



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Faculdade de Engenharia

Arthur Fernandes Gonçalves

Aplicação de *biochar* de eucalipto e peróxido de cálcio (CaO_2)
no tratamento de solo contaminado por diesel

Rio de Janeiro

2024

Arthur Fernandes Gonçalves

Aplicação de *biochar* de eucalipto e peróxido de cálcio (CaO_2) no tratamento
de solo contaminado por diesel



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Profa. Dra. Elisabeth Ritter

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

G635 Gonçalves, Arthur Fernandes.
Aplicação de biochar de eucalipto e peróxido de cálcio (CaO₂) no
tratamento de solo contaminado por diesel / Arthur Fernandes
Gonçalves. – 2024.
98 f.

Orientadora: Elisabeth Ritter.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Solos - Poluição por óleo -
Teses. 3. Diesel - Teses. 4. Toxicologia ambiental - Teses. 5.
Biomassa vegetal - Teses. I. Ritter, Elisabeth. II. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 628.5:332.368

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

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

Assinatura

30/04/2024

Data

Arthur Fernandes Gonçalves

Aplicação de *biochar* de eucalipto e peróxido de cálcio (CaO_2) no tratamento de solo contaminado por diesel

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:

Elisabeth Ritter.

Profa. Dra. Elisabeth Ritter (Orientador)
Faculdade de Engenharia – UERJ

Juacyra Carbonelli Campos

Profa. Dra. Juacyra Carbonelli Campos
Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Everton Grippa

Prof. Dr. Everton Grippa
Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Daniele Maria Bila.

Profa. Dra. Daniele Bila
Faculdade de Engenharia – UERJ

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Andrea e Edmilson, pela dedicação, apoio e paciência ao longo deste período. Aos meus irmãos, Lucas, Rodrigo e Maju, meus amigos de uma vida inteira.

Um agradecimento especial à minha amada Stella, minha parceira e companheira. Este trabalho, assim como tudo o mais, não teria sido possível sem seu zelo, carinho e apoio incondicional.

Quero prestar uma homenagem à minha bisavó Jandira (*in memoriam*) e aos meus avós, Antônio, Filomena, Helena (*in memoriam*) e Erni (*in memoriam*).

Meus agradecimentos se estendem aos tios, tias e primos.

À Prof. Dra. Elisabeth Ritter, minha orientadora, expressei minha gratidão pelo apoio constante, confiança e compreensão ao longo deste trabalho. Seu auxílio e orientação foram fundamentais.

À Prof. Dra. Daniele Bila, agradeço pela colaboração na realização dos ensaios no Laboratório de Engenharia Sanitária, a disponibilidade de contribuir e pela compreensão em face dos contratemplos.

Um agradecimento ao Prof. Wenceslau Teixeira pela disponibilização do biocarvão e pela parceria.

Quero expressar minha gratidão aos amigos e colegas do LES.

Agradeço à Caroline Mitai, pela parceria na execução do trabalho, e ao Clayton Hashimoto, pela amizade e parceria fundamental para a finalização desse trabalho.

À Thaynara Rabelo, agradeço pela ajuda durante toda a minha jornada acadêmica.

Aos alunos de Iniciação Científica do LES, meu agradecimento pela colaboração em vários momentos. Especialmente aos alunos Pedro Gonçalves e Luis Gustavo. Também estendo meu agradecimento a outros alunos que contribuíram para o laboratório neste período: Giuliana, Rafaela, Julia, Karen, Mari, Mateus, Laís, Giovana, Lucas e Kaillany.

Ao Prof. Dr. Everaldo Zonta, agradeço pelas análises realizadas e pela orientação valiosa sobre os resultados.

Aos técnicos Raí e Galdino do LMS da UERJ, meu agradecimento pela colaboração na coleta de amostras e análises realizadas no laboratório.

À Profa. Dra. Lia Teixeira e à Giselle Gomes, agradeço pela orientação nas análises microbiológicas deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Engenharia Sanitária, Dani e Sidnei, agradeço pela ajuda em vários momentos desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando de Oliveira, do Instituto de Física Armando Dias Tavares da UERJ, agradeço pela disponibilização deste modelo de dissertação e por estar sempre disposto a esclarecer dúvidas sobre sua utilização.

Aos professores do Peamb e do Desma, que contribuíram significativamente para a minha formação acadêmica.

Aos colegas do Cenpes, agradeço pela colaboração na execução deste trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão aos trabalhadores da UERJ, que ajudam a tornar nossa Universidade acolhedora.

“Coro, enrubesço, estremeço conforme descrevo a abominável atrocidade!”

Edgar Allan Poe

RESUMO

GONÇALVES, A. F. **Aplicação de *biochar* de eucalipto e peróxido de cálcio (CaO₂) no tratamento de solo contaminado por diesel.** 2024. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Num contexto em que os combustíveis fósseis continuam a desempenhar um papel crucial no desenvolvimento humano, o diesel é um importante componente energético utilizado no Brasil. No entanto, vazamentos que podem ocorrer durante seu transporte e armazenamento representam uma ameaça à qualidade ambiental do solo. Nesse cenário, o *biochar*, conhecido por seus benefícios na melhoria das condições do solo, e os compostos liberadores de oxigênio, utilizados como fonte prolongada de oxigênio, emergem como possíveis agentes para a degradação de hidrocarbonetos em solos contaminados por diesel. Este estudo teve como propósito avaliar a eficácia de um tratamento utilizando *biochar* de biomassa de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e peróxido de cálcio (CaO₂) em solo de bacias de contenção contaminado por diesel. Foram preparados biorreatores de bancada, incluindo os seguintes tratamentos: *biochar* de eucalipto a 5% (BC), peróxido de cálcio a 1% (Pe) e a combinação de ambos (BP). Ao longo do ensaio, a quantificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias degradadoras de diesel (BDD) foi realizada através do método de espalhamento em placas de Petri. Coletas periódicas foram conduzidas para analisar o sobrenadante, considerando parâmetros como pH, condutividade, salinidade, DQO e dureza. Ao fim do ensaio, foram quantificados os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) remanescentes no solo por cromatografia gasosa. A toxicidade do elutriado do solo após o tratamento, bem como a de *biochar* e CaO₂, foi avaliada utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*), a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e o microcrustáceo *Artemia sp.* Destacou-se uma maior degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo no tratamento BP, quando comparado com o controle ($42 \pm 7\%$ e $28 \pm 10\%$, respectivamente). Entretanto, o CaO₂ revelou-se tóxico para a comunidade microbiana, enquanto o *biochar* estimulou seu desenvolvimento, apresentando $3,6 \pm 0,1 \times 10^6$ UFC de BHT/g de solo, enquanto o controle obteve $1,3 \pm 0,7 \times 10^4$ UFC de BHT/g de solo. A toxicidade dos elutriados do solo após o tratamento BP foi reduzida. Ademais, os aditivos do solo não apresentaram toxicidade para a alface (menor índice de germinação encontrado de 86,16% para o CaO₂), mas o peróxido, como era esperado, manifestou toxicidade para a bactéria luminescente *V. fischeri*, resultando em um CE50 de 0,23%. O tratamento com *biochar* de eucalipto e CaO₂ apresentou potencial para a degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo. Contudo, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes e considerar sua aplicabilidade em escala prática no campo.

Palavras-chave: composto liberador de oxigênio. biorreator. hidrocarbonetos totais de petróleo. ecotoxicologia.

ABSTRACT

GONÇALVES, A. F. **Application of eucalyptus biochar and calcium peroxide (CaO₂) in the treatment of soil contaminated by diesel.** 2024. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

In a context where fossil fuels continue to play a crucial role in human development, diesel is a significant energy component used in Brazil. However, leaks that may occur during its transportation and storage pose a threat to the environmental quality of the soil. In this scenario, biochar, known for its soil improvement benefits, and oxygen-releasing compounds, used as a prolonged source of oxygen, emerge as potential agents for the degradation of hydrocarbons in soils contaminated by diesel. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of a treatment using biochar from eucalyptus biomass (*Eucalyptus sp.*) and calcium peroxide (CaO₂) in soil from compacted barriers contaminated by diesel. Bench-scale bioreactors were prepared, including the following treatments: eucalyptus biochar at 5% (BC), calcium peroxide at 1% (Pe), and a combination of both (BP). Throughout the assay, the quantification of total heterotrophic bacteria (THB) and diesel-degrading bacteria (DDB) was performed using the spread plate method. Periodic samplings were conducted to analyze the supernatant, considering parameters such as pH, conductivity, salinity, chemical oxygen demand (COD), and hardness. At the end of the assay, the remaining total petroleum hydrocarbons (TPH) in the soil were quantified by gas chromatography. The soil toxicity after treatment, as well as that of biochar and CaO₂, was assessed using lettuce seeds (*Lactuca sativa*), the bacteria *Vibrio fischeri*, and the microcrustacean *Artemia sp.*. There was a greater degradation of total petroleum hydrocarbons in the BP treatment compared to the control ($42 \pm 7\%$ and $28 \pm 10\%$, respectively). However, CaO₂ proved to be toxic to the microbial community, while biochar stimulated its development, with $3.6 \pm 0.1 \times 10^6$ CFU of THB/g of soil, whereas the control obtained $1.3 \pm 0.7 \times 10^4$ CFU of THB/g of soil. The toxicity of soil elutriates after the BP treatment was reduced. Furthermore, soil additives showed no toxicity to lettuce (the lowest germination index found was 86.16% for CaO₂), but calcium peroxide showed toxicity to the luminescent bacterium *V. fischeri*, resulting in a EC₅₀ of 0.23%. The treatment with eucalyptus biochar and CaO₂ showed potential for the degradation of total petroleum hydrocarbons. However, additional studies are needed to elucidate the underlying mechanisms and consider their applicability in the field.

Keywords: oxygen-releasing compound. bioreactor. total petroleum hydrocarbons. ecotoxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Coleta e manejo da amostra de solo de bacia de contenção de tanque de armazenamento de hidrocarbonetos de petróleo.	30
Figura 2	- Fluxograma com resumo das etapas realizadas para o ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em solo contaminado por diesel	34
Figura 3	- Condições em que o solo foi mantido pós contaminação.	35
Figura 4	- Reatores de bancada.	37
Figura 5	- Esquema do processo de quantificação de bactérias heterotróficas totais.	41
Figura 6	- Esquema do processo de quantificação de bactérias degradadoras de diesel	42
Figura 7	- Brotos plantados sobre solo de bacia de contenção medidos após ensaio de germinação.	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espectro de FTIR do solo utilizado.	50
Gráfico 2 - Espectro de FTIR do <i>biochar</i> de eucalipto.	52
Gráfico 3 - Espectro de FTIR do CaO ₂	52
Gráfico 4 - pH do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.	53
Gráfico 5 - Condutividade elétrica do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.	54
Gráfico 6 - DQO do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.	55
Gráfico 7 - Salinidade do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.	57
Gráfico 8 - Dureza do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.	58
Gráfico 9 - Remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo.	59
Gráfico 10 - Bactérias heterotróficas totais nos biorreatores.	61
Gráfico 11 - Bactérias degradadoras de diesel nos biorreatores	63
Gráfico 12 - Germinação das sementes de alface.	66
Gráfico 13 - Germinação relativa das sementes de alface.	66
Gráfico 14 - Crescimento radicular relativo das sementes de alface.	68
Gráfico 15 - Índice parte aérea/raiz para os aditivos do solo.	69
Gráfico 16 - Índice de germinação das sementes de alface.	70
Gráfico 17 - Boxplot das raízes dos brotos.	71
Gráfico 18 - Boxplot da parte aérea dos brotos.	72
Gráfico 19 - Inibição de luminescência do elutriato das amostras pós-tratamento.	73
Gráfico 20 - CE50 dos elutriatos dos aditivos do solo.	74
Gráfico 21 - Mortalidade das artêmias após contato com elutriato do solo inicial e pós-tratamento.	76
Gráfico 22 - pH nos elutriatos do solo durante teste com <i>Artemia sp.</i>	77
Gráfico 23 - PCA aplicado às variáveis físico-químicas ao longo dos 28 dias (1d, 14d, 28d) - Mapa de cargas fatoriais.	78
Gráfico 24 - PCA aplicado às variáveis físico-químicas ao longo dos 28 dias (1d, 14d, 28d) - Mapa de cargas fatoriais.	79
Gráfico 25 - PCA aplicado às variáveis físico-químicas, respostas ecotoxicológicas e concentração de HTP no 28º dia - Mapa de pontuação.	80
Gráfico 26 - PCA aplicado às variáveis físico-químicas, respostas ecotoxicológicas e concentração de HTP no 28º dia - Mapa de cargas fatoriais.	81
Gráfico 27 - Correlação entre os parâmetros físico-químicos (28d), remoção de HTPs e efeitos ecotoxicológicos.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Metais no <i>biochar</i>	33
Tabela 2	- Parâmetros geotécnicos do solo	48
Tabela 3	- Características físico-químicas da suspensão do solo coletado em bacia de contenção	49
Tabela 4	- Resultados da análise de fertilidade do solo.	49
Tabela 5	- Parâmetros e métodos para análise de metais no solo.	50
Tabela 6	- Características físico-químicas do <i>biochar</i> de biomassa de eucalipto . .	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros físico-químicos da suspensão de solo limpo.	31
Quadro 2 - Parâmetros e métodos para análise de fertilidade do solo.	31
Quadro 3 - Parâmetros e métodos para análise de metais no solo.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Área contaminada
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BC	<i>Biochar</i>
BDD	Bactérias degradadoras de diesel
BHT	Bactérias heterotróficas totais
BP	<i>Biochar</i> + peróxido de cálcio
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
C	Controle
CA	Controle abiótico
CE	Condutividade Elétrica
CENPES	Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CG	Comatografia Gasosa
CLO	Compostos Liberadores de Oxigênio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
COV	Compostos Orgânicos Voláteis
CRR	Crescimento radicular relativo
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
CE50	Concentração de Efeito
EEA	<i>European Environment Agency</i>
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GRS	Germinação relativa de sementes
GS	Germinação das sementes
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HTPs	Hidrocarbonetos totais de petróleo
IBI	International Biochar Initiative
IG	Índice de germinação
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IPAR	Índice parte aérea/raiz

LES	Laboratório de Engenharia Sanitária
LMS	Laboratório de Mecânica dos Solos
MM	Meio mineral mínimo
NBR	Norma Brasileira
NC	Número de Cetano
NOP	Norma Operacional Padrão
ORC	<i>Oxygen releasing compound</i>
Pe	Peróxido de cálcio
PCA	Análise de componentes principais
SC	Areia argilosa
SUCS	Sistema Unificado de Classificação de Solos
SL	Solo Limpo
TSA	Meio agar triptona de de soja
UFC	Unidades formadoras de colônia
USEPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	18
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Indústria do Petróleo	19
2.1.1	<u>Óleo diesel</u>	19
2.1.2	<u>Contaminação do solo por diesel</u>	20
2.2	Áreas contaminadas	22
2.3	Biorremediação	23
2.4	Biochar	24
2.5	Compostos liberadores de oxigênio	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Coleta e caracterização do solo	29
3.2	Peróxido de cálcio	32
3.3	Produção e caracterização do <i>biochar</i>	32
3.4	Ensaio de biodegradação	34
3.4.1	<u>Preparo dos biorreatores de bancada</u>	34
3.4.2	<u>Análises físico-químicas</u>	38
3.4.2.1	pH	38
3.4.2.2	Condutividade	38
3.4.2.3	Salinidade	38
3.4.2.4	Demanda Química de Oxigênio (DQO)	38
3.4.2.5	Dureza	38
3.4.3	<u>Determinação de hidrocarbonetos de petróleo no solo</u>	39
3.4.4	<u>Análises microbiológicas</u>	40
3.4.4.1	Bactérias heterotróficas totais	40
3.4.4.2	Bactérias degradadoras de diesel	41
3.5	Ensaio ecotoxicológicos	43
3.5.1	<u><i>Lactuca sativa</i></u>	43
3.5.2	<u><i>Vibrio fischeri</i></u>	44
3.5.3	<u><i>Artemia sp.</i></u>	46
3.6	Análises estatísticas	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Caracterização do solo	48
4.2	Caracterização do <i>biochar</i>	51

4.3	Caracterização do peróxido de cálcio	52
4.4	Ensaio de biodegradação	53
4.4.1	<u>Análises físico-químicas</u>	53
4.4.2	<u>Análises microbiológicas</u>	61
4.4.2.1	Bactérias heterotróficas totais	61
4.4.2.2	Bactérias degradadoras de diesel	63
4.5	Ensaio ecotoxicológicos	65
4.5.1	<u>Lactuca sativa</u>	65
4.5.2	<u>Vibrio fischeri</u>	72
4.5.3	<u>Artemia sp.</u>	75
4.6	Análise de componentes principais e correlação	77
	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	84

INTRODUÇÃO

O diesel é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos saturados e insaturados que alteram as propriedades físico-químicas do solo, gerando efeitos deletérios aos ecossistemas (GUIRADO et al., 2021; KADRI et al., 2021). A contaminação por hidrocarbonetos de petróleo é causada por derramamentos na zona de exploração, em cargueiros, tanques e dutos (ORTEGA et al., 2019).

Após o derramamento de hidrocarbonetos de petróleo em solo, a degradação de óleo cru tem como principal via a mineralização dos compostos formadores do petróleo por microrganismos (QIN; GONG; FAN, 2013). Portanto, intensificar este processo pode ser uma estratégia para a remediação do solo e de águas subterrâneas.

A biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos é um conjunto de técnicas que visa aprimorar ou se beneficiar da habilidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos (ORTEGA et al., 2019). Todavia, a eficiência do tratamento está diretamente ligada a diferentes fatores ambientais como pH, oxigênio, temperatura e disponibilidade de nutrientes (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

No Brasil, há 7,53 milhões de hectares de área plantada de eucalipto. Considerando a produtividade do ano de 2021 de 38,9 m³/ha/ano, resultaria numa produção anual de 292,9 milhões de m³/ano (IBÁ, 2022). Desta produção, é possível que em torno de 8% se torne resíduo (PINCELLI; MOURA; BRITO, 2017). Neste contexto, desenvolver uma alternativa para o uso desse resíduo, que envolva ainda o uso do potencial energético desse material, seria importante.

O *biochar* é formado a partir da pirólise de biomassa e é conhecido por sua capacidade de aprimorar as características do solo como a disponibilidade de nutrientes, a produção agrícola e a atividade microbiana. Além disso, é um material eficiente na adsorção de contaminantes, como hidrocarbonetos de petróleo (JIANG et al., 2016). A aplicação de *biochar* auxilia na mitigação das mudanças climáticas (estoque de carbono), controle de resíduos, produção de energia e melhora das condições do solo com benefícios sociais e/ou econômicos (LEHMANN; JOSEPH, 2015).

Os compostos liberadores de oxigênio (CLOs, do inglês, oxygen releasing-compounds) são substâncias estáveis que, quando dissolvidas em água, liberam O₂ no meio. CLOs manufaturados são aplicados no campo desde os anos 90 para o tratamento de BTEX em águas subterrâneas (ODENCRANTZ; JOHNSON; KOENIGSBERG, 1996). Um dos mais utilizados é peróxido de cálcio (CaO₂), conhecido por sua estabilidade e fácil manuseio, já foi empregado na degradação de substâncias orgânicas (MENENDEZ-VEGA et al., 2007; KUNUKCU, 2007).

Alguns poucos autores buscaram desenvolver metodologia capaz de degradar contaminantes orgânicos com CLOs e o biocarvão (LI et al., 2019; HUNG et al., 2022; SHEN

et al., 2023). No entanto, não foram encontrados trabalhos que associam *biochar* com CLOs para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo.

Desta forma, no presente trabalho, buscou-se desenvolver metodologia de coaplicação de *biochar* e peróxido de cálcio, visando o tratamento de solos contaminados por diesel de bacias de contenção de armazenamento.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

- Propor técnica para o tratamento de solos contaminados por diesel, aplicando conjuntamente *biochar* produzido a partir de biomassa de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e peróxido de cálcio

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de remoção de HTPs pelo tratamento por com *biochar* e peróxido de cálcio a partir de ensaios de biorreatores de bancada
- Avaliar a ecotoxicidade do elutriado do solo após tratamento proposto pelos ensaios toxicológicos utilizando os organismos teste bactéria luminescente *Vibrio fischeri* e microcrustáceo (*Artemia sp.*).
- Avaliar a possível toxicidade dos materiais aplicados no tratamento pelos ensaios toxicológicos utilizando os organismos teste alface *Lactuca sativa* e bactéria luminescente *Vibrio fischeri*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Indústria do Petróleo

O petróleo é originado pela decomposição da matéria orgânica presente no xisto da crosta terrestre, migrando para os espaços saturados entre os grãos de solo das rochas sedimentares até ficar confinado por barreiras físicas resultantes dos movimentos das placas tectônicas (GRACE, 2007). A principal fonte de matéria orgânica para a formação do petróleo é derivada de plâncton e algas que foram depositados juntamente com sedimentos, criando um ambiente protegido contra a ação de microrganismos de decomposição (CONAWAY, 1999).

Inicialmente, o petróleo foi considerado um subproduto indesejado durante as operações de extração de sal. No entanto, desde o século XIX, já se utilizava esse óleo na produção caseira de querosene para iluminação na Europa oriental, atingindo uma produção de 36.000 barris de petróleo em 1859 (YERGIN, 2009). A indústria de exploração de petróleo experimentou um significativo avanço ao adotar a técnica de extração por fluxo no nordeste dos Estados Unidos, resultando em um aumento na produção de 50 barris por dia para 3.000 barris por dia (CONAWAY, 1999).

A produção global de petróleo atingiu cerca de 89,9 milhões de barris por dia em 2021, com reservas provadas totalizando 1.732,4 bilhões de barris em 2020 (ANP, 2022). No Brasil, a produção de petróleo foi de 1.060.369 mil barris em 2021. Apesar do crescimento no desenvolvimento e adoção de fontes de energia renováveis, a produção de petróleo bruto tende a expandir-se até 2050 (EIA, 2021).

2.1.1 Óleo diesel

O óleo diesel é um combustível líquido obtido a partir do petróleo, composto principalmente por hidrocarbonetos com cadeias de carbono variando de 8 a 16 (PETROBRÁS, 2021). A composição típica dos hidrocarbonetos no diesel (em volume) consiste em 64% de hidrocarbonetos alifáticos, 1–2% de alcenos e 35% de hidrocarbonetos aromáticos (KUPPUSAMY et al., 2020).

O óleo diesel pode conter outros elementos como nitrogênio, enxofre e oxigênio. A terminologia "diesel" é genérica e se refere a qualquer combustível destinado ao uso em motores de ignição por compressão (CHEVRON, 2007). Existem vários tipos de diesel na indústria, classificados conforme a norma ASTM D975-21, que define metodologias para a determinação de parâmetros como temperatura de destilação, viscosidade e ponto de ignição.

