proveniente do combate ao fogo pode causar poluição.

7 - MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

MEDIDAS TÉCNICAS APROPRIADAS PARA O MANUSEIO

Prevenção da exposição do

Evite inalação e o contato com a pele, olhos e roupas. Evite respirar



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 5 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

trabalhador:	vapores/névoas do produto. Utilize equipamento de proteção individual ao manusear o produto, descritos na Seção 8.
Precauções e orientações para manuseio seguro:	Manuseie o produto somente em locais bem arejados ou com sistemas de ventilação geral/local adequado. Evite formação de vapores ou névoas.
Medidas de higiene:	Não coma, beba ou fume durante o manuseio do produto. Lave bem as mãos antes de comer, beber, fumar ou ir ao banheiro. Roupas contaminadas devem ser trocadas e lavadas antes de sua reutilização.
MEDIDAS TÉCNICAS APROPRIADAS PARA O ARMAZENAMENTO	
Apropriadas:	Mantenha o produto em local fresco, seco e bem ventilado, distante de fontes de calor e ignição. O local de armazenamento deve conter bacia de contenção para reter o produto, em caso de vazamento. Mantenha os recipientes bem fechados e devidamente identificados. O local de armazenamento deve ter piso impermeável, não oxidante e com dique de contenção para reter em caso de vazamento.
Inapropriadas:	Temperaturas elevadas. Fontes de ignição. Contato com materiais incompatíveis.
Materiais seguros para embalagens:	
Recomendadas:	Não especificado.

8 - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Parâmetros de controle específicos

Limites de exposição ocupacional:

Ingredientes	TLV – TWA (ACGIH)	TLV – STEL (ACGIH)
Óleo diesel.	100 mg/m ³	-

Medidas de controle de engenharia: Promova ventilação combinada com exaustão local, especialmente quando ocorrer formação de vapores/névoas do produto. É recomendado tomar disponíveis chuveiros de emergência e lava olhos na área de trabalho.

Equipamento de proteção individual apropriado

Proteção respiratória: Recomenda-se a utilização de respirador com filtro para vapores orgânicos para exposições médias acima da metade do TLV-TWA. Nos casos em que a exposição exceda 3 vezes o valor TLV-TWA, utilize respirador do tipo autônomo (SCBA) com suprimento de ar, de peça facial inteira, operado em modo de pressão positiva. Siga orientação do Programa de Prevenção Respiratória (PPR), 3ª ed, São Paulo: Fundacentro, 2002.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 6 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

Proteção das mãos:	Luvas de proteção de PVC.
Proteção dos olhos:	Óculos de proteção com proteção lateral.
Proteção da pele e corpo:	Vestimenta protetora adequada.
Precauções especiais:	Evite usar lentes de contato enquanto manuseia este produto.

9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Aspecto:	Líquido límpido (isento de materiais em suspensão).
Odor:	Característico.
pH:	Não aplicável.
Ponto de fusão/ponto de congelamento:	Não disponível.
Ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição:	Não disponível.
Ponto de fulgor:	38 °C Min.; Método NBR 7974
Taxa de evaporação:	Não disponível.
Inflamabilidade:	Produto inflamável.
Limite inferior/superior de inflamabilidade ou explosividade:	Não disponível.
Pressão de vapor:	Não disponível.
Densidade de vapor:	Não disponível.
Densidade:	0,82 – 0,85 @ 20 °C; Método NBR-7148.
Solubilidade:	Na água: [insolúvel], Em solventes orgânicos: Solúvel.
Coefficiente de partição – n-octano/água:	Log kow: 7,22 (dado estimado).
Temperatura de auto-ignição:	Não disponível.
Temperatura de decomposição:	400°C.
Viscosidade:	2,5 – 5,0 cSt a 40°C; Método D445/NBR-10441.
Outras informações:	Faixa de destilação: 100 – 400 °C a 101,325 kPa (760 mmHg); Método NBR-9619



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50** Página 7 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108 Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

10 - ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estabilidade química:	Estável sob condições usuais de manuseio e armazenamento. Não sofre polimerização.
Materiais/substâncias incompatíveis:	Agentes oxidantes.
Produtos perigosos da decomposição:	Hidrocarbonetos leves e pesados e coque.

11 - INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Toxicidade aguda:	Como depressor do sistema nervoso central, pode causar efeitos narcóticos como dor de cabeça e tontura. Pode causar confusão mental e perda de consciência em altas concentrações. O produto pode causar irritação das vias aéreas superiores se inalado causando tosse, dor de garganta e falta de ar. Causa irritação a pele com vermelhidão e dor no local atingido. Pode causar irritação ocular com vermelhidão, dor e lacrimejamento. Pode ser fatal se aspirado, causando pneumonia química. Pode causar a morte se ingerido ou inalado. Este produto contém gás sulfídrico, extremamente tóxico. DL50(oral, ratos): > 5000 mg/kg DL50 (dérmica, coelhos): > 3000 mg/kg
Toxicidade crônica:	Pode causar dermatite após contato repetido e prolongado com a pele.
Efeitos específicos:	Carcinogenicidade: Suspeito carcinógeno humano (GHS e Regulamento (CE) N° 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho).

12 - INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Efeitos ambientais, comportamentos e impactos do produto

Ecotoxicidade:	Em caso de grandes derramamentos o produto pode ser perigoso para o meio ambiente devido à possível formação de uma película do produto na superfície da água diminuindo os níveis de oxigênio dissolvido.
Persistência e degradabilidade:	É esperada baixa degradação e alta persistência.
Potencial bioacumulativo:	É esperado potencial de bioacumulação em organismos aquáticos. Log Kow: 7,22 (dado estimado).