O diesel é essencial para motores de ciclo diesel e amplamente utilizado em transporte de passageiros, geradores, termelétricas, locomotivas e maquinário agrícola, de mineração e construção civil (PETROBRÁS, 2024). É formulado através da mistura de correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diferentes etapas de processamento do petróleo bruto.

Os óleos diesel podem ser classificados como A ou B. O diesel A é obtido por meio do refino do petróleo, enquanto o diesel B resulta da mistura do diesel A com biodiesel, segundo a legislação vigente (PETROBRÁS, 2021).

A qualidade do óleo diesel pode ser caracterizada pelo Número de Cetano (NC), que representa a proporção volumétrica entre cetano ($C_{16}H_{34}$), com alto poder de ignição (CN = 100), e 1-metilnaftaleno ($C_{11}H_{10}$), com baixa capacidade de ignição (CN = 0) (FAHIM; AL-SAHAF; ELKILANI, 2009). Os teores mínimos de NC para uso rodoviário são 42 e 48 para os óleos diesel S-10 e S-500, respectivamente (PETROBRÁS, 2021).

O diesel S-500 é destinado à tecnologia de combustão de veículos leves fabricados antes de 2012 e possui um maior teor de enxofre. Já o diesel S-10, com menor teor de enxofre, é mais eficiente energeticamente e é utilizado em veículos com as mais recentes tecnologias de combustão (PETROBRÁS, 2024).

2.1.2 Contaminação do solo por diesel

Somando os dados de acidentes fornecidos pela ANP, desde o ano de 2013 até dezembro de 2023, já foram registrados 106 incidentes envolvendo derramamento de óleo diesel no Brasil, sendo 7 desses classificados com potencial risco ao meio ambiente. Como consequência, aproximadamente 2,5 milhões de litros de óleo foram derramados nos diferentes processos de produção, transporte e armazenamento do diesel (ANP, 2023). A Agência Europeia do Ambiente (EEA, na sigla em inglês), em um estudo conduzido em 2006, identificou que o óleo mineral é o contaminante predominante em 34% das áreas contaminadas na Europa. Esse número aumenta para 53% quando são considerados HPAs e BTEX. (FAO; UNEP, 2021).

No Rio de Janeiro, foi observado um aumento significativo de locais impactados por contaminantes derivados do petróleo entre 2013 e 2015. De acordo com um estudo realizado por Arêas et al. (2020), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tiveram um aumento de 95%, os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) aumentaram em 116%, os compostos orgânicos voláteis (COVs) apresentaram um aumento de 142%, e os níveis de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) subiram em 67%.

Esses contaminantes estão diretamente associados à presença ou indicam potenciais contaminações por derivados de petróleo, como o óleo diesel. Além dos prejuízos financeiros inerentes, esses derramamentos também representam uma ameaça ao meio

ambiente.

A contaminação do solo por diesel tem efeitos tóxicos sobre as plantas (ADAM; DUNCAN, 2002; GONÇALVES et al., 2023; BAMGBOSE; ANDERSON, 2015). A fitotoxicidade dos derivados de petróleo está intimamente ligada à sua gravidade específica (ADAM; DUNCAN, 2002). Portanto, frações mais pesadas, como o óleo diesel, podem afetar de forma mais intensa diversos aspectos do ciclo de vida vegetal.

O estudo realizado por Gonçalves et al. (2023) constatou que solos provenientes de bacias de contenção de tanques de armazenamento de diesel, previamente contaminados, resultaram em um retardo na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Da mesma forma, Bamgbose e Anderson (2015) investigaram a toxicidade do diesel em solo franco-arenoso e franco-siltoso para diversas culturas, incluindo alfafa, alface, rabanete e trigo. Observou-se um efeito mais acentuado no solo franco-siltoso. No caso da alface e do trigo, foram encontrados efeitos significativamente diferentes em relação ao controle ($p < 0,05$) em concentrações de diesel a partir de 0,085% e 0,2125% (m/m), respectivamente. Portanto, o impacto do diesel no desenvolvimento das sementes está relacionado à espécie de planta e ao tipo de solo avaliado.

Eze, George e Hose (2021), ao analisar a relação dose-resposta do solo contaminado por diesel em 12 espécies de legume e 3 três espécies de grama em solo arenoso, obtiveram resultado correlato com as CE10 variando de 360 ± 180 mg/kg a 15.330 ± 1.470 mg/kg para *Trifolium incarnatum* e alfafa (*Medicago sativa*), respectivamente.

A contaminação do solo por diesel também afeta o desenvolvimento e a sobrevivência de minhocas *Eisenia fetida* (HAWROT-PAW et al., 2020; COTTA; LEMOS; LIMA, 2020; BAMGBOSE; ANDERSON, 2020) e *Eisenia andrei* (KHUDUR et al., 2015). No entanto, em estudo realizado por Fernández et al. (2011), utilizando ensaios de microcosmo com minhocas (*E. fetida*) e vegetação (*Festuca arundinacea* e *Trifolium pratense*), observou-se que a contaminação por diesel não afetou os anelídeos. Esses resultados foram atribuídos à baixa biodisponibilidade do contaminante, o que foi indicado por ensaios de ecotoxicidade aguda com o elutriado do solo contaminado utilizando microcrustáceos (*Daphnia sp.*) e análise do lixiviado do solo.

Com a adição de diesel ao solo, há um incremento da comunidade bacteriana (HAWROT-PAW et al., 2020; CHAUDHARY et al., 2021). Chaudhary et al. (2021) realizaram ensaio de microcosmo em solo contaminado por diesel com concentração de HTPs de 4.520 mg/kg com duração de 120 dias. Observaram que o pico do crescimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo ocorreu entre os dias 45 e 90 do experimento.

Esse crescimento pode estar relacionado com o nível de contaminação do solo. Em ensaios de 6 dias avaliando a respiração dos microrganismos autóctones de solo contaminado por diesel, Lapinskienė, Martinkus e Rėbždaitė (2006) obtiveram incremento na produção de CO₂ para contaminações de concentração 1 e 3% (m/m), quando comparados

ao controle. No entanto, o diesel foi tóxico para os microrganismos quando aplicado em concentrações mais elevadas.

A toxicidade desencadeada pelos hidrocarbonetos advém da difusão desses compostos através das membranas celulares dos organismos, levando à sua ruptura e interferindo nas enzimas celulares (LOGESHWARAN et al., 2018). Essa alteração na integridade das membranas acarreta mudanças na sua fluidez, resultando na toxicidade para os organismos, especialmente em ambientes de baixa umidade e temperatura. Hidrocarbonetos de menor peso molecular, em particular, têm a capacidade de atravessar as membranas celulares, desencadeando efeitos tóxicos (SHIN et al., 2005). HPAs voláteis e solúveis apresentaram maior toxicidade a vegetais (HENNER et al., 1999). Os efeitos deletérios causados pelo diesel, por exemplo, também afetam as plantas, causando lesões e até mesmo a morte dos embriões das sementes (ADAM; DUNCAN, 2002).

Considerando que os hidrocarbonetos do petróleo consistem em misturas de cadeias alifáticas e aromáticas de diferentes tamanhos e configurações, é possível que ocorra a formação de metabólitos durante processos de remediação (LOGESHWARAN et al., 2018). Metabólitos de fenantreno, por exemplo, após degradação por *Rhodococcus qingshengii* FF, apresentaram toxicidade para sementes de trigo (WANG et al., 2021).

De maneira correlata, em simulação realizada para 473 metabólitos originados da degradação dos 16 HPAs prioritários definidos pela USEPA, verificou-se que 222 desses derivados de HPAs apresentaram aumento em sua toxicidade quando comparados com os compostos predecessores (ZHAO et al., 2022). No entanto, outros estudos indicam que há redução da toxicidade de hidrocarbonetos sob micro e rizorremediação (PAGNOUT et al., 2006; JONER et al., 2001).

Corroborando essa visão, Shin et al. (2005) observaram que, após tratamento por ozônio em solo contaminado com diesel comercial, não foi encontrada toxicidade para minhocas *E. Fetida*, indicando que os subprodutos da degradação não apresentaram efeitos deletérios a esses organismos terrestres.

Portanto, ao promover a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, é importante avaliar se há conjuntamente a redução da toxicidade dos mesmos.

2.2 Áreas contaminadas

Conforme o Manual de Gerenciamento de Áreas contaminadas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), uma Área Contaminada (AC) "é uma área onde existe ou existiu fonte de contaminação primária e, como resultado, contém quantidades de matéria ou concentrações de substâncias, em ao menos um dos compartimentos do meio ambiente, capazes de causar danos aos bens a proteger"(CETESB, 2021).

Após a identificação de uma área potencialmente contaminada, essa contaminação

é confirmada e elaborado um modelo da área explicitando a situação atual do local. Uma análise de risco é realizada e definido então a necessidade de remediação do local.

A remediação de solos contaminados deve ser realizada visando mitigar riscos à saúde e ao meio ambiente, abordando o problema de forma química, física e biológica, visando eliminar, remover e dispor os contaminantes, bem como restaurar o ambiente afetado (OSSAI et al., 2020). São várias as técnicas disponíveis, que apresentam vantagens e desvantagens. A escolha da técnica a ser aplicada em um local particular deve levar em conta a concentração do contaminante, a urgência da situação, o custo, o tempo necessário para a remediação e a capacidade do tratamento atingir o nível de contaminantes necessário (RUSSELL, 2011; APARICIO et al., 2022)

Embora as intervenções físicas e químicas sejam reconhecidamente mais rápidas e eficazes, elas possuem limitações em relação ao tamanho das áreas tratadas, são dispendiosas, podem gerar poluentes secundários e têm potencial de causar danos ao meio ambiente (HAKEEM; AKHTAR; SABIR, 2016).

Como consequência disso, a abordagem biológica é considerada uma opção viável, aceita pela comunidade afetada pela contaminação e que promove a melhoria das características do solo (COUTO et al., 2012). A biorremediação é uma técnica importante para melhorar a saúde em países em desenvolvimento, o que destaca a necessidade de desenvolver novos métodos e aplicá-los no Brasil (DAAR et al., 2002).

A técnica da biorremediação foi, ou está sendo, adotada em 87 áreas contaminadas no estado de São Paulo (CETESB, 2023). Apesar do número considerável, ainda é inferior à utilização de técnicas como remoção de solo (693) e extração de vapores (377).

2.3 Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia de tratamento que promove a biodegradação de contaminantes orgânicos, através do estímulo da comunidade microbiana autóctone, com a adição de aceptores de elétrons ou nutrientes, ou com a inoculação de microrganismos exógenos (USEPA, 1997).

Compostos orgânicos hidrofóbicos são transportados para o interior das células dos microrganismos por diferentes mecanismos, incluindo transporte passivo, transporte ativo e endocitose (OK et al., 2020). Os hidrocarbonetos do petróleo são predominantemente decompostos por mecanismos específicos de biodegradação enzimática, que incluem processos aeróbicos (na presença de oxigênio) ou anaeróbicos (na ausência de oxigênio), ligação de células microbianas ao substrato, por meio da produção de biosurfactantes e emulsificantes (OSSAI et al., 2020).

No processo de obtenção de energia por microrganismos, estes assimilam hidrocarbonetos de petróleo em sua biomassa celular. Várias enzimas se envolvem nesse processo,

tanto na degradação aeróbica, quanto na anaeróbia. Dentre elas estão oxigenases, peroxidases, oxirredutases, hidroxilases e desidrogenases (VARJANI; UPASANI, 2017).

As diversas técnicas disponíveis para a biorremediação estão divididas entre dois grandes grupos: técnicas *in situ* e *ex situ*.

Dentre as técnicas *in situ* existem os exemplos de: introdução de nutrientes por percolação ou introdução em poços (bioestímulo), bombeamento e tratamento com reinjeção de águas subterrâneas, *air sparging* e suas modificações, barreiras reativas permeáveis, compostos liberadores de oxigênio, compostos liberadores de hidrogênio, além de introdução de melão e óleos vegetais (CETESB, 2021). Ademais, ainda é possível inocular microrganismos no solo, técnica conhecida como bioaumentação.

Muitas dessas técnicas são consolidadas e estão sendo aprimoradas ou modificadas com a adição do biocarvão. Como testes de bioaumentação (ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2019; GUIRADO et al., 2021; GALITSKAYA; AKHMETZYZANOVA; SELIVANOVS-KAYA, 2016), bioestímulo (HUSSAIN et al., 2018; WANG et al., 2017), composto liberador de oxigênio (HUNG et al., 2022), barreira reativa permeável (ZHU et al., 2022; LIU et al., 2019).

2.4 Biochar

A presença de geosorbentes carbônicos, como carvão, querogênio e coque em solo e sua atuação na adsorção de materiais orgânicos são amplamente conhecidos e debatidos (CORNELISSEN et al., 2005). A importância desses materiais na imobilização de poluentes orgânicos motivou a aplicação de substitutos com o mesmo intuito. Estes são conhecidos como *biochar* e são preparados ao pirolisar biomassa em diferentes condições, incluindo a variação da fonte de matéria orgânica, a temperatura e o tempo, sendo utilizado como solução em diversos processos sortivos (CHEN; CHEN, 2009). O *biochar* é capaz de proporcionar profusos aprimoramentos como geração de bioenergia, aumento da fertilidade do solo, sequestro de carbono, adsorção de poluentes orgânicos e inorgânicos e aumentos na capacidade de retenção de campo, adsorção de nutrientes e aeração (WANG et al., 2017; MIA et al., 2014).

O *biochar* é conhecido por sua capacidade de aprimorar as características do solo como a disponibilidade de nutrientes, a produção agrícola e a atividade microbiana e retenção hídrica (JIANG et al., 2016). Além disso, é um material eficiente na adsorção de contaminantes, como hidrocarbonetos de petróleo. A aplicação de *biochar* auxilia na mitigação das mudanças climáticas (estoque de carbono), controle de resíduos, produção de energia e melhora das condições do solo com benefícios sociais e/ou econômicos (LEHMANN; JOSEPH, 2015).

Dentre as diversas abordagens consolidadas no tratamento de solos contaminados

por petróleo, destaca-se a biorremediação, por seu baixo custo e fácil aplicação. Esse tipo de tratamento pode incluir a ação de microrganismos, macrófitas (fitorremediação) ou a união de ambos (rizorremediação) (HAKEEM; AKHTAR; SABIR, 2016).

A degradação de óleo cru em solo tem como principal via a mineralização dos compostos formadores do petróleo por microrganismos (QIN; GONG; FAN, 2013). No entanto, a eficiência do tratamento está diretamente ligada à diferentes fatores ambientais como pH, oxigênio, temperatura e disponibilidade de nutrientes (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

O *biochar* também é capaz de alterar propriedades do solo como pH, retenção de água, sequestro de carbono, capacidade de troca catiônica, área superficial e aeração, o que pode influenciar na atuação de microrganismos. O aprimoramento das características do solo altera a comunidade microbiana do local (ZHU et al., 2017). Além disso, o *biochar* poderia garantir abrigo para os microrganismos, promover a disponibilidade de nutrientes, alterar a ação de enzimas, interromper a comunicação entre células microbianas e possivelmente adsorver parte do contaminante, diminuindo sua toxicidade e garantindo melhor atuação dos microrganismos.

No entanto, *biochar* também demonstrou não contribuir para o aumento na quantidade de microrganismos presentes em solo contaminado por petróleo, sendo necessária a adição de outra fonte de nutrientes, como consequência da diminuição da biodisponibilidade do poluente causada pela sorção ao biocarvão (CIPULLO et al., 2019). Esse resultado se contrasta com o de Kong et al. (2018) que buscaram observar a possível interação de HPAs com o *biochar* em ambiente abiótico, concluindo que somente 20% da concentração inicial do contaminante se degradou por ação fotolítica, sem ação significativa da sorção ao *biochar* que teria sido preterido em comparação com a matéria orgânica do solo.

Os mesmos autores também afirmam que a interação entre a matéria orgânica do solo e o *biochar*, além da deposição dos microrganismos nos poros do segundo juntamente com os HPAs tornaria os poluentes mais biodisponíveis, contribuindo para a alteração da comunidade microbiana e da degradação. Já Galitskaya, Akhmetzyanova e Selivanovskaya (2016) concluíram que a presença de *biochar* aumentou a especificidade da comunidade bacteriana e garantiu que os microrganismos adicionados pela técnica de bioaumento não sofressem efeitos pela repentina inserção no ambiente.

Quanto à biodisponibilidade, Zhen et al. (2019) obtiveram melhores resultados na degradação de petróleo ao adicionarem ramnolipídio (biosurfactante) juntamente ao *biochar* no solo. Isso ocorre pois essa substância favorece a dissolução de hidrocarbonetos de petróleo, tornando-os mais disponíveis. No entanto, foi possível notar diminuição na quantidade de fungos nos microcosmos com biosurfactante, o que indicaria possível toxicidade para esses organismos. Em contrapartida, Brown et al. (2017) concluíram que o tratamento com ramnolipídio sozinho teve pior resultado dos ensaios realizados. O artigo

propõe que o surfactante seja tóxico para microrganismos, citando seu efeito deletério especialmente em bactérias gram negativas. É importante, portanto, avaliar como aditivos no solo, visando incrementar a degradação microbiana de compostos orgânicos, interagem com a comunidade de microrganismos do solo.

Ao realizar testes de bioaumento e bioestímulo em solo argiloso contaminado por diesel, Chagas-Spinelli et al. (2012) notaram grande decréscimo do pH nos primeiros 17 dias de ensaio, resultando em valores menores que 5. Desta forma, houve redução também da população bacteriana autóctone. Destaca-se, portanto, a necessidade de controlar essa variação. A capacidade do *biochar* de dirimir variações no pH também é importante para a manutenção da atividade dos microrganismos. Zhang, Zhang e Zhang (2019) notaram que a presença desse aditivo impediu que os ácidos formados pelo consumo da matéria orgânica contida no solo diminuíssem o pH como ocorreu nos tratamentos realizados sem o biocarvão.

No entanto, Quilliam et al. (2013) salientam que a potencial presença de HPAs em *biochar* recém-pirolisado poderia ser tóxica aos microrganismos, dificultando que estes ocupem os poros do aditivo. Ainda assim, o *biochar* poderia ser benéfico na disponibilidade de carbono lábil para os microrganismos presentes no entorno do biocarvão.

Apesar do potencial demonstrado pelo *biochar* na melhoria das condições gerais do solo como aeração, retenção de água e manutenção do pH, isso poderia não ser o suficiente para a geração de um habitat ideal para os microrganismos (HAN et al., 2016). Segundo Han et al. (2016), os poros do aditivo seriam menores que 1 μm , não formando um ambiente favorável à biota microbiana. No entanto, Kong et al. (2018) concluíram que houve maior degradação do que sorção de HPAs em solos com presença de *biochar*. Isso demonstraria que o *biochar* foi propício para o desenvolvimento de microrganismos em seus poros. Esta condição, portanto, se difere conforme as características morfológicas dos biocarvões.

Alguns autores avaliaram a capacidade do *biochar* de remediar solos contaminados por compostos orgânicos em biorreatores de bancada (XIONG et al., 2017; OLESZCZUK; KOŁTOWSKI, 2017; OMONI et al., 2020; HUNG et al., 2022). A constante agitação, fomenta o contato entre contaminantes e os microrganismos presentes no solo, além de aumentar a aeração. Esses experimentos permitem avaliar potenciais tratamentos para uso em campo, em um menor tempo, e costumam refletir o potencial de degradação do contaminante no solo (ROBLES-GONZÁLEZ; FAVA; POGGI-VARALDO, 2008).

A despeito do potencial da biorremediação, o uso de somente uma tecnologia de tratamento pode não ser suficiente para uma remediação eficiente, economicamente viável e sustentável (CECCHIN et al., 2017).

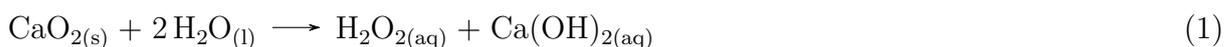
2.5 Compostos liberadores de oxigênio

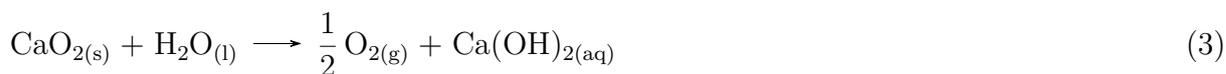
A disponibilidade de oxigênio é considerado um dos aspectos mais importantes para biorremediação *in situ*, já que os microrganismos aeróbios autóctones metabolizam os hidrocarbonetos de petróleo (KUNUKCU, 2007). Compostos Liberadores de oxigênio (CLO) atuam justamente reforçando essa biorremediação, já que são compostos químicos que, quando hidratados, liberam oxigênio de forma gradual, aumentando a biodegradação de moléculas orgânicas (KOENIGSBERG; SANDEFUR, 1999).

O *Oxygen Releasing compound* (ORC[®]) originalmente era um composto patenteado formado por fosfato e peróxido de magnésio (FRAGKOU et al., 2021). Com o passar do tempo, essa nomenclatura passou a ser aplicada a diversos compostos com capacidade de liberar oxigênio quando hidratados. Muitos desses materiais são sólidos e são muitas vezes utilizados *in-situ* ou *ex-situ* misturados em água, formando uma lama (KOENIGSBERG; SANDEFUR, 1999). ORCs manufaturados são aplicados no campo desde os anos 90 para o tratamento de BTEX em águas subterrâneas (ODENCRANTZ; JOHNSON; KOENIGSBERG, 1996).

Especificamente no contexto de hidrocarbonetos de petróleo, vários pesquisadores exploraram o uso de diferentes materiais com o propósito de mitigar a contaminação. Menendez-Vega et al. (2007), por exemplo, alcançaram uma redução na contaminação ao injetar peróxido de hidrogênio continuamente por 8 meses em água subterrânea contaminada por diesel, observando concomitantemente um aumento na comunidade microbiana nos primeiros 3 meses. Já em um estudo aplicando MgO₂ por 120 dias em água subterrânea contaminada com gasolina, Kunukcu (2007) identificou uma redução significativa entre 95,45% e 99,04% nos compostos BTEX.

O peróxido de cálcio (CaO₂) é um peróxido do metal comumente utilizado como um CLO (MCCORMAC; BEAZLEY, 2020). Usualmente, o mecanismo da formação do oxigênio é atribuído a um mecanismo de reação de duas fases, com a formação prévia de H₂O₂ como apresentado nas Equações 1 e 2. No entanto, outros autores destacam que existe a possibilidade de geração sem a necessária formação de H₂O₂, por um mecanismo paralelo, como apresentado nas Equações 3 e 4 (LU; ZHANG; XUE, 2017).





O processo de liberação de H_2O_2 a partir do peróxido de cálcio ocorre em uma faixa de pH que varia de 3 a 11. Além da liberação de oxigênio molecular, o H_2O_2 se converte em espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) e o superóxido ($\text{O}_2^-\bullet$), estes com capacidade de contribuir na degradação de compostos recalcitrantes (HUNG et al., 2022).

O peróxido de cálcio, um dos mais estáveis peróxidos inorgânicos, é amplamente aplicado para o tratamento de efluentes, compostos orgânicos voláteis, inibição de cianobactérias e para remediação de solo e águas superficiais (LU; ZHANG; XUE, 2017). Huang et al. (2015) adotaram CLO composto por CaO_2 , bentonita, cimento Portland, areia e água para a remoção de NH_4^+ em ensaios de coluna. A presença do CLO aumentou a degradação microbiana do íon amônio ao promover sua nitrificação, demonstrando o potencial desses materiais na liberação de oxigênio em meio aquoso.

Ensaio em biorreatores de bancada foram realizados para avaliar a eficiência de degradação de BTEX em água subterrânea por 3 diferentes compostos com CaO_2 em sua composição durante dois meses (MASTORGIO et al., 2019). Os autores observaram maior degradação em todos os os tratamentos com o aditivo, quando comparados com o controle.

Dado o crescente interesse na capacidade do *biochar* de incrementar a biodegradação de compostos orgânicos, pesquisadores vêm buscando atrelar as potencialidades de CLOs e *biochar*. Li et al. (2019) testaram uma barreira reativa fabricada em pallets contendo, entre outras substâncias, *biochar* e peróxido de cálcio e obtiveram remoção de quase 100% de fenantreno da água após 450 dias.

Shen et al. (2023) modificaram *biochar* produzido a partir de biomassa de bambu com a adição de CaO_2 em sua composição e avaliaram a capacidade desse composto em degradar diesel em água. Os autores obtiveram resultados positivos, tanto na degradação dos hidrocarbonetos, como no incremento da comunidade microbiana, quando comparado com o controle.

Utilizando conjuntamente *biochar* formado a partir da biomassa de jacinto-de-água (*Eichhornia crassipes*) e peróxido de cálcio, Hung et al. (2022) avaliaram a degradação de 4-n-Nonilfenol em sedimento atingindo 71% de eficiência após 12h, demonstrando o potencial desse tratamento na remoção de compostos orgânicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e caracterização do solo

O solo superficial (0-20 cm) foi coletado na bacia de contenção de um tanque de armazenamento de hidrocarbonetos pertencentes a uma empresa atacadista de derivados de petróleo no estado do Rio de Janeiro. O solo, que provém de jazida de uma área de mineração, é colocado sobre o local e assentado com auxílio do próprio trator. Em caso de contaminação, o solo é removido do local e levado para co-processamento.

No caso da bacia onde houve a coleta, o solo havia sido recentemente posicionado, não havendo histórico de contaminação no local. Foram coletados aproximadamente 100 kg de solo úmido utilizando ferramentas como pás, enxadas e picaretas.

A amostra foi transportada até o Laboratório de Mecânica dos Solos (LMS) da UERJ, localizado no bairro de São Cristóvão, RJ. Em seguida, o solo foi seco ao ar, destorroado e peneirado por peneira #10 (2 mm). As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente em sacolas plásticas. No mesmo laboratório, foi realizada a caracterização geotécnica do solo através de ensaios de Limite de plasticidade (NBR 7180), Limite de liquidez (NBR 6459) e Análise granulométrica (NBR 7181) (ABNT, 2016b; ABNT, 2016a; ABNT, 2016d). Ademais, foi feito o ensaio de compactação (NBR 7182) (ABNT, 2016c). Na Figura 1 estão apresentadas imagens tanto da coleta, quanto do procedimento para a secagem do solo.

Figura 1 – Coleta e manejo da amostra de solo de bacia de contenção de tanque de armazenamento de hidrocarbonetos de petróleo.



(a)



(b)



(c)

Legenda: (a) Procedimento de coleta do solo. (b) Profundidade máxima coletada em torno 20 cm. (c) Procedimento de secagem do solo.

Fonte: O autor

Uma alíquota do solo coletado, em torno de 5 kg, foi transportada para o Laboratório de Engenharia Sanitária (LES). Foi preparada suspensão de solo em água destilada em proporção 1:2 solo:água (m/m) por 24h. Em seguida, o conjunto foi centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante analisado para pH, condutividade, cloreto e nitrogênio amoniacal, seguindo metodologias do Standard Methods (RICE et al., 2012). Os métodos e os equipamentos utilizados estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros físico-químicos da suspensão de solo limpo.

Parâmetro	Método	Equipamento
pH	4500 – H+ B	Eletrodo Quimis/QH004
Condutividade elétrica	2510 B	Eletrodo MS Tecno- por/mCA
Cloreto	4500-Cl- B	Titulação
Nitrogênio amoniacal	4500-NH3 D	Eletrodo seletivo Orion 290 A
Carbono Orgânico Total (COT)	5310 B	Shimadzu SSM-5000A Solid Sample Combustion Unit

Fonte: Rice et al. (2012)

Além disso, foi realizada determinação de matéria orgânica, seguindo metodologia de Teixeira et al. (2017). Posteriormente, o solo foi enviado para o Centro de Estudos e Análises Agropecuárias e Ambientais (CEAgro), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para análise de fertilidade (TEIXEIRA et al., 2017) e de metais (USEPA, 1996a). Os métodos e os parâmetros analisados estão apresentados nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Parâmetros e métodos para análise de fertilidade do solo.

Parâmetro	Método
Fósforo total	Mehlich-1
Potássio	Mehlich-1
Sódio	Mehlich-1
Cálcio	KCl mol L
Magnésio	KCl mol L
Capacidade de Troca Catiônica (CTC)	Soma bases trocáveis + (H + Al)
Nitrogênio	Saturação Na

Quadro 3 – Parâmetros e métodos para análise de metais no solo.

Parâmetro	Método
Alumínio	USEPA 3050
Cádmio	USEPA 3050
Zinco	USEPA 3050
Chumbo	USEPA 3050
Cobre	USEPA 3050
Ferro	USEPA 3050
Manganês	USEPA 3050
Níquel	USEPA 3050
Cobalto	USEPA 3050
Cromo	USEPA 3050

No Laboratório de Engenharia Sanitária, o solo também passou por análise de Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Utilizou-se o equipamento Shimadzu IRTracer-100 com o acessório para obtenção de espectros por Reflexão Total Atenuada (ATR). Foram realizados 45 scans na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.2 Peróxido de cálcio

O peróxido de cálcio 75% foi adquirido na companhia Sigma-Aldrich®. O pó de cor branco amarelado com partículas de 0,074 mm é de número CAS 78403-22-2. Esse material também foi analisado por FTIR de maneira correlata ao que fora feito com o solo.

3.3 Produção e caracterização do *biochar*

O *biochar* foi derivado de biomassa de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e produzido em uma unidade destinada à fabricação de carvão para a indústria siderúrgica, localizada no município de Bom Despacho, MG. O processo de produção do biocarvão envolveu a pirólise da biomassa em um forno do tipo "rabo quente", uma tecnologia tradicionalmente utilizada no Brasil. Esses fornos são de fácil construção e operação, representando uma evolução em relação aos fornos de trincheira historicamente empregados, mantendo a

simplicidade operacional e sendo economicamente acessíveis (IBAMA, 1999). O tempo de residência durante a pirólise foi de 70 a 80 horas, com temperatura mantida em torno de 450 °C.

Uma alíquota do *biochar* foi enviado a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) para análise de nutrientes.

Para avaliar a possível presença de metais no *biochar* produzido, realizou-se uma análise por meio de espectrômetro de fluorescência de raios X portátil (pXRF), conforme detalhado na pesquisa conduzida por Pereira et al. (2021). De forma concisa, amostras do carvão foram trituradas utilizando almofariz de ágata e analisadas no "Modo solo" por 180 segundos, em triplicata. Os elementos alvo da análise compreendiam arsênio (As), chumbo (Pb), cádmio (Cd), níquel (Ni), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), antimônio (Sb), prata (Ag), bário (Ba) e cromo (Cr).

As concentrações aferidas de metais no *biochar* estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Metais no *biochar*

Parâmetro	Concentração
As (mg kg ⁻¹)	nd
Pb (mg kg ⁻¹)	3
Cd (mg kg ⁻¹)	12
Hg (mg kg ⁻¹)	nd
Ni (mg kg ⁻¹)	nd
Fe (mg kg ⁻¹)	246
Zn (mg kg ⁻¹)	2
Cu (mg kg ⁻¹)	nd
Mn (mg kg ⁻¹)	412
Sb (mg kg ⁻¹)	nd
Ag (mg kg ⁻¹)	46
Ba (mg kg ⁻¹)	23
Cr (mg kg ⁻¹)	nd

Legenda: nd: não detectado

Fonte: Pereira et al. (2021)

A concentração de prata (Ag) no *biochar* excede os limites estabelecidos para a prevenção agrícola pela Resolução Conama 420 de 2009, fixados em 25 mg kg⁻¹ (CONAMA, 2009). No caso do cádmio (Cd), os valores ultrapassam os limites recomendados para uso agrícola e residencial, estabelecidos respectivamente em 3 e 8 mg kg⁻¹.

Ao comparar com os valores de referência sugeridos pela IBI (2016), observa-se que o *biochar* não ultrapassa nenhum dos parâmetros. Entretanto, ao seguir as orientações da EBC (2012), a presença de Cd no *biochar* excede o recomendado, que é de 0,8 mg kg⁻¹.

Esses metais têm como principal fonte a biomassa utilizada na produção do *biochar*,

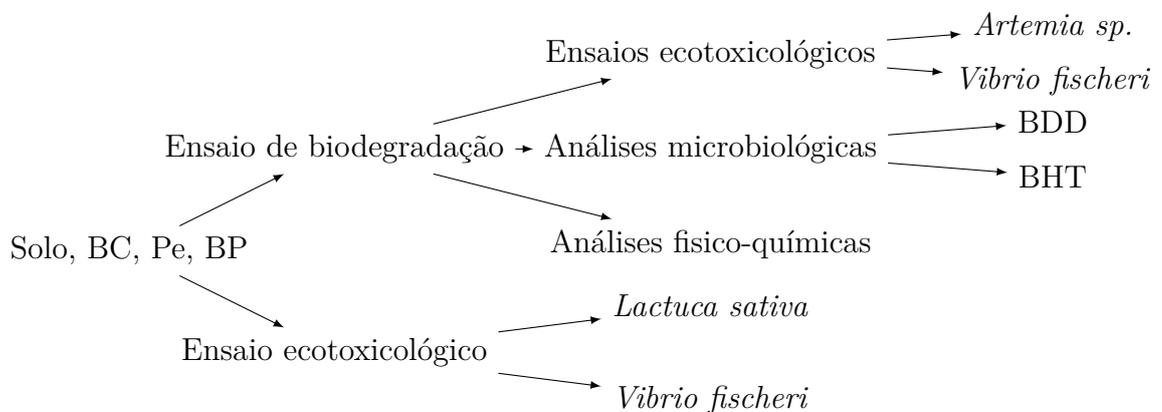
podendo ser concentrados durante o processo de fabricação (EBC, 2012). Espécies de eucalipto já demonstraram a capacidade de acumular Cd em suas raízes e partes aéreas que estavam presentes anteriormente no solo (SOARES et al., 2005). Esta poderia ser a origem desse metal no *biochar*, mas estudos mais aprofundados são necessários para confirmar esses resultados, abrangendo tanto a metodologia de detecção quanto as causas subjacentes a esses achados.

O *biochar* foi submetido a um processo de trituração utilizando almofariz e pistilo de vidro, seguido de análise por Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A metodologia empregada foi correlata àquela realizada para o solo, incluindo o uso do acessório ATR.

3.4 Ensaio de biodegradação

O ensaio de biodegradação e as subseqüentes análises ecotoxicológicas estão resumidos no esquema apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma com resumo das etapas realizadas para o ensaio de biodegradação de hidrocarbonetos em solo contaminado por diesel



Legenda: BC: Solo + 5% biochar; Pe: Solo + 1% CaO₂; BP: Solo + 5% biochar + 1% CaO₂; BHT: Bactérias heterotróficas totais; BDD: Bactérias degradadoras de diesel

3.4.1 Preparo dos biorreatores de bancada

O solo foi contaminado artificialmente por diesel S10 obtido na mesma empresa atacadista onde foi coletado o solo. A proporção de diesel utilizada foi de 20.000 mg/kg. Buscou-se realizar uma contaminação que não afetasse de maneira decisiva a atividade microbiana do solo, impossibilitando, assim, avaliar o potencial do tratamento proposto.

Zhen et al. (2019), por exemplo, analisaram que concentração de 50.000 mg/kg de hidrocarbonetos de petróleo afeta a atividade enzimática dos microrganismos do solo.

O solo foi revolvido vigorosamente durante 5 minutos em receptáculo de alumínio e mantido em repouso durante 30 dias no escuro e em temperatura ambiente para que o sistema se estabelecesse e o contato entre o diesel e o solo fosse homogêneo (ALMEIDA, 2011). Na Figura 3, está apresentado o receptáculo onde o solo foi mantido. O frasco foi envolvido em saco plástico para evitar a perda de voláteis.

Figura 3 – Condições em que o solo foi mantido pós contaminação.



A escolha da metodologia por meio de biorreatores foi motivada pela interação contínua entre a água e o solo, o que intensifica a degradação dos compostos orgânicos. Essa abordagem permite a obtenção de resultados de maneira mais rápida e tem sido empregada para avaliar tratamentos destinados à implementação posterior em campo (MASTORGIO et al., 2019; EZIUZOR; OKPOKWASILI, 2013; MADDELA et al., 2016).

Alíquotas de 50g do solo contaminado foram adicionados nos Erlenmeyers previamente descontaminados com diclorometano e acetona e esterilizados por autoclave a temperatura de 120 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados os aditivos seguindo a proporção de 5% (m/m) (OLESZCZUK; KOŁTOWSKI, 2017) para o *biochar* e 1% (m/m) para o peróxido de cálcio. Os procedimentos experimentais incorporaram a introdução de *biochar* (BC), peróxido de cálcio (CaO₂) isoladamente, e a combinação de ambos (BP) no solo, seguindo as proporções mencionadas. Adicionalmente, foram elaborados dois conjuntos de controle: um apenas com a adição do solo contaminado (C) e outro com solo previamente autoclavado por 15 minutos a 120 °C, designado como controle abiótico (CA). Foram adicionados sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) para obter proporção C:N:P em 100:10:1.

Então foi adicionada solução normal de NaCl 0,85% (m/m) em proporção 1:4 massa do solo:solução (EZIUZOR; OKPOKWASILI, 2013; SAEZ et al., 2014; SABATÉ; VINAS; SOLANAS, 2004). Buscou-se obter a menor proporção possível, com o objetivo de obter massa de solo suficiente, mas mantendo a trabalhabilidade do solo. A utilização de solução de NaCl foi realizada com o intuito de preservar as comunidades microbianas presentes no solo. A possível utilização de água destilada, por exemplo, causaria um distúrbio osmótico nos microrganismos.

Os erlenmeyers foram selados utilizando 2 camadas de papel alumínio seguida por outra de plástico filme. Os reatores de bancada foram mantidos em temperatura ambiente e no escuro por 30 dias. A temperatura foi aferida e anotada diariamente nos dias em que o laboratório de engenharia sanitária, onde as análises foram realizadas, se encontrava acessível, resultando em 17 medições com temperatura média de 26,8 ± 1,96 °C. O sistema foi mantido a 100 rpm em mesa agitadora. A mesa agitadora foi mantida em uma caixa de papelão, mantendo o sistema sem a incidência de luz. 150g de solo contaminado foram armazenados a -4 °C para posterior análise de HTPs. Na Figura 4, é possível observar o sistema de biorreatores de bancada montado.

Figura 4 – Reatores de bancada.



Após 24h em agitação, 20 mL do conteúdo dos erlenmeyer foi removido para provetas de vidro. Como o *biochar* flotava nos biorreatores, ao verter o conteúdo em provetas, alguma fração do material poderia ser recolhida, alterando os tratamentos. Por conta disso, os tratamentos envolvendo o *biochar* (BC e BP) a remoção do sobrenadante foi realizada com pipetas volumétricas de vidro previamente descontaminadas. Esse procedimento foi repetido 14 e 28 dias após o início do ensaio. Durante a remoção do sobrenadante após 1 dia do início de ensaio, um erro operacional impediu que houvesse a coleta em uma réplica do controle e uma do controle abiótico, sendo as análises então realizadas somente para três dos reatores nos controles.

Em seguida, o material foi filtrado em membrana de fibra de vidro de $0,7 \mu\text{m}$ e o líquido foi analisado quanto às suas características físico-químicas. O solo foi, então, deixado assentar por 1h. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi removido para análise de bactérias heterotróficas e 1 mL foi removido para análise de bactérias degradadoras de diesel.

No final do tempo de ensaio, amostras de solo de cada erlenmeyer foram transferidas para uma embalagem de alumínio e mantido em estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ para secagem (OLESZCZUK; KOŁTOWSKI, 2017; SOUZA, 2007), totalizando 72 horas. Em seguida, parte das amostras foi mantida em refrigeração para posteriores análises de ecotoxicidade e outra parte das amostras foi transportada para análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) no Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) da Petrobras.

3.4.2 Análises físico-químicas

3.4.2.1 pH

As análises de pH foram realizadas utilizando eletrodo conforme a metodologia 4500 – H+ B do Standard Methods (RICE et al., 2012). Foi utilizado o pHmetro Quimis/QH004.

3.4.2.2 Condutividade

A análise de condutividade elétrica seguiu metodologia 2510 B do Standard Methods, método utilizando eletrodo (RICE et al., 2012). O equipamento utilizado foi o eletro MS Tecnopor/mCA com os sobrenadantes dos reatores.

3.4.2.3 Salinidade

A salinidade foi determinada por refratômetro portátil de alta resolução para salinidade RTS-101ATC.

3.4.2.4 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Foi realizada diluição em 1:4 para todas as amostras, já que a alta concentração de cloreto proveniente do NaCl adicionado às amostras forma precipitados, impossibilitando a leitura de maneira fidedigna. Foi seguida metodologia detalhada no Standard methods (5220 D) (RICE et al., 2012).

3.4.2.5 Dureza

A metodologia empregada seguiu o preconizado pelo Standard Methods, metodologia 2340 C, método de titulação (RICE et al., 2012). Foi necessária diluição de todas as amostras, por haver pouca disponibilidade de volume para realizar os ensaios. Os volumes utilizados variaram entre 5 e 10 mL de acordo com o volume de amostra disponível.

3.4.3 Determinação de hidrocarbonetos de petróleo no solo

A extração das amostras de solo seguiu a metodologia descrita no procedimento USEPA 3540C, utilizando a técnica de Soxhlet (USEPA, 1996d). As amostras foram previamente destorroadas e homogeneizadas. Uma quantidade de 10 g de solo foi combinada com 15 g de terra diatomácea, e p-terfenil-d14 foi adicionado como "surrogate". Essa mistura foi, então, submetida à extração no sistema Soxhlet, utilizando o solvente diclorometano por aproximadamente 18 horas. O extrato resultante passou por um processo de purificação por cromatografia em coluna.

Para a quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo, foi feito "cleanup" do extrato em coluna cromatográfica segundo as metodologias 3630c e 3611b da USEPA (USEPA, 1996c; USEPA, 1996b). Nessa coluna foram acrescentados 5% de sílica gel e 1% de alumina desativada. A eluição foi realizada com 10 mL de n-hexano para obtenção da fração 1, extrato utilizado para determinação de hidrocarbonetos alifáticos. A eluição da fração 2, utilizada para determinação de HPAs, foi realizada com uma mistura em razão 1:1 (v/v) de diclorometano e n-hexano.

Para a quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo, foram utilizados as duas frações obtidas anteriormente. A determinação seguiu a metodologia 8015C da USEPA (USEPA, 2007). A análise foi realizada por um cromatógrafo gasoso, acoplado a um detector de ionização de chamas modelo CG Agilent Technologies 8890A. A temperatura do injetor foi de 300 °C, o gás de arraste empregado foi o hélio e o volume de injeção foi de 2 µL.-

Para o cálculo de remoção de HTPs foi usada a Equação 5 .

$$\text{Remoção de HTPs} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (5)$$

Onde:

C_0 = Concentração inicial em mg kg⁻¹

C_t = concentração em determinado tempo em mg kg⁻¹

A biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias com *biochar* já foi descrita anteriormente como um modelo de cinética de primeira ordem (SAEED et al., 2023). Nesse contexto, a constante de degradação dos hidrocarbonetos foi calculada com base nesse comportamento, empregando a Equação 6.

$$\ln C_0/C_t = kt \quad (6)$$

Onde:

t = Tempo em dias

k = Constante de degradação de primeira ordem

3.4.4 Análises microbiológicas

Foram realizadas duas análises de bactérias durante a execução do ensaio de biorremediação: bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias degradadoras de diesel (BDD). No total, foram preparadas 270 placas para a quantificação de microrganismos.

3.4.4.1 Bactérias heterotróficas totais

A quantificação de BHT foi realizada para os tratamentos de BP e para o controle (C). O procedimento seguiu o método de espalhamento em superfície.

A mesa agitadora contendo os biorreatores foi pausada, deixando o solo decantar por 1h. 1 mL do sobrenadante foi recolhido no interior do fluxo laminar com pipetas de vidro previamente descontaminadas. Foram escolhidos aleatoriamente dois erlenmeyers das quadruplicatas existentes. Essas alíquotas então foram diluídas em série em solução de 0,85% de NaCl de 10^{-1} a 10^{-4} . Este procedimento, assim como o seguinte espalhamento nas placas, foi realizado em fluxo laminar. Somente as diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas.

O meio agar triptona de soja (*trypticase soy agar*) conhecido como meio TSA foi escolhido para esta análise de BHT (BRASIL et al., 2006; JAROSŁAWIECKA; PIOTROWSKA-SEGET, 2022). O meio TSA pode ser usado como meio de cultura para cultivo de bactérias e fungos fastidiosos e não fastidiosos, sendo possível a inoculação de microrganismos aeróbios e aneróbios (Merck Milipore, 2018).

O meio foi preparado de acordo com recomendações do fabricante (40 g/L) e mantido em agitação e aquecimento até dissolução do material. A solução foi então autoclavada por 15 minutos a 120 °C. O meio foi mantido na autoclave para manutenção de temperatura e seu posterior uso.