13 - CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Métodos recomendados para tratamento e disposição aplicados ao:

Produto:	Evite a exposição ocupacional ou a contaminação ambiental. Recicle qualquer parcela não utilizada do material para seu uso aprovado ou retorná-lo ao fabricante ou ao fornecedor. Outros métodos consultar
-----------------	--



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50** Página 8 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108 Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

legislação federal e estadual: Resolução CONAMA 005/1993, NBR 10.004/2004.

Restos de produtos:	Manter restos do produto em suas embalagens originais, fechadas e dentro de tambores metálicos, devidamente fechados, de acordo com a legislação aplicável. O descarte deve ser realizado conforme o estabelecido para o produto, recomendando-se as rotas de processamento em cimenteiras e a incineração.
Embalagem usada:	Nunca reutilize embalagens vazias, pois elas podem conter restos do produto e devem ser mantidas fechadas e encaminhadas para serem destruídas em local apropriado. Neste caso, recomenda-se envio para rotas de recuperação dos tambores ou incineração.

14 - INFORMAÇÕES SOBRE O TRANSPORTE

Regulamentações nacionais e internacionais

Terrestre:	Decreto nº. 96.044, de 18 de maio de 1988: Aprova o Regulamento para o Transporte Rodoviário de Produtos Perigosos e dá outras providências. Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT): Resoluções N°s. 420/04, 701/04, 1644/06, 2657/08, 2975/08 e 3383/10.
Hidroviário:	DPC - Diretoria de Portos e Costas (Transporte em águas brasileiras) Normas de Autoridade Marítima (NORMAM) NORMAM 01/DPC: Embarcações Empregadas na Navegação em Mar Aberto NORMAM 02/DPC: Embarcações Empregadas na Navegação Interior IMO - "International Maritime Organization" (Organização Marítima Internacional) International Maritime Dangerous Goods Code (IMDG Code) - Incorporating Amendment 34-08; 2008 Edition.
Aérea:	DAC - Departamento de Aviação Civil: IAC 153-1001. Instrução de Aviação Civil - Normas para o transporte de artigos perigosos em aeronaves civis. IATA - "International Air Transport Association" (Associação Nacional de Transporte Aéreo) Dangerous Goods Regulation (DGR) - 51 st Edition, 2010.
N° ONU:	1202
Nome apropriado para o embarque:	ÓLEO DIESEL
Classe de risco:	3
Número de risco:	30



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 9 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

Grupo de embalagem: III

15 - REGULAMENTAÇÕES

Regulamentações:

Decreto Federal nº 2.657, de 3 de julho de 1998

Norma ABNT-NBR 14725-4:2009

Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos),

Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro de 2010,

Produto sujeito a controle e fiscalização do Ministério da Justiça – Departamento de Polícia Federal – MJ/DPF, quando se tratar de importação, exportação e reexportação, sendo indispensável Autorização Prévia de DPF para realização destas operações,

16 - OUTRAS INFORMAÇÕES

Esta FISPQ foi elaborada baseada nos conhecimentos atuais do produto químico e fornece informações quanto à proteção, à segurança, à saúde e ao meio ambiente,

Adverte-se que o manuseio de qualquer substância química requer o conhecimento prévio de seus perigos pelo usuário. Cabe à empresa usuária do produto promover o treinamento de seus empregados e contratados quanto aos possíveis riscos advindos do produto,

Siglas:

ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists

CAS – Chemical Abstracts Service

DL₅₀ – Dose letal 50%

IARC – International Agency for Research on Cancer

STEL – Short Term Exposure Limit

TLV – Threshold Limit Value

TWA – Time Weighted Average

NA – Não Aplicável

Bibliografia:

[ACGIH] AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. Disponível em: <http://www.acgih.org/TLV/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[ECB] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU, Diretiva 67/548/EEC (substâncias) e Diretiva 1999/45/EC (preparações). Disponível em: <http://ecb.jrc.it/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[EPI-USEPA] ESTIMATION PROGRAMS INTERFACE Suite - United States Environmental Protection Agency. Software.



Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

PRODUTO: **ÓLEO DIESEL S 50**

Página 10 de 10

Data: 03/01/2011 N° FISPQ: BR0108

Versão: 0,1P Anula e substitui versão: Todas as anteriores

[HSDB] HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em: dezembro de 2010.

[IARC] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Acesso em: dezembro de 2010.

[IPCS] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – INCHEM. Disponível em: <http://www.inchem.org/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[PIECA] INTERNATIONAL PETROLEUM INDUSTRY ENVIRONMENTAL CONSERVATION ASSOCIATION. Guidance on the application of Globally Harmonized System (GHS) criteria to petroleum substances, Version 1, June 17th, 2010. Disponível em: http://www.pieca.org/system/files/publications/ghs_guidance_17_june_2010.pdf. Acesso em: dezembro de 2010.

[NIOSH] NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL AND SAFETY. International Chemical Safety Cards. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/>. Acesso em: dezembro de 2010.

[NITE-GHS JAPAN] NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND EVALUATION. Disponível em: http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html. Acesso em: dezembro de 2010.

[PETROLEUM HPV] PETROLEUM HIGH PRODUCTION VOLUME. Disponível em: <http://www.petroleumhpv.org/pages/petroleumsubstances.html>. Acesso em: dezembro, 2010

[REACH] REGISTRATION, EVALUATION, AUTHORIZATION AND RESTRICTION OF CHEMICALS, Commission Regulation (EC) No 1272/2008 of 16 December 2008 amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals.

[SIRETOX/INTERTOX] SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE RISCOS DE EXPOSIÇÃO QUÍMICA. Disponível em: <http://www.intertox.com.br>. Acesso em: dezembro de 2010.

[TOXNET] TOXICOLOGY DATA NETWORKING. ChemIDplus Lite. Disponível em: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/>. Acesso em: dezembro de 2010.