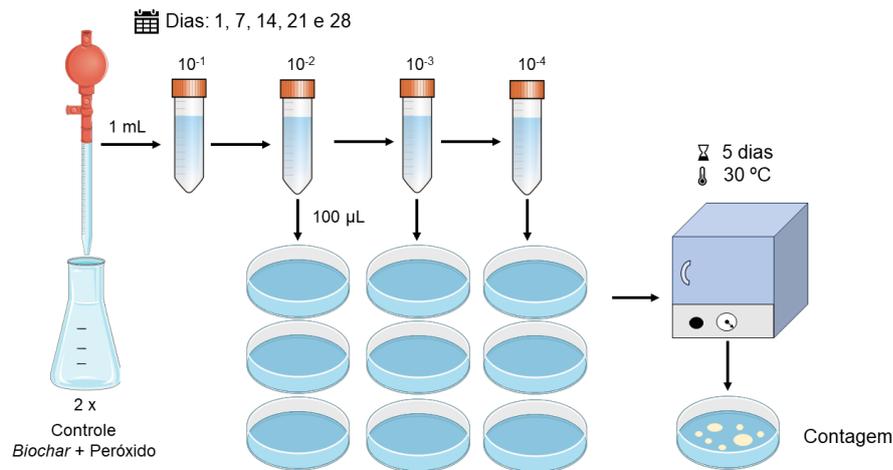
O meio liquefeito foi vertido nas placas de Petri descartáveis estéreis (90x10mm) no interior do fluxo laminar. Após o enrijecimento do meio, uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi posicionada na superfície do meio e espalhada de maneira uniforme com auxílio de uma alça de Drigalski de vidro flambada à chama antes e após o uso.

As placas foram então mantidas a 30 °C em incubadora por 5 dias até a contagem de colônias e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo seco (UFC/g solo) (SAEED et al., 2023). As colônias foram contadas nas diluições em que o número de colônias variou entre 20 e 200. Se o valor encontrado fosse abaixo

dessa faixa, a contagem foi realizada e o valor foi apresentado como uma estimativa (ASTM, 1998).

Esta quantificação foi realizada 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o início do ensaio. Observando as quantificações realizadas nos dias anteriores, o mesmo procedimento foi empregado para somente uma réplica do biorreator com *biochar* no dia 28 de ensaio. Na Figura 5 está apresentado o resumo esquemático do ensaio realizado.

Figura 5 – Esquema do processo de quantificação de bactérias heterotróficas totais.



Fonte: O autor.

3.4.4.2 Bactérias degradadoras de diesel

Este ensaio foi realizado de maneira correlata ao de bactérias heterotróficas totais. Desta vez, foi realizado para todos os tratamentos propostos, ou seja, controle (C), controle abiótico (CA), *biochar* (BC), peróxido (Pe), e *biochar* + peróxido (BP). Foi utilizada metodologia do espalhamento em superfície do meio com amostras do sobrenadante dos biorreatores.

Foi empregado meio mineral mínimo (MM) como meio de cultura, com a adição de diesel como fonte de carbono para promover o crescimento das bactérias degradadoras de diesel (BDD). A composição do MM foi a seguinte: 1 g de K_2HPO_4 ; 0,6 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot H_2O$; 0,2 g de KCl; 1 g de $NaNO_3$; em 1000 ml de água destilada, suplementada com 1% de solução de elementos-traço (12,5 mg de H_3BO_3 ; 50 mg de $CaSO_4 \cdot H_2O$; 25 mg de $CoCl_2 \cdot H_2O$; 50 mg de $CuSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 25 mg de $NaMoO_2 \cdot 2H_2O$; 5 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 7,5 mg de

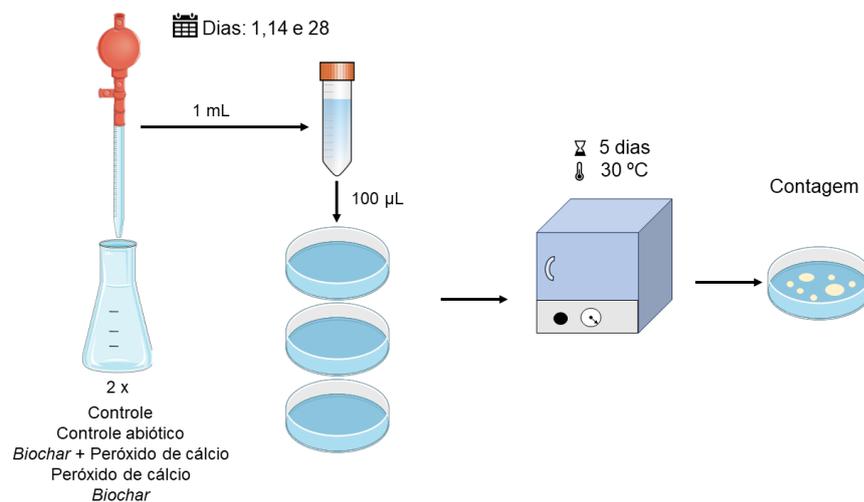
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 750 mg de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; em 250 ml de água destilada) e 20 g/L de agar (PARK; CRAGGS, 2010).

O meio foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos. Em seguida, de maneira asséptica, o diesel previamente filtrado em membrana de 0,22 μg foi adicionado ao meio na proporção de 0,1% (v/v), em um fluxo laminar (AGAMUTHU; TAN; FAUZIAH, 2013). Esse procedimento visou garantir que o diesel estivesse livre de microrganismos antes do espalhamento das amostras. O meio foi agitado vigorosamente antes de ser transferido para as placas de Petri.

Aleatoriamente, foram selecionadas duas das quadruplicatas dos biorreatores para cada tratamento, e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi colhida. Desse volume, alíquotas de 100 μL foram então uniformemente espalhadas sobre o meio após seu endurecimento, com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas foram armazenadas em estufas a 30 °C por 14 dias, e em seguida, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo (UFC/g solo). Quando o número de colônias ultrapassou o estipulado (20-200), a contagem foi estimada traçando quadrados de 4 cm^2 na placa, contando em um deles e multiplicando por 16. Em tais casos, o número foi considerado como estimado. Esse procedimento foi repetido 1, 14 e 28 dias após o início do ensaio de biorremediação. Um resumo do ensaio está apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema do processo de quantificação de bactérias degradadoras de diesel



Fonte: O autor.

3.5 Ensaios ecotoxicológicos

3.5.1 *Lactuca sativa*

Os testes de germinação tiveram o intuito de aferir se o tratamento proposto com *biochar* e peróxido de cálcio apresentaria efeitos negativos aos vegetais. Foi escolhido manter o solo original como branco já que ele não possuía histórico de contaminação. Foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*), organismo recomendado para avaliação ecotoxicológica de substâncias em solo (USEPA, 2012).

Os ensaios de germinação foram conduzidos conforme a metodologia proposta por Rabelo et al. (2018). Foram separadas alíquotas de 150g de solo para cada tratamento, que incluíam um branco (B), composto unicamente do solo limpo coletado na bacia de contenção, 5% m/m de *biochar* (BC), 1% m/m de peróxido de cálcio (PE), e uma mistura de peróxido e *biochar* nas proporções mencionadas (BP). O solo foi vigorosamente misturado aos aditivos por 5 minutos para garantir homogeneização.

Posteriormente, o solo foi umedecido com água destilada até atingir 40% da umidade teórica e foi homogeneizado para garantir umidade constante em todas as réplicas. As amostras foram mantidas em repouso por 24h em frasco vedado e escuro. Com o intuito de certificar a umidade real do solo, foram coletadas alíquotas do material e submetidas à metodologia de determinação de umidade descrita em Teixeira et al. (2017).

Massa seca de 30g do solo foi adicionada a placas de Petri de plástico estéreis, com aproximadamente 15 cm de diâmetro. Em cada placa, um papel de filtro foi colocado sobre o solo, de maneira que o mesmo ficasse úmido, e 10 sementes de alface foram dispostas sobre ele com o auxílio de pinças de alumínio. Totalizaram, então, 40 sementes para cada tratamento. As sementes aplicadas no ensaio foram da empresa ISLA do mesmo lote, sendo selecionadas visualmente as que eram do mesmo tamanho e cor, rinsadas com água destilada e secas ao ar sobre papel de filtro.

Todos os procedimentos foram realizados em quadruplicata, e as placas foram mantidas a uma temperatura constante de 23°C por 132 horas, sem exposição à luz. As contagens das sementes germinadas foram realizadas em 48, 96 e 132 horas após o início do ensaio. Ao final das 132 horas, foram medidas as raízes e as partes aéreas das sementes germinadas com a utilização de um paquímetro digital Digimess.

Em posse dos resultados, foram definidos os seguintes indicadores: germinação das sementes (GS), germinação relativa das sementes (GRS), crescimento radicular relativo (CRR) e índice de germinação (IG) (LUO et al., 2018; MARMIROLI et al., 2022). Esses indicadores estão expressos nas Equações 7, 8, 9, 10, respectivamente. Adicionalmente, o Índice Parte Aérea/Raiz (IPAR), proposto por Marmioli et al. (2022), foi calculado pela

Equação 11.

$$GS = \frac{G}{G_t} \times 100\% \quad (7)$$

Onde:

G = Número de sementes germinadas

G_t = Número total de sementes plantadas

$$GRS = \frac{G_{sa}}{G_{sc}} \times 100\% \quad (8)$$

Onde:

G_{sa} = Número de sementes germinadas (amostra)

G_{sc} = Número de sementes germinadas (controle)

$$CRR = \frac{L_{ra}}{L_{rc}} \times 100\% \quad (9)$$

Onde:

L_{ra} = Comprimento total das raízes em mm (amostra)

L_{rc} = Comprimento total das raízes em mm(controle)

$$IG = \frac{G_{sa} \times L_{ra}}{G_{sc} \times L_{rc}} \times 100\% \quad (10)$$

$$IPAR = \frac{L_{mc}}{L_{mr}} \times 100\% \quad (11)$$

Onde:

L_{mc} = Comprimento médio do caule em mm

L_{mr} = Comprimento médio da raiz em mm

3.5.2 Vibrio fischeri

O ensaio de *Vibrio fischeri* Microtox® seguiu as diretrizes estabelecidas pela norma ABNT NBR 15411-3 para a bactéria liofilizada (ABNT, 2021a). *Vibrio fischeri*, uma bactéria gram-negativa, flagelada e não patogênica, é conhecida por prosperar em ambientes

marinhos subtropicais e temperados (ABBAS et al., 2018). Devido a essa característica, seu crescimento ótimo ocorre em temperaturas entre 24 e 28 °C, associadas a ambientes salinos (CHRISTENSEN; VISICK, 2020). A luminescência exibida por este organismo é diretamente proporcional à sua atividade metabólica, vinculada à respiração e à cadeia transportadora de elétrons, proporcionando uma maneira de analisar a toxicidade subletal de xenobióticos para essas bactérias (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006; ABBAS et al., 2018). Desta forma, através deste mecanismo, é possível observar possível toxicidade sub-letal às bactérias.

O ensaio foi conduzido para os aditivos dos tratamentos propostos (CaO₂ e *bio-char*), assim como para suas respectivas misturas com o solo antes da contaminação, e para o solo após o ensaio de biodegradação (C, CA, BC, Pe, BP).

O ensaio foi conduzido utilizando solo previamente seco em estufa a 40 °C por 72 horas, até que sua massa se mantivesse constante. Foram preparados elutriatos do solo contaminado antes e após o ensaio de biorremediação, em uma proporção de 1:4 por 24 horas com solução de NaCl 2% (ABNT, 2021b). Em seguida, o conjunto foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos, e as análises foram realizadas com o sobrenadante.

Foi utilizado o equipamento M500 analyzer. As amostras foram testadas em duplicatas para cada amostra, ou diluição. A luminescência foi medida após 5, 15 e 30 minutos de contato entre amostras e bactérias.

O cálculo de inibição de luminescência foi feito através das Equações 12 e 13 (MIRJANI; SOLEIMANI; SALARI, 2021).

$$KF = \frac{IC_t}{IC_0} \quad (12)$$

Onde:

KF = Fator de correção

IC_t = Luminescência no controle em determinado tempo

IC_0 = Luminescência inicial do controle

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{IT_t}{IT_0 \times KF} \times 100 \quad (13)$$

Onde:

IT_t = Luminescência da amostra em determinado tempo

IT_0 = Luminescência inicial da amostra

Para o cálculo do CE50 foi utilizado o pacote "ecotoxicology" do software Rstudio (GAMA, 2014; R Core Team, 2023).

3.5.3 *Artemia sp.*

O procedimento adotado seguiu as recomendações estipuladas pela ABNT NBR 16530, que regula ensaios de ecotoxicidade aguda com *Artemia sp.* (ABNT, 2021c). A *Artemia sp.* é um microcrustáceo planctônico do filo *Arthropoda* e classe *Brachiopoda*. Este ensaio consiste na exposição de náuplios de *Artemia* na fase II ou III a concentrações crescentes de uma substância, ou amostra ambiental específica para determinação qualitativa ou quantitativa de efeito tóxico.

As amostras obtidas para o solo pós-tratamento foram recolhidas após secagem e coletadas alíquotas iguais de cada reator e homogeneizadas. Essas amostras compostas foram utilizadas para a produção do elutriato (ABNT, 2021b).

As amostras de solo, tanto antes quanto após o tratamento, foram mantidas por 24 horas em agitação em erlenmeyers de 250 mL a 120 rpm com água reconstituída na proporção de 1:4 massa:massa, visando à produção do elutriato do solo (ABNT, 2021b; ABNT, 2021c). Posteriormente, o conjunto solo + água de cultivo foi transferido para tubos falcon de plástico e centrifugado a 2500 rpm. O sobrenadante resultante foi removido e utilizado para os ensaios, sendo os elutrios armazenados em geladeira e utilizados em menos de 24 horas.

À água salina artificial, foram adicionados 0,30 g/L de cistos de *Artemia sp.*, contidos em um frasco de eclosão, empregando um funil de separação como recipiente. Este frasco foi incubado a 23 °C no escuro por 24 horas. Ao término desse período, uma fonte de luz foi incidida para atrair os náuplios na fase I para o fundo do funil de separação. A válvula foi aberta e as artêmias posicionadas em béquers. Os organismos foram mantidos em um béquer na mesma temperatura e no escuro. O ensaio foi realizado 24 horas após esse procedimento, utilizando os náuplios na fase II.

Os ensaios foram conduzidos em béqueres de 25 mL, utilizando 10 mL de amostra e 10 organismos por béquer em quadruplicata para cada amostra. Os frascos foram mantidos a 23 °C sem fotoperíodo por 48 horas em uma incubadora. Foram realizadas duas medições de imobilidade dos organismos, uma após 24h e outra após 48h do início do ensaio. Foi realizado teste qualitativo, sem diluições do elutriato. Foi feito então o cálculo da porcentagem de mortalidade como expresso na Equação 14 (MANFRA et al., 2012).

$$Mortalidade = \frac{M_t}{N} \times 100\% \quad (14)$$

Onde:

M_t = Número de organismos mortos

N = Número de organismos expostos

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos resíduos e ao teste de Bartlett para testar a homogeneidade das variâncias. Quando as premissas de normalidade eram cumpridas, foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de post-hoc de Tukey para identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,05$). Quando as premissas não eram cumpridas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Wilcoxon.

Foi realizada a análise de componentes principais (PCA) para agrupar e classificar os tratamentos em função dos parâmetros físico-químicos, efeitos ecotoxicológicos e remoção de HTPs no último dia do ensaio, e para agrupar os tratamentos em função dos parâmetros físico-químicos ao longo de todo o ensaio. Previamente os dados foram normalizados, subtraindo-os da média e dividindo pelo desvio-padrão. A fim de verificar a correlação entre variáveis, foi realizada a correlação de Kendall entre os parâmetros físico-químicos, respostas ecotoxicológicas, e remoção de HTPs.

Todas as análises foram realizadas no programa R v. 4.3.2 pela interface do RStudio (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do solo

Os índices geotécnicos do solo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros geotécnicos do solo

Parâmetro	Resultado
Areia (%)	52
Silte (%)	22
Argila (%)	26
Densidade real dos grãos (g cm^{-3})	2,67
Limite de Liquidez (%)	42,7
Limite de Plasticidade (%)	28
Índice de Plasticidade (%)	14,7
Densidade seca máxima (g cm^{-3})	1,68
Umidade ótima (%)	18

O solo é categorizado no Sistema Unificado de Classificação de Solos (SUCS) como uma areia argilosa (SC). Com base nos valores do Limite de Liquidez e do Índice de Plasticidade, o solo exibe características típicas de solos residuais de arenito, mais especificamente, arenosos finos (PINTO, 2006). O índice de atividade da argila é aproximadamente 0,47, indicando que a argila é classificada como inativa.

Machado et al. (2019) estabeleceram faixas ideais para propriedades do solo, visando sua aplicação como barreira contra contaminantes orgânicos. Essas faixas foram determinadas com base em testes realizados em campo e em laboratório.

O solo proveniente da bacia de contenção atende aos critérios estabelecidos pelos pesquisadores nos experimentos de campo, com a única exceção relacionada à quantidade de finos (silte + argila). Em termos gerais, o solo demonstra características propícias para sua aplicação atual.

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros físico-químicos da suspensão de solo.

Tabela 3 – Características físico-químicas da suspensão do solo coletado em bacia de contenção

Parâmetro	Resultado
pH	4,5 ± 0,1
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	38,6 ± 1,9
Cloreto (mg L^{-1})	4,0 ± 2,2
Nitrogênio amoniacal (g L^{-1})	0,31 ± 0,09
Carbono orgânico total (mg g^{-1})	0,28 ± 0,04
Matéria orgânica (%)	3,9 ± 1,5

O solo coletado apresenta acidez, o que está em conformidade com a característica predominante nos solos brasileiros (NOLLA; ANGHINONI, 2004). O pH está ligeiramente abaixo da média encontrada na região sudeste (pH = 5,4) (MENDES et al., 2022). Essa condição exerce um impacto significativo na atividade microbiana, uma vez que os microrganismos geralmente preferem um pH próximo da neutralidade, situado entre 5,5 e 8,5 (ALVAREZ; ILLMAN, 2005).

O solo possui uma quantidade média de matéria orgânica (2-4%) (BIERNBAUM, 2012). Não foram identificados indícios de contaminação no solo a partir dos parâmetros físico-químicos analisados.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados da análise de fertilidade do solo juntamente as classes de interpretação para solos com teor médio de argilas (15-35%) obtidas em Brasil e CRAVO (2007).

Tabela 4 – Resultados da análise de fertilidade do solo.

Parâmetro	Resultado	Faixa de interpretação
Fósforo total (mg dm^{-3})	1	≤ 8
Potássio (mg dm^{-3})	1	≤ 40
Sódio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,04	-
Cálcio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,5	Soma Ca + Mg $\leq 2,0$
Magnésio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,2	$\leq 0,5$
CTC (cmol_c)	4,37	-
Nitrogênio (mg g^{-1})	1,35	-

O solo demonstra uma baixa disponibilidade de fósforo, magnésio, cálcio e potássio, o que o torna inadequado para práticas agrícolas (BRASIL; CRAVO, 2007). A capacidade de troca catiônica (CTC) está na faixa típica de solos tropicais com presença de óxidos de ferro e alumínio (RONQUIM, 2010). Era esperado esse resultado, pois se trata de solo do horizonte B.

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados de metais no solo.

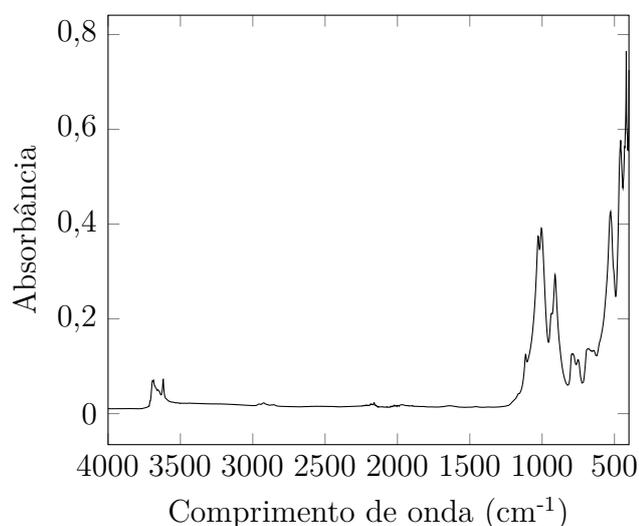
Tabela 5 – Parâmetros e métodos para análise de metais no solo.

Parâmetro	Resultado
Alumínio (mg kg^{-1})	237
Cádmio (mg kg^{-1})	10
Zinco (mg kg^{-1})	0,92
Chumbo (mg kg^{-1})	0,12
Cobre (mg kg^{-1})	0,09
Ferro (mg kg^{-1})	3,54
Manganês (mg kg^{-1})	4,43
Níquel (mg kg^{-1})	nd
Cobalto (mg kg^{-1})	nd
Cromo (mg kg^{-1})	nd

Os valores mais proeminentes foram de cádmio, alumínio, ferro e manganês, os quais podem ser encontrados em concentrações mais altas naturalmente, não necessariamente devido à contaminação antropogênica (CARVALHO; BÔA; FADIGAS, 2013). O solo, portanto, não apresenta contaminação por metais, estando os valores encontrados abaixo dos limites estabelecidos pela Resolução Conama 420 (CONAMA, 2009).

O espectro obtido por FTIR do solo está apresentado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Espectro de FTIR do solo utilizado.



A análise espectral do solo revela um pico em $526,57 \text{ cm}^{-1}$ potencialmente corres-

pondente à ligação Al(VI)–O–Si (TIWARI; SATYAM, 2020). Ademais, o pico em 910,4 cm^{-1} pode ser referente à ligação Fe–O presente em óxidos de ferro e picos na região de 1220 cm^{-1} são associados à presença de quartzo no solo (MENDES et al., 2022). Esses resultados demonstram coerência com a análise de metais no solo.

4.2 Caracterização do *biochar*

As características físico-químicas do *biochar* estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características físico-químicas do *biochar* de biomassa de eucalipto

Parâmetro	Resultado
pH	7,17 ± 0,06
Densidade (g cm^{-3})	0,28 ± 0,00
Umidade (%)	5,92 ± 0,21
CTC (cmolc)	25
Teor de Carbono (%)	47,4
Teor de Nitrogênio (%)	1,23 ± 0,02
Fósforo total (%)	0,14 ± 0,01
Potássio Total (%)	0,84 ± 0,03
Cálcio total (%)	3,59 ± 0,03
Relação C/N	37,67 ± 0,58

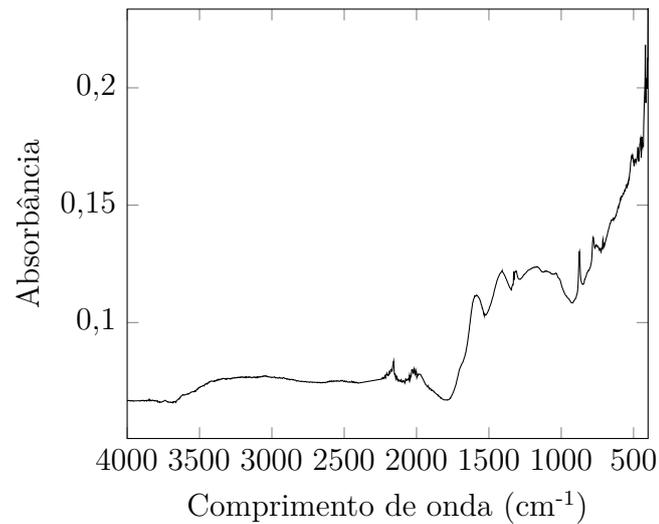
O *biochar* de biomassa de eucalipto revela um pH próximo da neutralidade, situando-se dentro da faixa típica de biocarvões derivados de biomassa vegetal (5 - 7,5) (MISHRA et al., 2023). Em condições semelhantes às empregadas neste estudo, o biocarvão de eucalipto apresentou um pH de 6,10 (MOTA et al., 2021).

Observa-se, assim, que o *biochar* exibe um pH propício para o crescimento microbiano. Além disso, o biocarvão demonstra uma alta capacidade de troca catiônica (25 cmol kg^{-1}) característica intrínseca desse material.

A baixa quantidade de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, também está em conformidade com o que foi encontrado em outros estudos com *biochar* de *Eucalyptus sp.* (BUTPHU et al., 2020; KANOOU; ALLAIRE; MUNSON, 2018; MAZETTE et al., 2020).

A análise de FTIR resultou na plotagem do espectro por FTIR representado no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Espectro de FTIR do *biochar* de eucalipto.

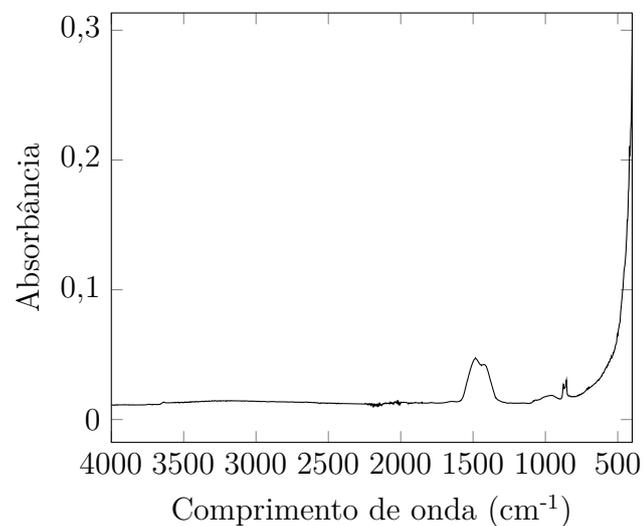


Ao examinar o espectro gerado, foram identificados picos nas bandas de 1583 e 1310 cm^{-1} , atribuíveis à ligação dupla carbono-carbono e às ligações acila/fenila carbonila CO^- , respectivamente (SWAGATHNATH et al., 2019). Além disso, o pico observado em 2160 cm^{-1} pode ser associado à vibração da ligação C–O em moléculas de dióxido de carbono (SUN; WAN; LUO, 2013).

4.3 Caracterização do peróxido de cálcio

O espectro por FTIR produzido para o CaO_2 está apresentado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Espectro de FTIR do CaO_2 .



O espectro do peróxido de cálcio se apresenta praticamente sem picos, com exceção de um pico proeminente na faixa de 1483 cm^{-1} , o qual é atribuído à vibração do grupo funcional O–Ca–O (LI et al., 2022). Esta característica sugere uma estrutura molecular relativamente estável, com a vibração indicando a presença distintiva dessa ligação específica no peróxido de cálcio.

4.4 Ensaio de biodegradação

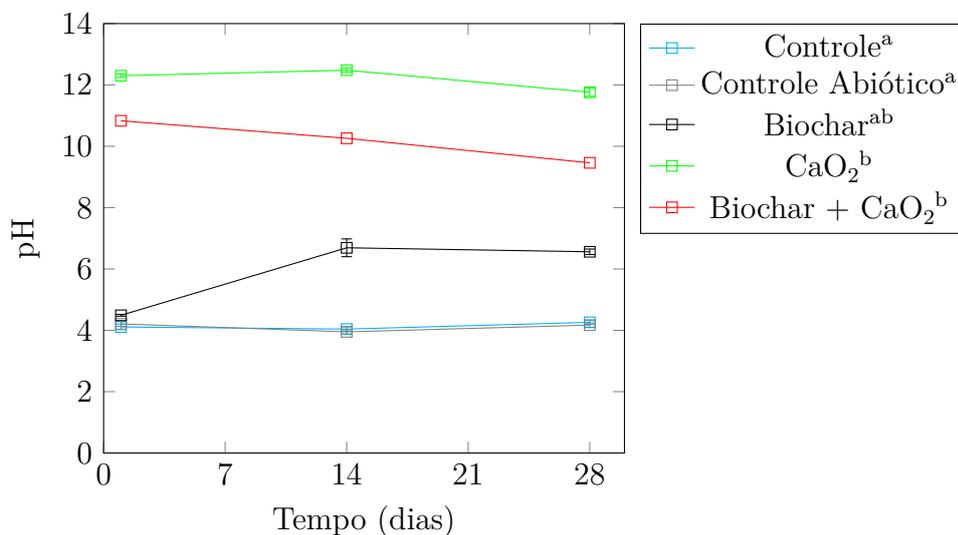
4.4.1 Análises físico-químicas

As coletas dos sobrenadantes foram realizadas 1, 14 e 28 dias após o início do ensaio. Houve um erro durante a coleta do sobrenadante no 1º dia, sendo perdidas uma quadruplicata do controle e outra do controle abiótico. As demais amostras permaneceram em quadruplicata, assim como as coletas realizadas nos dias posteriores.

Assim, nos gráficos estão dispostas as médias para cada dia de coleta sendo $n = 3$ para o controle e o controle abiótico no dia 1 e $n = 4$ nos outros dias. As barras de erro representam os desvios padrões.

No Gráfico 4, estão apresentados os resultados de pH ao longo do ensaio.

Gráfico 4 – pH do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.



Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Foi possível observar uma manutenção quase constante tanto do pH no controle (—□—) quanto no controle abiótico (—□—), mantendo-se próximo ao valor de 4, correspon-

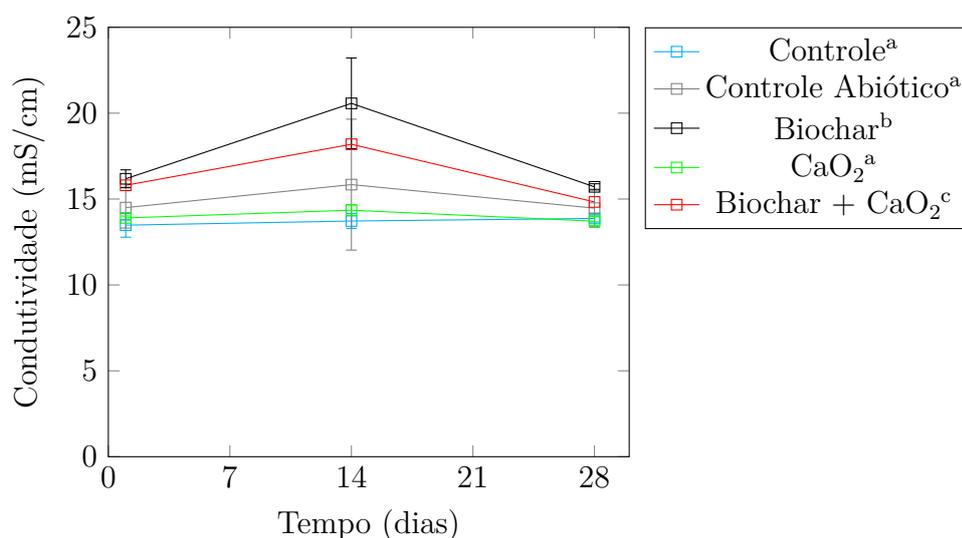
dente à acidez do solo original. No biorreator contendo apenas *biochar* (linha —□—), houve um incremento no pH observado a partir do 14º dia de ensaio. Esse aumento pode ser atribuído à presença de grupos funcionais na superfície do *biochar*, os quais se ligam aos íons H^+ presentes na água presente no solo (DIKE et al., 2021). Esse comportamento ressalta a influência do *biochar* na modificação das condições ácidas do solo.

Os tratamentos com a presença do CaO_2 (Pe e BP) foram responsáveis por um aumento significativo do pH em todos os reatores. Esse comportamento já foi reportado na literatura, indicando que a presença de peróxido de cálcio tende a elevar o pH para valores entre 10 e 12, devido à formação do $Ca(OH)_2$ (WAITE; BONNER; AUTENRIETH, 1999). Contudo, é importante notar que a capacidade tampão do solo pode atenuar esse efeito (LU; ZHANG; XUE, 2017).

Paralelamente, é importante considerar que a proporção de 1:4 de solo para solução pode ter minimizado a possível influência do solo no controle do pH. Em faixas de pH entre 10 e 12, o peróxido pode liberar oxigênio por até 6 meses (CETESB, 2021). Portanto, nas condições dos biorreatores, o processo de liberação de oxigênio pode ter sido interrompido antes de ser totalmente esgotado, uma vez que o ensaio foi encerrado após 30 dias. Esse aspecto pode ter implicado na não completa ação do CaO_2 na degradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

No Gráfico 5, estão apresentados os resultados de CE ao longo do ensaio.

Gráfico 5 – Condutividade elétrica do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.



Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

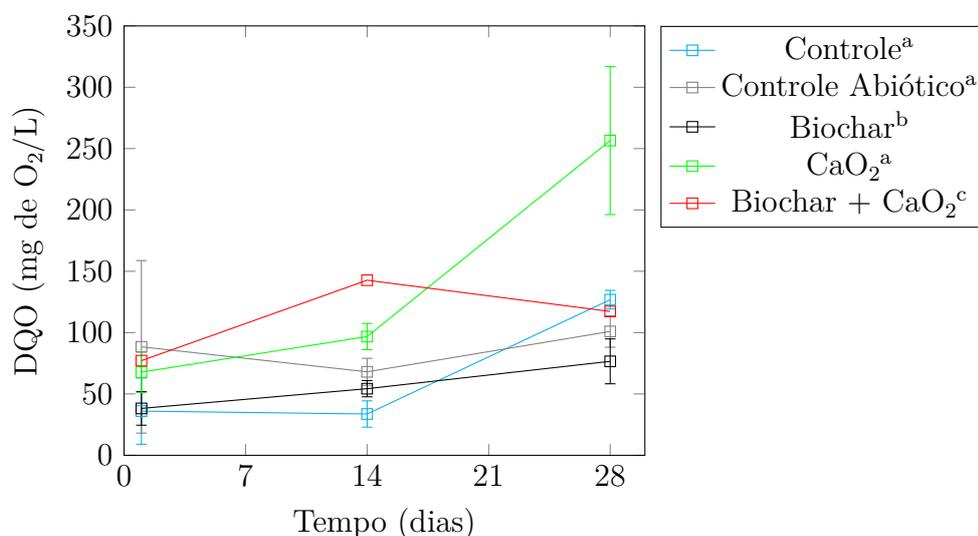
Era esperada CE significativa, devido à adição de NaCl nos biorreatores. Esses

resultados variaram entre 13,48 e 20,57 mS/cm. É notável a pouca variação entre o início do ensaio e o seu término para todos os tratamentos; no entanto, destaca-se o incremento na condutividade no dia 14, especialmente nos tratamentos com *biochar* (20,57 mS/cm).

Esse efeito também foi observado em outros solos com *biochar* (HUSSAIN et al., 2018). A elevação na condutividade está relacionada à capacidade de troca catiônica e à presença de nutrientes no *biochar* (CHANDRA; BHATTACHARYA, 2019).

No Gráfico 6, estão apresentados os resultados de DQO ao longo do ensaio.

Gráfico 6 – DQO do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.



Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

O aumento da Demanda Química de Oxigênio (DQO) ao longo do ensaio foi observado de forma consistente nos tratamentos C, BC e Pe, quando comparado ao início do tratamento. Com destaque para o tratamento com peróxido que atingiu valores de $256,55 \pm 60,33$ mg de O₂/L. Como referencial de comparação, a NOP Inea 45 estabelece limites de lançamento de efluentes como 180 mg de O₂/L (RIO DE JANEIRO, 2021).

Possivelmente, essa DQO observada pode ter ocorrido pela formação de H₂O₂, e sua conhecida interferência na determinação da DQO (GROELE; FOSTER, 2019; KANG; CHO; HWANG, 1999).

Foram adicionados 500 mg de CaO₂ (4,86 mmol) nos tratamentos. Ao reagir com a água, conforme indicado na Equação 1, ocorre a produção máxima de de 160 mg de H₂O₂ (VOLNOV; PETROCELLI, 1966), resultando em uma concentração de 826,55 mg/L desse composto.

É possível calcular a DQO teórica com a adição de H₂O₂ utilizando a Equação 15

(KANG; CHO; HWANG, 1999).

$$DQO_{H_2O_2}(mg/L) = 0,4706[H_2O_2] - 4,06 \times 10^{-5}[H_2O_2]^2 \quad (15)$$

Onde:

$[H_2O_2]$ = Concentração de H_2O_2 em mg/L

Desta forma, obtém-se o valor de 361,24 mg de O_2 /L. Este valor pode variar em torno de 16 %, de acordo com as características da amostra (LEE et al., 2011). Conclui-se, portanto, que o elevado valor de DQO encontrado no biorreator com tratamento com peróxido de cálcio pode ser resultado da oxidação provocada pelo peróxido de hidrogênio. Esta estimativa, porém, pode estar superestimada, pois desconsidera outros mecanismos de reação do CaO_2 como apresentados nas Equações 3 e 4.

Em contrapartida, resultados descrevendo o incremento da DQO foram identificados em estudos abordando a degradação de hidrocarbonetos em reatores (FIRMINO et al., 2015; KACHIENG'A; MOMBA, 2015; KACHIENG'A; MOMBA, 2017).

Esse fenômeno pode ser atribuído à possibilidade de que altas concentrações de hidrocarbonetos tenham estimulado a comunidade microbiana a decompor moléculas de hidrocarbonetos maiores em moléculas menores ou matéria orgânica coloidal biodegradável, resultando no aumento da disponibilidade de DQO na solução (KACHIENG'A; MOMBA, 2017).

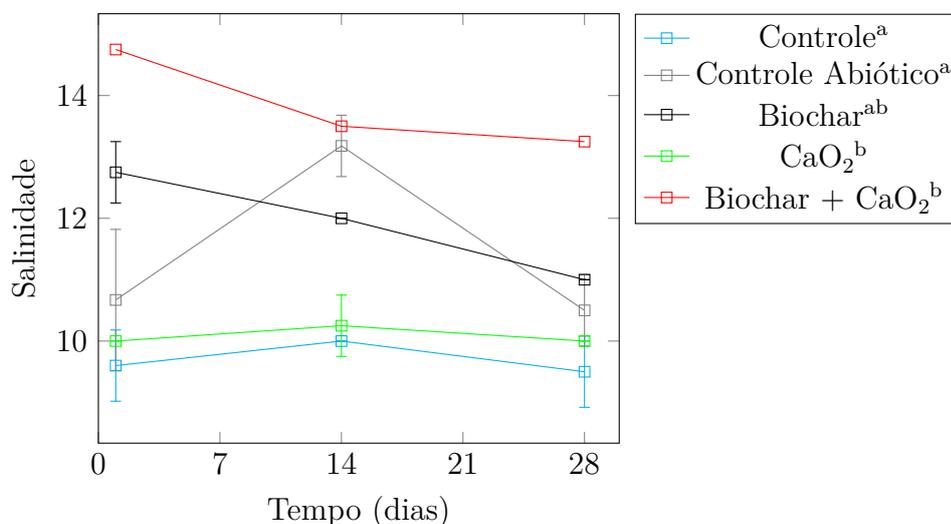
A quebra das moléculas de hidrocarbonetos com maior massa molecular pode ter sido realizada pela oxidação química, especialmente no tratamento com peróxido. O CaO_2 já foi avaliado como fonte de radical hidroxila na oxidação química de compostos orgânicos (KOZAK; WŁODARCZYK-MAKUŁA, 2018; NORTHUP; CASSIDY, 2008).

Nos dois controles, houve uma redução seguida de um aumento na DQO no reator. No entanto, no biorreator C, esse crescimento foi mais proeminente. A autoclavagem do solo nesse controle pode ter impedido a atuação dos microrganismos, influenciando o padrão observado na DQO.

A ação dos microrganismos é crucial na disponibilização dos hidrocarbonetos presentes no solo (CHEN; LIU; WHANG, 2019). O padrão de comportamento da DQO observado no controle assemelha-se aos resultados obtidos por McInnis (2003), que, ao investigar a degradação de borra de petróleo em um reator com bioaumento, identificou uma diminuição na DQO nos primeiros 10 dias, seguida por um aumento entre o 10º e o 24º dia de tratamento, tanto no grupo com bioaumento quanto no grupo sem bioaumento.

No Gráfico 7, estão apresentados os resultados de salinidade ao longo do ensaio.

Gráfico 7 – Salinidade do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.



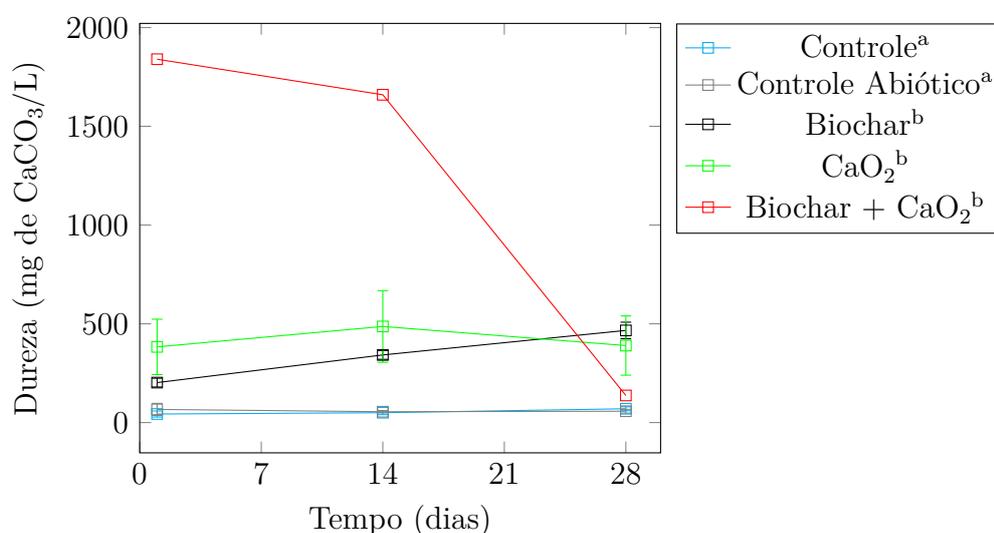
Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

A salinidade nos biorreatores C e Pe demonstrou certa estabilidade, com variações mínimas ao longo de todo o tratamento. O comportamento da salinidade no biorreator CA, embora inesperado, mostrou consistência entre as réplicas.

Além disso, observou-se uma redução na salinidade em todos os biorreatores que continham *biochar* (BC e BP), apesar de começarem em níveis mais elevados em comparação com outros tratamentos. Essa redução pode ser atribuída ao potencial do *biochar* em adsorver íons presentes na suspensão do biorreator. De fato, o *biochar* já demonstrou capacidade de reduzir a condutividade elétrica em soluções de baixa salinidade (ROCHA, 2021). Esse mecanismo, no entanto, contrasta com o observado para a CE nos biorreatores (Gráfico 5), onde houve aumento e posterior estabilização desse parâmetro.

No Gráfico 8, estão apresentados os resultados de dureza ao longo do ensaio.

Gráfico 8 – Dureza do sobrenadante do biorreator ao longo do tempo.



Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

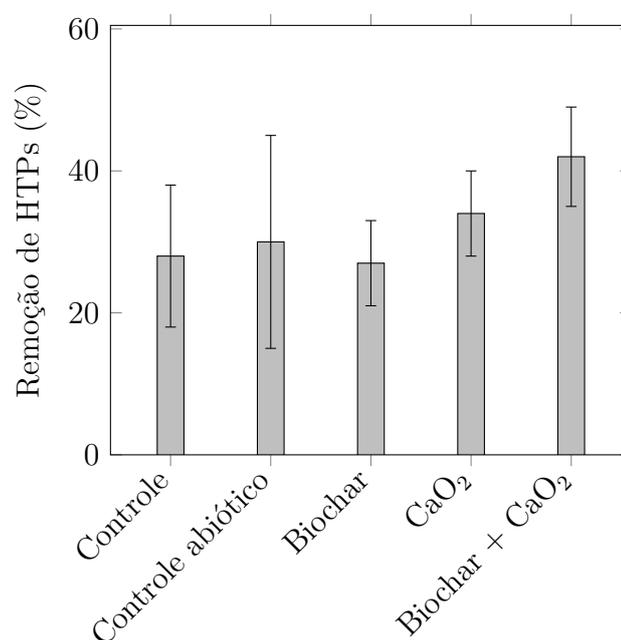
Foi observada diminuta dureza nos controles, com pouca variação durante o tratamento. A dureza em águas naturais é causada primariamente pela presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} (SAWYER; MCCARTY; PARKIN, 2003). Portanto, pela própria composição do CaO_2 , era esperado que a dureza nos biorreatores com sua presença fossem altas. Essa suspeita foi confirmada com a dureza no biorreator Pe na ordem de 400 mg de $CaCO_3/L$, sendo possível classificar a água como muito dura.

A adição de *biochar* resultou em um aumento expressivo na dureza do sobrenadante nos biorreatores. Essa ocorrência pode estar associada à presença de manganês em concentrações elevadas no *biochar*, conforme indicado na Tabela 1.

A dureza observada nos biorreatores com *biochar* alcançando valores próximos a 2.000 mg de $CaCO_3/L$ nos biorreatores com CaO_2 . Curiosamente, a combinação de *biochar* e CaO_2 pareceu ter um efeito sinérgico no aumento da dureza durante o tratamento.

A concentração inicial de hidrocarbonetos totais de petróleo foi de 11.307,4 mg/kg. A remoção média por tratamento está apresentada no Gráfico 9, onde as barras retratam os desvios padrões.

Gráfico 9 – Remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo.



O valor apresentado é da média dos resultados dos biorreatores e as barras os desvios padrões. Resultados discrepantes foram removidos para controle, controle abiótico e peróxido, resultando em $n=3$. A distribuição de valores de concentração final de HTPs cumpriu as premissas de normalidade, e sendo assim, foi realizada a ANOVA. Não foi observada diferença significativa entre os dados ($p>0,05$).

Não há valores orientadores para hidrocarbonetos totais de petróleo na norma Conama 420 (CONAMA, 2009). Destaca-se, portanto, a importância de ensaios ecotoxicológicos para avaliar a eficiência da remediação.

É notável a redução obtida no tratamento BP, que foi de $42 \pm 7\%$, acima do obtido no controle, que foi de $28 \pm 10\%$.

Foi observada degradação na seguinte ordem de tratamento $BP > Pe > CA > C > BC$. Foi notado um desvio padrão mais proeminente nos tratamentos de controle e controle abiótico, especialmente neste último. A origem dessa discrepância nos dados, que não foi observada nos outros tratamentos, não pôde ser determinada. Surpreendentemente, o tratamento com *biochar* exibiu uma remoção comparável à dos controles.

Em estudo anterior, Eziuzor e Okpokwasili (2013) alcançou 55,31% e 53,21% de remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo após 30 dias, utilizando fertilizante NPK e controle, respectivamente, em um biorreator de bancada.

Existem poucos estudos que investigam a degradação de compostos orgânicos em fase semi-sólida com *biochar*. Em uma análise conduzida por (OLESZCZUK; KOŁTOWSKI, 2017), que examinou a capacidade de *biochar* e nanoferro para degradar HPAs

em dois tipos de solo, observou-se que, para o solo arenoso e ácido, não houve degradação em nenhum dos tratamentos. Pelo contrário, a quantidade de HPAs aumentou ao longo dos 30 dias do experimento. Já o outro solo, com mais presença de silte e pH próximo da neutralidade, atingiu cerca de 40% de degradação de HPAs nos tratamentos com *biochar* e *biochar* e nanoferro.

A comparação com estudos em fase semi-sólida envolvendo a adição de *biochar* é limitada; no entanto, vários pesquisadores têm explorado a capacidade do *biochar* em degradar hidrocarbonetos em microcosmos. Chaudhary et al. (2021) registraram uma degradação de aproximadamente 63% ao adicionar *biochar* de bambu ao solo, superando a degradação com a adição do oxidante químico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$). No entanto, essa taxa foi inferior àquela alcançada com a adição de nutrientes (N e P).

Em um experimento de microcosmo realizado por Guirado et al. (2021), o *biochar* teve pouco impacto na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em solo contaminado por diesel após 84 dias de tratamento. Mesmo com a adição de bactérias degradadoras de diesel, houve pouca diferença em relação à atenuação natural ao final do ensaio, registrando 47,09% e 41,03%, respectivamente, embora uma análise aos 42 dias tenha indicado um aumento na degradação com o tratamento.

Kong et al. (2021) investigaram a degradação de HPAs em três solos distintos contaminados por diesel mediante a introdução de *biochar*. Os resultados de degradação foram fortemente influenciados pelo tipo de solo utilizado. Os pesquisadores implementaram tratamentos com *biochar* e NaN_3 para examinar o efeito da remoção de HPAs com essa substância, que atua inibindo a atividade microbiana. Em dois dos solos testados, os ensaios com *biochar* apresentaram resultados comparáveis aos tratamentos com BC e NaN_3 . Isso sugere que parte da remoção está associada à imobilização dos HPAs no biocarvão. Por outro lado, em um terceiro solo, a remoção foi significativamente realçada, atingindo 86%, em comparação com o controle que obteve 63%, ao final de 84 dias.

Observou-se que o coeficiente de primeira ordem seguiu a seguinte ordem: $\text{BP} > \text{Pe} > \text{CA} > \text{C} > \text{BC}$, com destaque especialmente para o BP, apresentando valores de 0,0195, 0,146, 0,0128, 0,0118 e 0,0114, respectivamente. Um estudo conduzido por Chaudhary et al. (2021) obtiveram um valor de $k = 0,016284$ com *biochar* puro de bambu, inferior ao valor alcançado no tratamento BP.

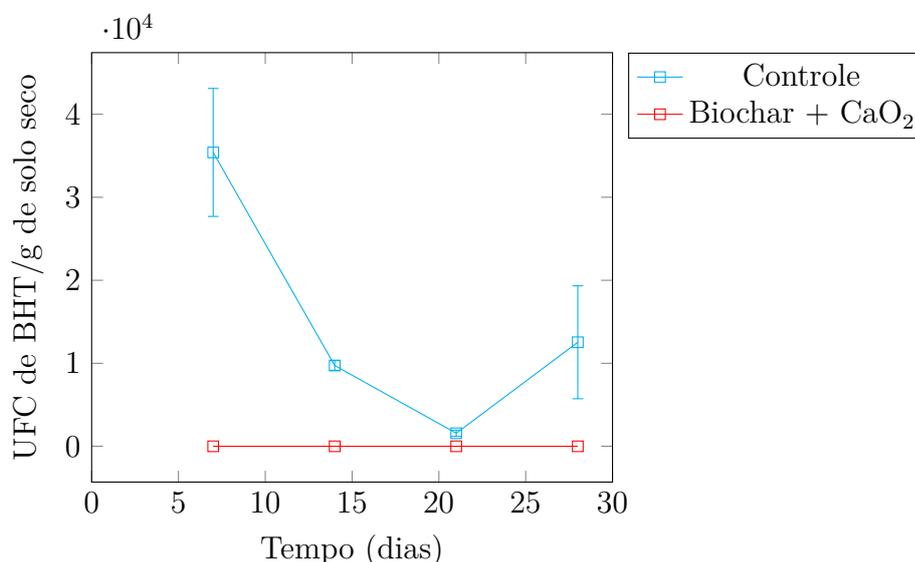
É relevante ressaltar, no entanto, que seriam necessárias avaliações intermediárias nas concentrações de HTPs para confirmar se a degradação de fato seguiu a cinética de primeira ordem. Os resultados apresentados representam estimativas, não confirmações definitivas.

4.4.2 Análises microbiológicas

4.4.2.1 Bactérias heterotróficas totais

Durante o ensaio de bactérias heterotróficas totais, houve a contaminação das placas montadas no primeiro dia de ensaio, não sendo possível realizar a contagem de colônias. Além disso, foi observada ausência de crescimento de microrganismos em todas as placas obtidas nos biorreatores com a presença de *biochar* e peróxido. No entanto, o mesmo não ocorreu para o controle. O resultado ao longo do tempo está apresentado no Gráfico 10.

Gráfico 10 – Bactérias heterotróficas totais nos biorreatores.



A adição do peróxido de cálcio demonstrou efeitos indesejáveis na microbiota dos biorreatores. Apesar do potencial demonstrado pelo *biochar* de incrementar o desenvolvimento dos microrganismos, sua presença não reduziu o efeito inibitório causado pelo peróxido. O resultado do *biochar* chegou a atingir $3,6 \pm 0,1 \times 10^6$ UFC/g, muito acima dos valores obtidos tanto no controle, como, conseqüentemente, no tratamento com a adição de peróxido. Este resultado, no entanto, se contrasta com a degradação de HTPs obtida (Gráfico 9).

Diversos outros pesquisadores observaram incremento da comunidade microbiana no solo com a presença de *biochar* (ZHEN et al., 2019; KONG et al., 2018; BARATI et al., 2017; HAN et al., 2016; GALITSKAYA; AKHMETZYZANOVA; SELIVANOVSKAYA, 2016). O crescimento microbiano está ligado à presença de macronutrientes; portanto, a adição de carbono lábil, como o presente no *biochar*, permite que haja o crescimento da comunidade microbiana (BROWN et al., 2022).

Nesse cenário, Stefaniuk, Oleszczuk e Różyło (2017), conduzindo um experimento

de campo para avaliar a degradação de HPAs em solo contaminado e incorporando *biochar* produzido a partir de biomassa de salgueiro e lodo de tratamento de esgoto, observaram que não ocorreu uma redução significativa dos HPAs no solo durante os primeiros 12 meses do experimento. Os autores sugerem que a introdução de *biochar* no solo provavelmente afetou o crescimento dos microrganismos, mas esse efeito não se traduziu na degradação dos HPAs. Eles ressaltam que a adição de novas fontes de matéria orgânica pode retardar a degradação de HPAs, uma vez que os microrganismos tendem a consumir a matéria orgânica mais prontamente disponível antes de abordar os HPAs. Entretanto, a longo prazo, após esse período inicial, a degradação foi superior aos tratamentos sem *biochar*. A capacidade de adsorção dos hidrocarbonetos ao *biochar* também pode ter afetado a biodisponibilidade desse contaminante, reduzindo sua degradação (QIN; GONG; FAN, 2013; CIPULLO et al., 2019).

Parte dos hidrocarbonetos pode ainda estar imobilizada na matéria orgânica do solo e do *biochar*, reduzindo sua degradação durante o período do ensaio; no entanto, a longo prazo, esses hidrocarbonetos podem se tornar acessíveis ao consumo pelos microrganismos (CHEN; LIU; WHANG, 2019). Uma alternativa para reduzir esse efeito seria utilizar uma proporção menor de biocarvão. Omoni et al. (2020) aceleraram a mineralização do fenantreno com concentrações menores de biocarvão e com microrganismos imobilizados em *biochar*, quando testadas proporções entre 0,01 e 1%.

O CaO_2 já demonstrou capacidade de desinfecção, ao remover grande parte dos microrganismos em águas superficiais (LU; ZHANG; XUE, 2017). Isso ocorre pela liberação do radical hidroxila, que causa a degradação da membrana dos microrganismos, levando à sua ruptura. Este resultado corrobora para a interpretação de que os resultados de maior degradação de HTPs nos tratamentos com presença de CaO_2 ocorreu por oxidação química.

Observou-se ainda que a adição do biocarvão pode ter promovido esse efeito. Li, Xu e Yang (2022) observaram que a adição de biocarvão de serragem incrementou a eficiência na degradação de HTPs quando comparado com tratamento somente com H_2O_2 , de 15,54 para 21,52 %. Isso pode ter ocorrido pela presença do ferro no biocarvão, que pode ser liberado na água quando em solução aquosa (FENG et al., 2021).

O solo também pode ser fonte do ferro e atuar em processo Fenton, capaz de degradar contaminantes orgânicos (ACIOLI, 2012; LOCATELLI et al., 2008; GOU et al., 2022; JEREZ et al., 2022). Nesse contexto, a utilização do biocarvão de eucalipto juntamente com o peróxido de cálcio pode ter produzido um processo de oxidação química, que reduziu a presença dos hidrocarbonetos no solo, no entanto, afetando de maneira importante a comunidade microbiana autóctone.

Liao et al. (2019) testaram a degradação de HPAs em solo e o efeito do processo Fenton e o oxidante permanganato de potássio KMnO_4 em fase semi-sólida à comunidade microbiana e notaram efeito correlato, com a redução a zero dos microrganismos. No

entanto, houve uma pequena recuperação 7 dias após o início do ensaio, que foi encerrado com 15 dias. Há, portanto, a possibilidade de regeneração dessa comunidade microbiana a longo prazo.

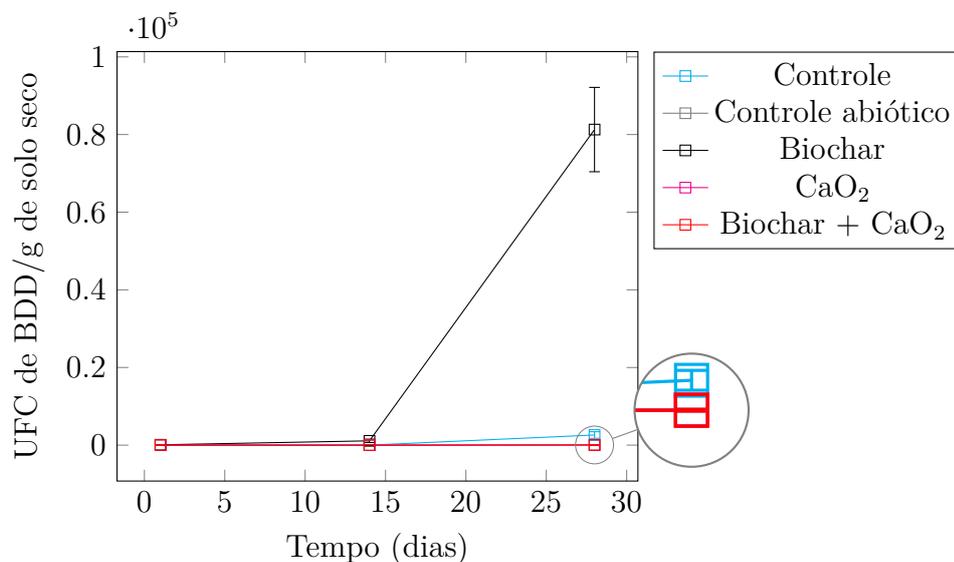
Em outra pesquisa, Hung et al. (2022) obtiveram 71% de degradação de 4-n-Nonilfenol no sedimento com o uso de *biochar* e peróxido de cálcio, após 12 horas de agitação, no entanto, esse processo foi atribuído à presença de espécies reativas de oxigênio. A introdução de peróxido de cálcio reduziu a diversidade de microrganismos betônicos no sedimento, mesmo com a adição de biochar.

O *biochar* possui capacidade de fornecer abrigo e nutrientes para as bactérias autóctones, aprimorando sua atuação (ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2019). Essa capacidade, no entanto, não foi capaz de atenuar o efeito do peróxido sobre as bactérias heterotróficas. Uma alternativa seria a imobilização de microrganismos na superfície do *biochar* (ZHANG; ZHANG; ZHANG, 2019; GALITSKAYA; AKHMETZYANOVA; SELIVANOVSKAYA, 2016). Essa alternativa, no entanto, deve ser analisada com cuidado quando aplicada no campo, pois a introdução de microrganismos exógenos no solo pode levar a efeitos ecológicos prejudiciais (WANG et al., 2022).

4.4.2.2 Bactérias degradadoras de diesel

Foram realizadas as contagens de bactérias degradadoras de diesel em três momentos durante o tratamento com biorreatores, 1, 14 e 28 dias. No Gráfico 11, estão apresentados os resultados ao longo do tempo.

Gráfico 11 – Bactérias degradadoras de diesel nos biorreatores



É possível observar que o traçado dos gráficos de controle abiótico (—□) e do peróxido de cálcio (—■) ficaram sobrepostos pelo do tratamento com *biochar* e peróxido (—□), já que, durante todo o período do ensaio, esses valores foram de $53,3 \pm 60,2$, 40 ± 62 e $33,3 \pm 64,1$ UFC de BDD/g de solo, com 28 dias, por exemplo. Destaca-se ainda os resultados com baixa precisão dado o número diminuto de colônias contadas, resultando em desvio padrão superior ao número de colônias.

Foi possível observar crescimento de bactérias degradadoras de diesel no controle abiótico bem abaixo do controle. Desta forma, há um indicativo que a autoclavagem do solo resultou em um efeito desejado de redução de microrganismos. O peróxido de cálcio, assim como ocorreu para as bactérias heterotróficas totais, apresentou efeito deletério aos microrganismos do solo, sendo possível observar que os tratamentos com a presença dessa substância foram afetados.

O incremento do pH nos reatores pode ter afetado a comunidade microbiana de maneira significativa. Mastorgio et al. (2019) notaram que materiais contendo CaO_2 na composição influenciaram a comunidade microbiana apenas quando nutrientes foram adicionados. No entanto, os autores usaram solução tampão, reduzindo a variação do pH.

Esses resultados corroboram para a possibilidade dos hidrocarbonetos do diesel presentes no solo terem sido degradados por oxidação química nos tratamentos com a presença de peróxido de cálcio.

O constante incremento no número de bactérias degradadoras de diesel contrasta com resultados na literatura, onde há o aumento e posterior redução atribuída ao rápido consumo dos hidrocarbonetos de petróleo pelos microrganismos (MADDELA et al., 2016).

Um indicativo que pode explicar a diferença observada no presente trabalho é o aumento da DQO no sobrenadante dos biorreatores. A matéria orgânica quantificada na forma de DQO não necessariamente está disponível para o consumo dos microrganismos, mas a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos de petróleo está conectada à sua solubilização.

É sabido que menos de 1% dos microrganismos presentes em amostras ambientais são cultiváveis (CHIKERE; OKPOKWASILI; CHIKERE, 2011). A contagem de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos no solo pode ser limitada pela baixa culturabilidade dos microrganismos (THURMANN et al., 1999).

A própria toxicidade do diesel pode limitar o crescimento microbiano em placas (RANDALL; HEMMINGSEN, 1994). Dessa forma, era esperado um crescimento modesto, ou até mesmo inexistente, das bactérias. Por essa razão, não foram realizadas diluições antes do plaqueamento.

Portanto, optou-se por incubar as bactérias por um longo período (14 dias). Esse procedimento dificultou a quantificação de bactérias no último dia de ensaio para o tratamento com *biochar*, sendo necessária uma estimativa. No entanto, foi possível avaliar qualitativamente de maneira conclusiva que a presença de *biochar* nos reatores conduziu

a um incremento no número de bactérias degradadoras de diesel e heterotróficas totais.

4.5 Ensaios ecotoxicológicos

4.5.1 *Lactuca sativa*

O ensaio foi realizado sem intercorrências, sendo observada germinação significativa ao fim do ensaio, em torno de 100% para todos os testes realizados.

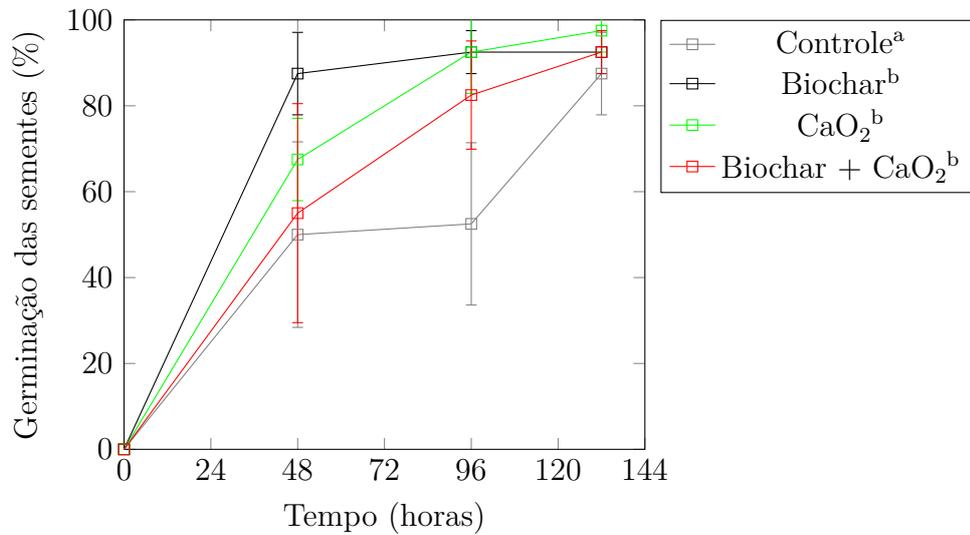
A umidade média do solo nas placas foi de $39,00 \pm 0,84$ %, próximo da umidade teórica de 40%. Na Figura 7 está apresentada imagem de alguns dos brotos medidos ao fim do ensaio.

Figura 7 – Brotos plantados sobre solo de bacia de contenção medidos após ensaio de germinação.



No Gráfico 12 estão dispostas as porcentagens de sementes germinadas ao longo do tempo para cada aditivo.

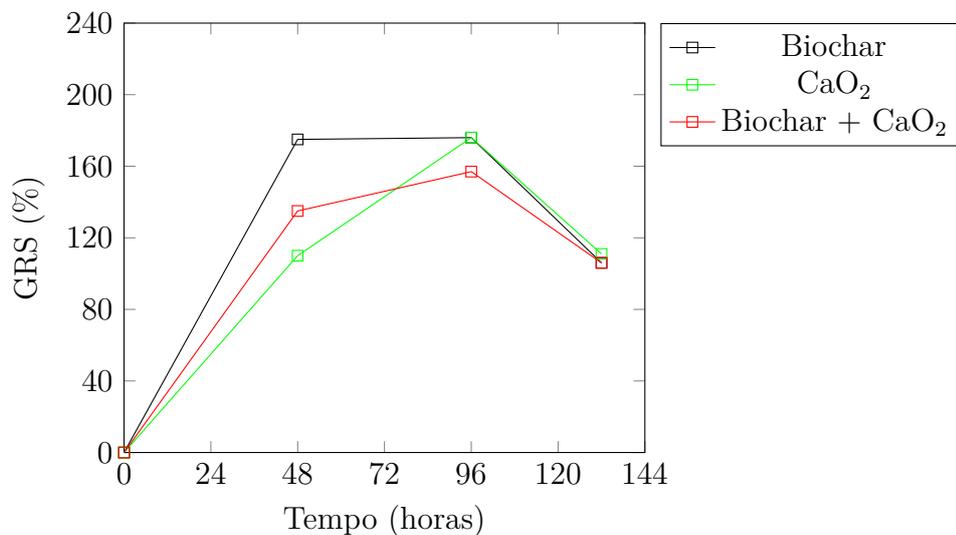
Gráfico 12 – Germinação das sementes de alface.



É possível observar que a presença tanto do *biochar* quanto do CaO₂, separadamente e em conjunto, beneficiou a germinação no início do ensaio. As características do solo não são propícias para a agricultura, havendo uma quantidade baixa de nutrientes e baixo pH.

Desta forma, é possível que a presença do *biochar* e do peróxido tenha elevado o pH para um valor mais próximo da neutralidade. Além disso, a presença do *biochar* pode incrementar a disponibilidade de nutrientes no solo. Esse indício é observado de maneira mais destacada no Gráfico 13.

Gráfico 13 – Germinação relativa das sementes de alface.



A análise da germinação relativa destaca claramente a relação entre os aditivos utilizados e as características do solo examinado. Os resultados acima de 100% ao longo de todo o ensaio para o *biochar* nos testes com *biochar*, peróxido e na combinação destes dois aditivos.

O CaO_2 apresentou GRS menor do que os aditivos com *biochar*, na leitura com 48h, mas se igualou ao *biochar* na leitura com 96h, se encontrando em torno de 100%, no encerramento do ensaio.

Em um ensaio destinado a avaliar a toxicidade de compostos imaturos para sementes de agrião, observou-se uma redução da toxicidade com a adição de materiais contendo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaO_2 e CaO em sua composição (HIMANEN; HÄNNINEN, 2009). Notavelmente, o composto tornou-se não tóxico após 8 semanas de compostagem, em comparação com o controle, que demandou 12 semanas. Esse efeito de redução de toxicidade, associado ao peróxido, pode ser atribuído ao aumento do pH no solo.

O CaO_2 demonstra uma capacidade eficaz na liberação de oxigênio para a produção de insumos agrícolas, seja por meio do encapsulamento de sementes ou pela aplicação direta no solo, visando aumentar a concentração de oxigênio dissolvido em áreas anóxicas, especialmente aquelas sujeitas a alagamentos (BAKER; HATTON, 1987; WANG et al., 2022; MEI et al., 2017). Em uma pesquisa conduzida por (BAKER; HATTON, 1987), que abordava as possíveis implicações negativas do encapsulamento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre sementes de arroz encapsuladas com CaO_2 e as não encapsuladas, quando plantadas em substrato de areia.

Em uma revisão recente, Godlewska, Ok e Oleszczuk (2021) detalharam a potencial toxicidade do *biochar* em vários organismos, incluindo plantas. Em linhas gerais, os autores destacam que a toxicidade do *biochar* para plantas frequentemente varia consideravelmente, dependendo da matéria-prima a partir da qual o *biochar* é fabricado, da temperatura de pirólise (e de outros parâmetros do processo) e da taxa de aplicação do *biochar*.

No caso específico das sementes de alface, o índice de germinação foi de 49,18, 81,35 e 141,55 com extratos em papel de filtro de *biochar* proveniente de lodo de papel e cascas de trigo, lascas de madeira e lodo de esgoto (GASCO et al., 2016). Esses mesmos biocarvões foram diretamente aplicados em dois solos arenosos, ambos com características semelhantes, na proporção de 8% (m:m). Notou-se que o *biochar* de lascas de madeira reduziu o tamanho do caule para ambos os solos e a massa das raízes para um deles, enquanto os outros biocarvões apresentaram respostas diversas.

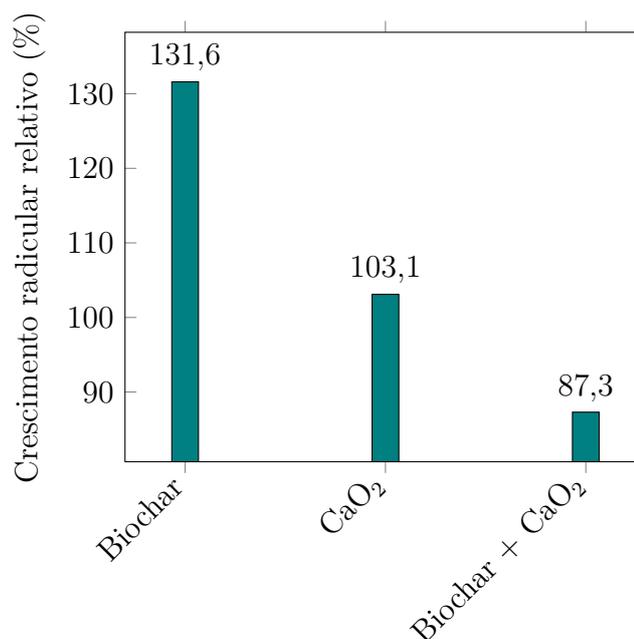
Kołtowski e Oleszczuk (2016) avaliaram a possível redução de toxicidade de 3 diferentes solos coletados em áreas comerciais após manutenção em contato direto entre solo e carvão ativado e *biochar* de salgueiro e palha de trigo, em diferentes proporções, durante 2 meses em leve agitação (10 rpm). Os autores avaliaram a toxicidade do solo para o crescimento de agrião (*L. sativum*), colêmbulo (*F. candida*) e bactéria luminescente

(*V. fischeri*). Os resultados variaram com o *biochar* aplicado e o solo utilizado. Para um dos solos, coletado em uma fábrica de asfalto, por exemplo, o *biochar* de palha de trigo estimulou o crescimento do agrião para todas as dosagens avaliadas (0,5%; 1,0%; 2,5%; 5,0%). O mesmo biocarvão, quando aplicado em solo adquirido em área de indústria de coque, aumentou a toxicidade do solo em 159% quando usada dosagem de 2,5%.

De maneira geral, Jeffery et al. (2017), em uma revisão sobre o impacto do *biochar* no crescimento de culturas, destacaram que a adição de *biochar* em solos tropicais, especialmente aqueles com baixo pH, baixa quantidade de nutrientes ou que necessitam de melhorias em sua morfologia, é benéfica. Em contrapartida, em solos que não se encaixam nessas categorias, o efeito pode ser neutro ou até mesmo negativo.

No Gráfico 14, está apresentado o crescimento relativo das raízes dos brotos de alface.

Gráfico 14 – Crescimento radicular relativo das sementes de alface.

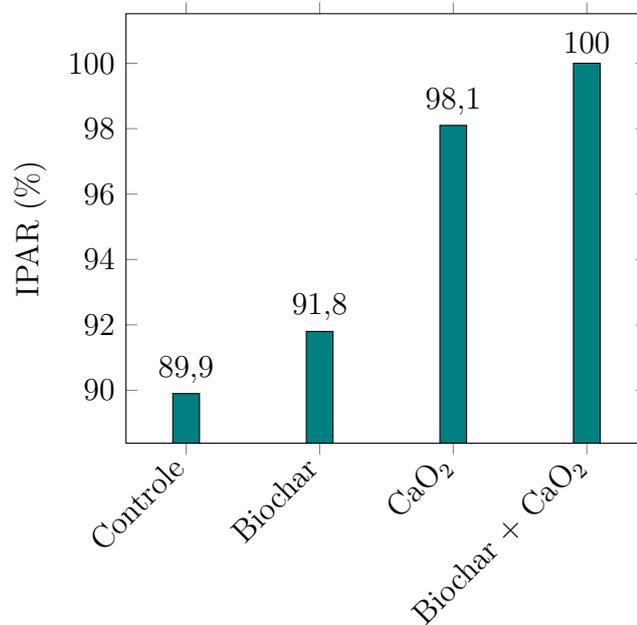


O resultado obtido permite observar que o *biochar* e o CaO₂, individualmente, contribuem para o crescimento radicular do alface, quando comparado com o controle. O crescimento foi de 131,6% para o *biochar* e 103,1% para o CaO₂. Esse incremento no comprimento das raízes pode aumentar o desenvolvimento das plantas, pois permite maior absorção de água e nutrientes (XIANG et al., 2017). Em meta-análise, Xiang et al. (2017) observaram crescimento médio maior em 50% das raízes pós aplicação do biocarvão. Demonstrando que o presente trabalho demonstrou consistência com os dados na literatura.

No Gráfico 15 estão apresentados os índices de parte aérea/raiz dos brotos de

alface.

Gráfico 15 – Índice parte aérea/raiz para os aditivos do solo.



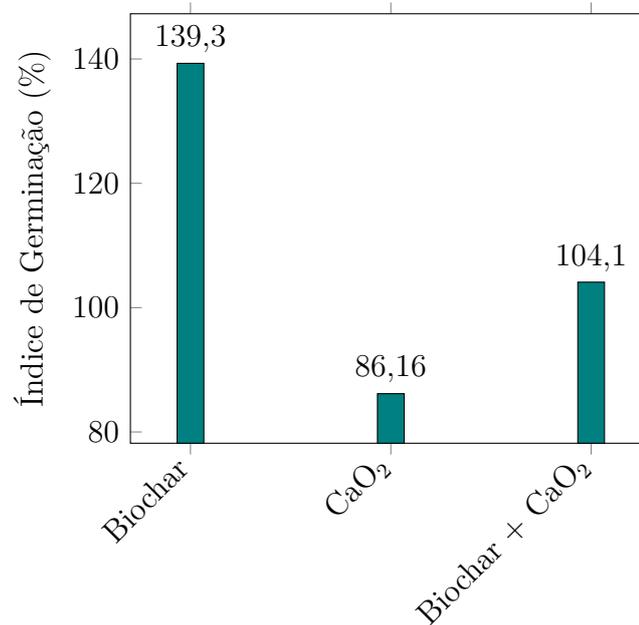
Foi observado que o IPAR foi alterado com a inserção de todos os aditivos, ocorrendo o incremento do mesmo observado para o *biochar* (91,8%), CaO₂ (98,1%) e *biochar* + CaO₂ (100%).

Os autores Marmioli et al. (2022) destacaram que razões mais altas de *biochar* diminuem o IPAR, que é correlacionado com a toxicidade observada no *biochar*, dose dependente. Ou seja, a adição do conjunto *biochar* e CaO₂ não teve influência sobre o crescimento da alface, resultando em IPAR como 100%. Há indícios, portanto, que a ordem de toxicidade do substrato seria C > B > Pe > BP.

Novamente, a partir desse índice é possível notar que os parâmetros do solo demonstram pouca qualidade para o plantio, mas que é melhorado com a inclusão do *biochar*. O crescimento das raízes em detrimento da parte aérea é um indício de estresse das plantas, sendo considerada a proporção m:m dos dois idealmente de 1:2 parte aérea:raiz (CALDEIRA et al., 2008).

Os índices de germinação das sementes utilizando os diferentes aditivos e do solo limpo estão apresentados no Gráfico 16.

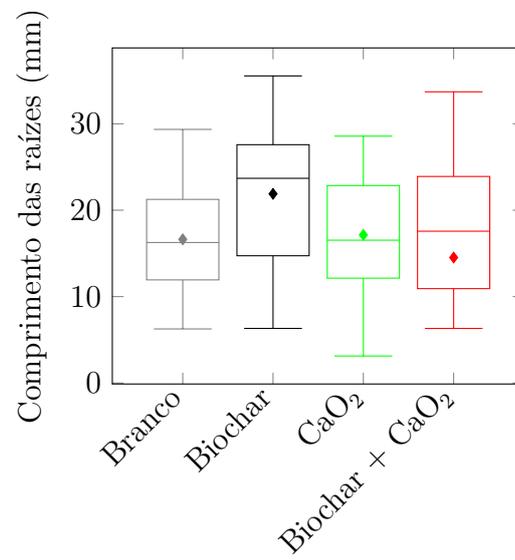
Gráfico 16 – Índice de germinação das sementes de alface.



É possível analisar que para o *biochar* e para a combinação *biochar* e CaO₂ apresentaram índice de germinação IG > 100% indicam que eles podem ser classificados como fitoestimulantes (GASCO et al., 2016). Enquanto o CaO₂ seria classificado como não tóxico (IG > 80%).

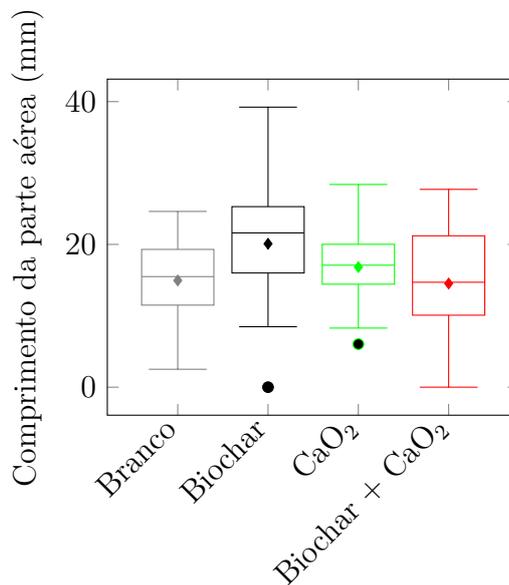
Nos Gráficos 17 e 18, estão dispostos os boxplots da parte aérea e das raízes e dos brotos.

Gráfico 17 – Boxplot das raízes dos brotos.



Legenda: ◆ = média, linha = mediana e ● = "outliers"

Gráfico 18 – Boxplot da parte aérea dos brotos.



Legenda: ◆ = média, a linha = mediana e ● = "outliers"

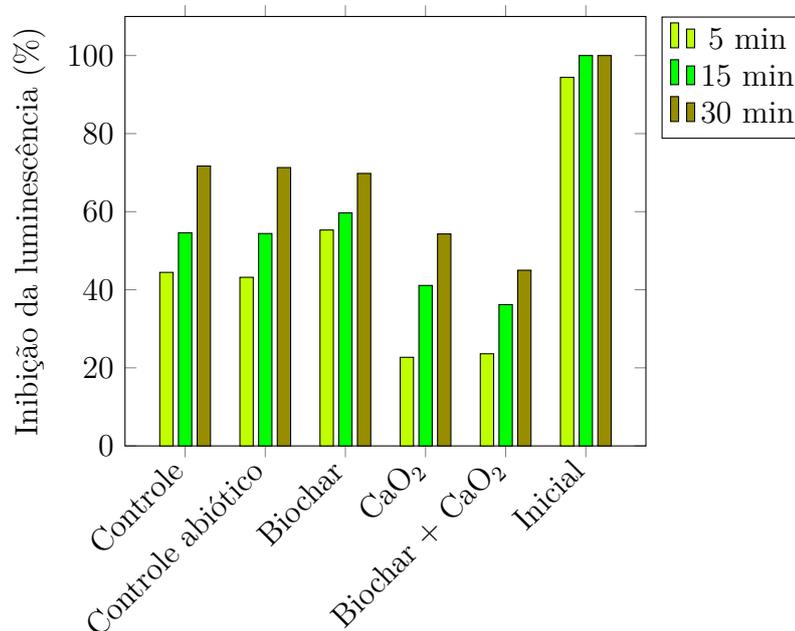
Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) somente para o teste com *biochar*, quando comparado com os outros realizados. Nota-se, portanto, que o *biochar* não apresenta toxicidade para as sementes, inclusive incrementando o seu crescimento do caule e radicular. Isso pode ser atribuído à quantidade de nutrientes presente no *biochar* e sua capacidade de aprimorar as capacidades físicas do solo. Apesar de não possuir tantos nutrientes como outros *biochars* encontrados na literatura, o *biochar* de eucalipto demonstrou potencial como um aditivo do solo.

Com os resultados obtidos no ensaio de germinação, é possível concluir que os aditivos aprimoraram ou não interferiram no crescimento do alface, demonstrando potencial para a aplicação no campo.

4.5.2 *Vibrio fischeri*

Foram feitos dois ensaios para avaliação de toxicidade pela bactéria luminescente. O primeiro envolveu as amostras antes e depois do tratamento por biorreatores. O resultado de inibição da luminescência está apresentado no Gráfico 19.

Gráfico 19 – Inibição de luminescência do elutriato das amostras pós-tratamento.



Houve incremento da inibição de luminescência no decorrer do ensaio para todos os solos. Foi observada maior redução de toxicidade para os tratamentos com a adição de CaO₂ e com a união de CaO₂ e *biochar*, atingindo inibição após 5 minutos de contato de 22,77 e 23,57 %, respectivamente. O *biochar*, no entanto, incrementou a inibição de luminescência, superior ainda às dos controles (55,3%). *Biochar* já demonstrou potencial de reduzir a toxicidade à bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (OLESZCZUK; KOŁTOWSKI, 2017; KOŁTOWSKI; OLESZCZUK, 2016).

Após promover contato de *biochar* com solos contaminados, Kołtowski e Oleszczuk (2016) notaram redução de toxicidade à luminosidade em 5 minutos relacionada à razão *biochar*:solo utilizada. Já a toxicidade após 15 minutos variou de acordo com o solo e o *biochar* aplicados. O *biochar* de salgueiro, por exemplo, aumentou a toxicidade do solo em dose de 5%.

Oleszczuk e Kołtowski (2017) procuraram avaliar o potencial de degradar HPAs em tratamento de 7 dias e 30 dias com a adição de *biochar* e nanoferro em dois diferentes solos. Após o ensaio de degradação, foi avaliada a toxicidade dos extratos do solo. Para um dos solos, o com maior quantidade de matéria orgânica, o tempo de contato foi relevante. Mas em ambos houve redução significativa da inibição da luminescência nos solos com adição de *biochar*.

Contrastando com os resultados apresentados, vários estudos anteriores identificaram toxicidade associada ao *biochar*, tanto quando utilizado isoladamente (OLESZCZUK;

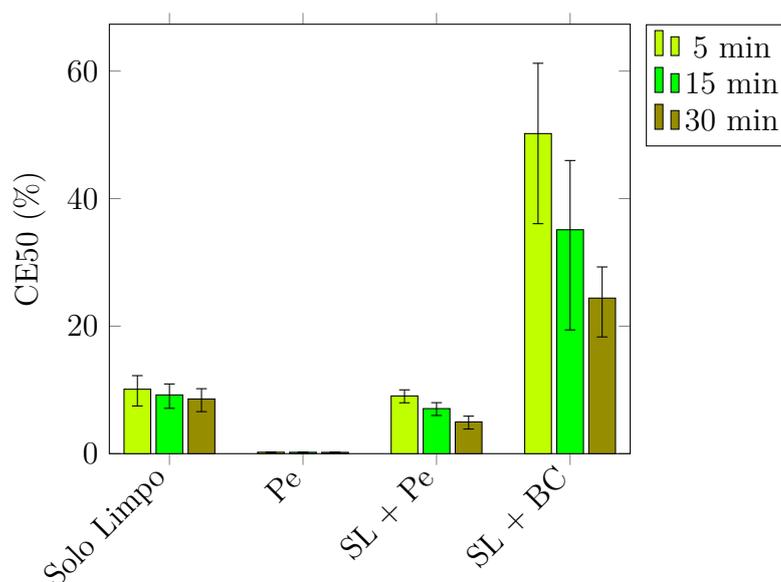
JOŚKO; KUŚMIERZ, 2013; KOŃCZAK et al., 2020) quanto como aditivo para o solo (BASTOS et al., 2014). A inibição da luminescência foi correlacionada à biomassa do *biochar*, variando de 40% a aproximadamente 100% (OLESZCZUK; JOŚKO; KUŚMIERZ, 2013). Essa toxicidade pode estar relacionada à presença de HPAs (OLESZCZUK; JOŚKO; KUŚMIERZ, 2013), à temperatura de pirólise, ao elevado pH, à salinidade (KOŃCZAK et al., 2020), bem como à presença de metais e radicais livres (KOŃCZAK et al., 2020).

Dado o efeito que os tratamentos propostos causaram nos microrganismos, foi feito um teste com o solo limpo (SL), com o elutriado do CaO_2 (Pe), do *biochar* (BC) e do conjunto *biochar* e solo (SL+BC), *biochar* e peróxido (BC + Pe) e todos em conjunto (SL + BC + Pe). As proporções utilizadas foram as mesmas dos biorreatores, sendo 5% *biochar* e 1% CaO_2 (m/m).

Foi observado que não houve toxicidade tanto para o BC, quanto para o conjunto SL+BC+Pe. O primeiro resultado foi condizente com o observado na comunidade microbiana do solo. Já o segundo, foi incompatível com o resultado esperado, já que os aditivos tiveram efeitos negativos nos microrganismos dos biorreatores.

Já para os que apresentaram toxicidade, foi calculado o CE50 para inibição da luminescência após o contato das bactérias com as amostras. No Gráfico 20, estão apresentados os resultados obtidos. As barras retratam o intervalo de confiança (95%).

Gráfico 20 – CE50 dos elutriatos dos aditivos do solo.



O resultado não tóxico observado para o *biochar* e o peróxido em solo não contaminado causou surpresa, considerando a toxicidade encontrada na comunidade microbiana heterotrófica e degradadora de diesel no ensaio conduzido em biorreator. A análise do con-

trole e do tratamento com *biochar*, por exemplo, inicialmente não indicou a inviabilidade da comunidade microbiana, sem associar diretamente à presença do diesel.

Essa toxicidade parece ter se manifestado com a adição do diesel, sugerindo uma possível correlação. O mecanismo desse processo permanece incerto, destacando a necessidade de estudos adicionais para confirmar essa correlação e avaliar outras respostas, como a produção de enzimas antioxidantes.

Para todos os tratamentos, houve um aumento na toxicidade ao longo do ensaio (5,15 e 30 minutos). O elutriado de CaO_2 foi o que apresentou a maior toxicidade, com valores de CE50 variando de 0,23% a 0,21% para os tempos de contato de 5 e 15 minutos, respectivamente.

Isso pode ser atribuído ao aumento do pH ou à formação de peróxido de hidrogênio, conhecido por apresentar toxicidade elevada à bactéria luminescente (OLMEZ-HANCI; ARSLAN-ALATON; DURSUN, 2014). Recomenda-se, portanto, o uso de concentrações baixas de peróxido, visando preservar a comunidade microbiana local.

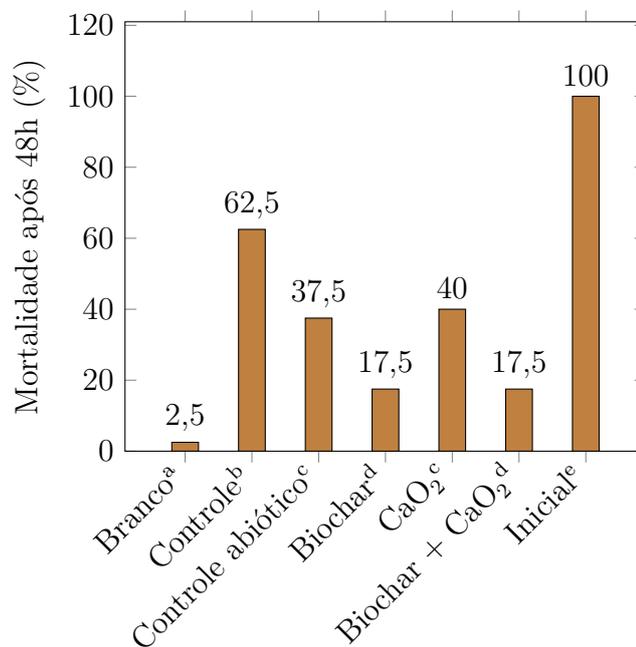
O solo exibiu alta toxicidade, com um CE50 de 10,1% após 5 minutos de contato, provavelmente devido ao baixo pH. A adição de peróxido reduziu ainda mais o CE50 para 9,05%.

O *biochar* demonstrou uma redução na toxicidade do solo, reforçando a importância previamente discutida neste estudo sobre o papel benéfico do *biochar* em solos tropicais e ácidos.

4.5.3 *Artemia sp.*

O ensaio ocorreu dentro da normalidade, sendo possível avaliar a toxicidade dos solos pós tratamento na *Artemia sp.* Foi realizada uma contagem com 24h somente para avaliar o andamento do ensaio, como considerado na norma que preconiza a realização desse experimento (ABNT, 2021c). Porém o resultado está apresentado no Gráfico 21 com a mortalidade/imobilidade de *Artemia sp.* após 48h de ensaio está apresentada.

Gráfico 21 – Mortalidade das artêmias após contato com elutriato do solo inicial e pós-tratamento.



Legenda: Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Foi observada diferença estatística entre o branco e todos os tratamentos, o que demonstra toxicidade para todas as amostras (ABNT, 2021c). É notável que o solo inicial apresentou alta toxicidade, apresentando 100% de mortalidade, o que era esperado dada a alta concentração de hidrocarbonetos de petróleo e o baixo pH do solo, 4,56, no encerramento do ensaio (vide Gráfico 22), bem abaixo do preconizado para a sobrevivência do microcrustáceo ($8,0 \pm 0,5$) (ABNT, 2021c). O nível de toxicidade do solo após o tratamento reduziu em todos os tratamentos, no entanto, ela não pareceu relacionada diretamente com a redução de hidrocarbonetos.

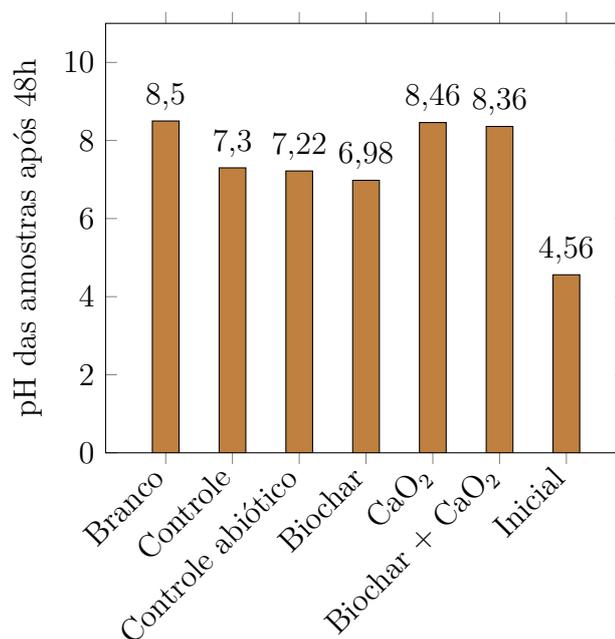
Observa-se por exemplo que o tratamento com *biochar* reduziu de maneira significativa a toxicidade, quando a remoção de hidrocarbonetos se encontrou próxima dos controles. Isso reforça a possibilidade dos hidrocarbonetos terem permanecido imobilizados no biocarvão e o processo de produção do elutriato não foi capaz de solubilizar esses contaminantes na água, não afetando significativamente as artêmias.

O aumento do pH proporcionado pelo CaO₂ nos biorreatores foi observado novamente nos elutriatos utilizados no ensaio, 8,46 e 8,36 para Pe e BP, respectivamente (Gráfico 22). No entanto, esse fator não pareceu afetar a toxicidade já que o tratamento com BP reduziu a mortalidade para 17,5% enquanto o outro reduziu para 40%, próximo

do encontrado no controle abiótico.

Em solo contaminado por petróleo mantido por 30 dias em fase semi-sólida com nutrientes e bioaumentação, Maddela et al. (2016) realizou teste agudo com *Artemia sp.* com duração de 24h, observou uma redução de 80,5% de toxicidade a *Artemia sp.* no solo para 28,2% de mortalidade. Os autores observaram relação direta entre essa redução com a remoção de hidrocarbonetos.

Gráfico 22 – pH nos elutriatos do solo durante teste com *Artemia sp.*

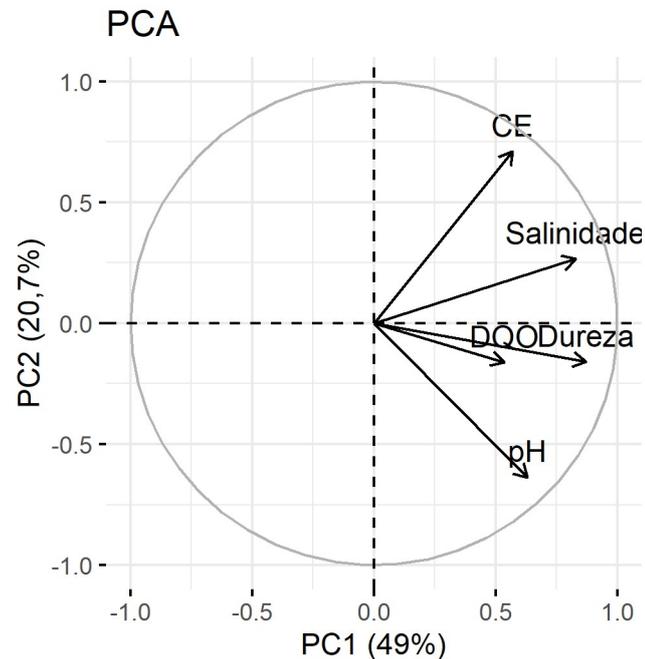


4.6 Análise de componentes principais e correlação

A primeira análise de componentes principais (do inglês, PCA) foi realizada considerando as variáveis físico-químicas (condutividade elétrica - CE, demanda química de oxigênio - DQO, dureza, pH e salinidade) em todos os tratamentos durante todo o período de execução do ensaio. PCA é utilizado para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de variáveis.

No Gráfico 23 está apresentada a primeira representação dessa análise ("score plot").

Gráfico 23 – PCA aplicado às variáveis físico-químicas ao longo dos 28 dias (1d, 14d, 28d) - Mapa de cargas fatoriais.



Os vetores indicam as variáveis do solo incluídas na PCA, e seu comprimento e direção indicam a magnitude e direção em que contribuem para as duas dimensões. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem da variação no conjunto de dados original que é explicada pelos eixos PC1 e PC2.

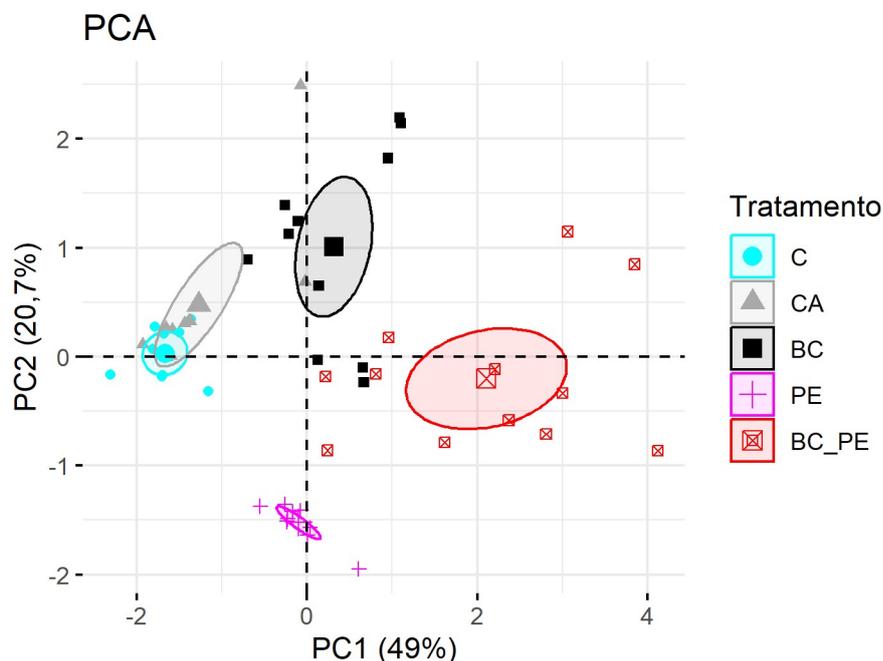
Os componentes principais PC1 e PC2 explicam a variabilidade de 69,7% dos dados. Nota-se que houve proximidade entre salinidade e CE, o que é explicável pela relação entre esses dois parâmetros, já que a presença de íons na solução aumenta ambos (CWT, 2004).

Alguns autores já observaram correlação positiva entre DQO e dureza em águas superficiais, no entanto, essa relação não foi devidamente esclarecida (BHUYAN et al., 2018; RAHMAN; HOSSAIN, 2020). No entanto, não foi o caso no presente trabalho, onde a correlação resultou em 0,247.

Foi observada relevante DQO nos tratamentos com o CaO_2 , biorreatores esses que apresentaram alta dureza, tanto com quanto sem *biochar*. Isso pode ter influenciado na semelhança de comportamento entre essas variáveis quando realizada análise de PCA.

No Gráfico 24, está apresentado o PCA do tipo "*loadings plot*".

Gráfico 24 – PCA aplicado às variáveis físico-químicas ao longo dos 28 dias (1d, 14d, 28d) - Mapa de cargas fatoriais.



É possível observar extrema proximidade e até sobreposição entre o controle e o controle abiótico, demonstrando que a autoclavagem do solo não alterou de maneira destacada o comportamento dos parâmetros analisados durante o ensaio de remediação. Corroborando com os resultados dos testes de Wilcoxon aplicado às variáveis físico-químicas em que não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os controles.

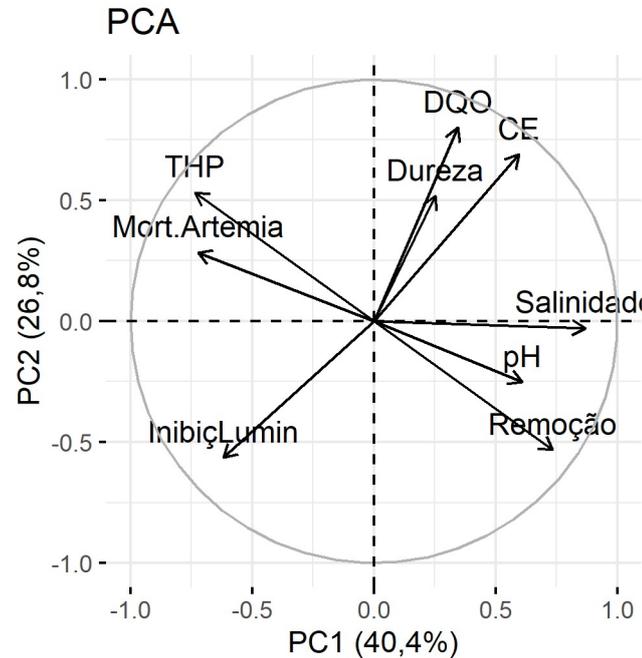
Destaca-se ainda a distribuição ampla dos dados do tratamento com *biochar* e peróxido, demonstrando grande variabilidade entre os dados. Distribuição semelhante foi observada para o *biochar*. Esse padrão pode estar relacionado à presença do biocarvão. Essa amplitude pode ser explicada pela variação dos parâmetros ao longo do tempo, que foi mais proeminente do que nos controles e Pe.

Os dados do tratamento com *biochar* e peróxido aparentam estar equidistantes do tratamento com *biochar* e com peróxido, demonstrando a influência dos dois nos resultados obtidos.

Outra análise de componentes principais foi realizada considerando os parâmetros físico-químicos no último dia de ensaio (28d), além de concentração final de HTPs no solo, remoção de HTPs, mortalidade das artêmias e inibição da luminescência na bactéria *V. fischeri*.

O gráfico de PCA está apresentado no Gráfico 25.

Gráfico 25 – PCA aplicado às variáveis físico-químicas, respostas ecotoxicológicas e concentração de HTP no 28º dia - Mapa de pontuação.

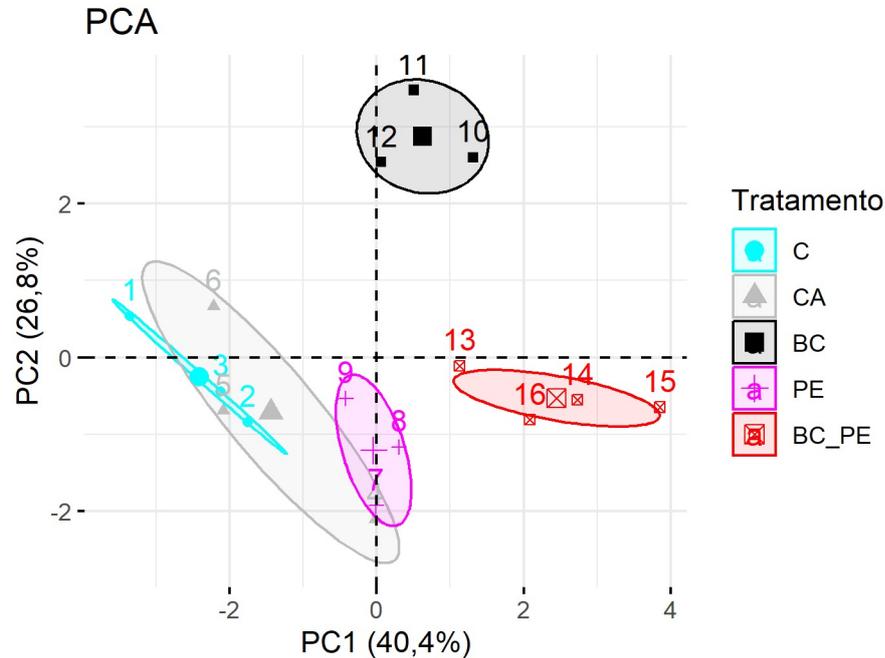


Os componentes principais PC1 e PC2 explicam 67,2 % da variabilidade dos dados. Foi possível observar proximidade entre a concentração de HTPs e mortalidade das artêmias, demonstrando que esse fator influenciou de maneira significativa na toxicidade às artêmias. O pH apresenta comportamento oposto ao de HTP e mortalidade de artêmias. Dado o pH mais alto para a sobrevivência das artêmias ser ($8,0 \pm 0,5$), o baixo pH no sobrenadante indica que teve relação com a mortalidade desses microcrustáceos.

A inibição de luminosidade da bactéria apresentou comportamento oposto à DQO, dureza e condutividade elétrica, indicando que quanto maior o valor desses parâmetros, menor a inibição. Isso pode ser um indício que a toxicidade pode estar atrelada à baixos valores de dureza e CE nos tratamentos com peróxido. Com relação à DQO, aparentemente não teve efeito negativo para ambos os organismos analisados.

O segundo PCA está apresentado no Gráfico 26.

Gráfico 26 – PCA aplicado às variáveis físico-químicas, respostas ecotoxicológicas e concentração de HTP no 28º dia - Mapa de cargas fatoriais.

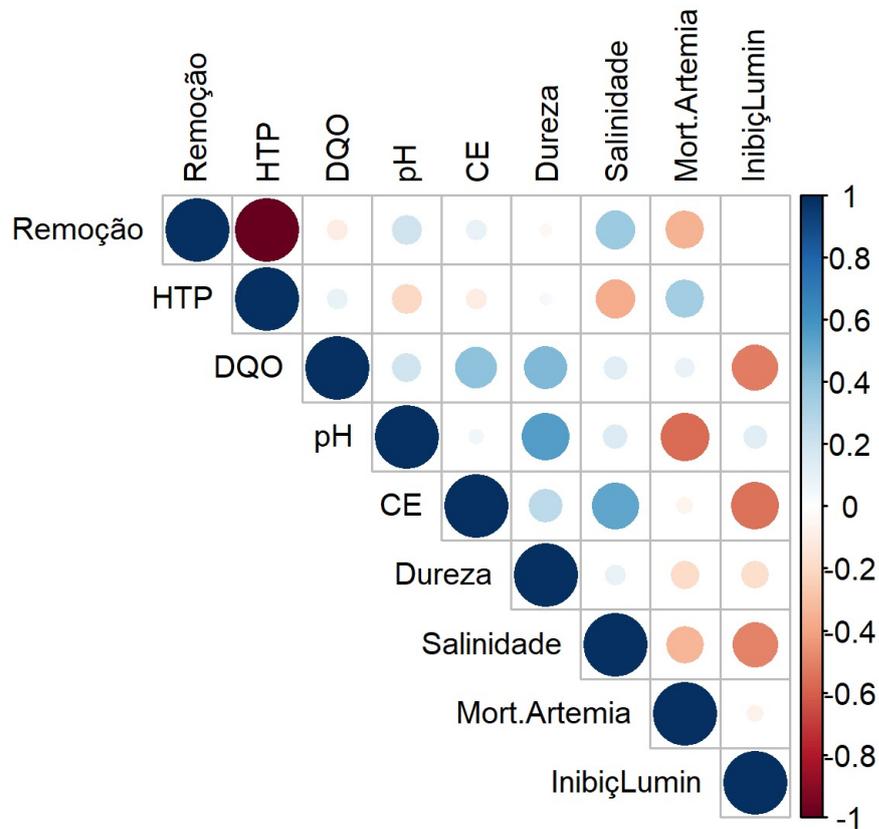


Os dados pertencentes ao mesmo tratamento apresentaram proximidade, demonstrando semelhança entre os resultados. O comportamento foi semelhante entre os tratamentos. Há uma sobreposição do controle sobre o controle abiótico, tendo este último apresentado maior variação entre os dados. O tratamento com peróxido também esteve próximo dos controles. Pode-se observar que os tratamentos agrupados nos quadrantes à direita, apresentaram menor toxicidade em *Artemia* e *Vibrio* e maior remoção de HTPs.

O tratamento com o *biochar* apresentou resultados mais distanciados. Assim como no Gráfico 24, os dados obtidos para o tratamento BP se aproximaram do Pe, demonstrando a influência desse aditivo nos aspectos observados no ensaio de biodegradação.

Foi elaborada uma matriz de correlação de Kendall entre os resultados, porque a distribuição dos dados é não-paramétrica, e está apresentada no Gráfico 27.

Gráfico 27 – Correlação entre os parâmetros físico-químicos (28d), remoção de HTPs e efeitos ecotoxicológicos.



Assim como na PCA realizada para o último dia de ensaio (Gráfico 25), houve uma correlação negativa entre pH e mortalidade de artêmias ($r = -0,57$), e entre DQO e a inibição da luminescência ($r = -0,52$). Além dessas, outras duas correlações negativas ocorreram entre inibição de luminescência e condutividade elétrica ($r = -0,53$) e com salinidade ($r = -0,49$). As duas correlações positivas mais relevantes da matriz foram entre pH e dureza ($r = 0,56$), e condutividade elétrica e salinidade ($r = 0,53$). Não houve nenhuma correlação forte entre as variáveis ($r > 0,7$).

CONCLUSÃO

A proposta de biorremediação, utilizando *biochar* proveniente de biomassa de eucalipto e peróxido de cálcio, demonstrou eficácia na remoção dos HTPs presentes no solo contaminado por diesel, apresentando uma notável porcentagem de remoção quando comparada com o controle: $42 \pm 7\%$ e $28 \pm 10\%$, respectivamente. Observou-se que a aplicação de CaO_2 causou um distúrbio na microbiota do solo, inibindo o desenvolvimento de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de diesel. A redução dos hidrocarbonetos foi atribuída à oxidação química desencadeada pela adição de peróxido.

Os materiais aplicados, tanto o *biochar* quanto o peróxido de cálcio, não demonstraram toxicidade para a alface, assim como a coaplicação de ambos. Isso foi evidenciado pelo índice de germinação, que atingiu 139,3% para o *biochar*, 86,16% para o CaO_2 , e 104,1% para a aplicação conjunta de *biochar* e peróxido.

Esses resultados contrastam com os obtidos nos testes com *V. fischeri*, onde a aplicação isolada de peróxido demonstrou alta toxicidade, com um CE50 estimado em 0,23%. Entretanto, a co-aplicação de ambos, peróxido e biochar, não apresentou efeitos prejudiciais para a bactéria marinha, quando adicionados ao solo.

Além disso, foi observada uma redução na toxicidade para os organismos *Artemia sp.* e *Vibrio sp.* após os ensaios de degradação de hidrocarbonetos em biorreatores contendo CaO_2 e *biochar*, especialmente quando comparado com o solo inicial que causou 100% de mortalidade e 94,4 % de inibição de luminescência. Essa mortalidade foi reduzida para 17,5%, e a inibição foi para 23,57%. Concluindo que o tratamento foi eficiente na redução de toxicidade para os organismos estudados.

Para futuros trabalhos, ressalta-se a necessidade de mais estudos, especialmente em condições mais adversas, experimentos em campo e, em última instância, a aplicação dessas técnicas no ambiente natural. Análises de sequenciamento da comunidade microbiana, assim como quantificação de espécies reativas de oxigênio seriam importantes para o entendimento dos processos ocorridos durante o tratamento. É sugerido também que sejam feitos ensaios ecotoxicológicos com organismos de mais níveis tróficos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 626, p. 1295–1309, 2018.
- ACIOLI, P. C. *A influência da presença de ferro endógeno de solos brasileiros na remediação de diesel via reagente de Fenton modificado*. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) — Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.bdtd.uerj.br/handle/1/14276>. Acesso em: 16 mar. 2024.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, Elsevier BV, v. 120, n. 2, p. 363–370, dez. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00119-7).
- AGAMUTHU, P.; TAN, Y.; FAUZIAH, S. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environmental Sciences*, Elsevier, v. 18, p. 694–702, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. *Dados de Incidentes de Exploração e Produção de Petróleo e Gás Natural*. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/dados-abertos/incidentes-seguranca-operacional>. Acesso em: 09 fev. 2024.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2022*. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico>. Acesso em: 12 jun. 2023.
- ALMEIDA, M. d. F. B. d. *Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação de solo argiloso contaminado por óleo em biorreator de fase semi-sólida*. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) — Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- ALVAREZ, P. J.; ILLMAN, W. A. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.
- APARICIO, J. D. et al. The current approach to soil remediation: A review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier, v. 10, n. 2, p. 107141, 2022.
- ARÊAS, J. et al. Seriam as áreas contaminadas do estado do Rio de Janeiro um legado da grande aceleração no Antropoceno? *Revista Virtual de Química*, v. 12, p. 775–94, 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6459: Solo - determinação do limite de liquidez*. Rio de Janeiro, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 7180: Solo - determinação do limite de plasticidade*. Rio de Janeiro, 2016.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 7181*: Solo - análise granulométrica. Rio de Janeiro, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 7182*: Solo - ensaio de compactação. Rio de Janeiro, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 15411-3*: Ecotoxicologia aquática - efeito inibitório sobre a bioluminescência de *Vibrio fischeri* - parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 15469*: Ecotoxicologia — coleta, preservação e preparo de amostras. Rio de Janeiro, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 16530*: Ecotoxicologia aquática — toxicidade aguda — método de ensaio com artemia sp (crustacea, brachiopoda). Rio de Janeiro, 2021.
- ASTM. *Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods*. [S.l.]: ASTM International West Conshohocken, PA, 1998.
- BAKER, A. M.; HATTON, W. Calcium peroxide as a seed coating material for padi rice: III glasshouse trials. *Plant and Soil*, Springer, v. 99, p. 379–386, 1987.
- BAMGBOSE, I.; ANDERSON, T. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa L.*), lettuce (*Lactuca sativa L.*), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier BV, v. 122, p. 268–274, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.003>.
- BAMGBOSE, I. A.; ANDERSON, T. A. Ecotoxicity of three plant-based biodiesels and diesel using, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, Elsevier, v. 260, p. 113965, 2020.
- BARATI, M. et al. Total petroleum hydrocarbon degradation in contaminated soil as affected by plants growth and biochar. *Environmental Earth Sciences*, Springer, v. 76, p. 1–11, 2017.
- BASTOS, A. et al. Potential risk of biochar-amended soil to aquatic systems: an evaluation based on aquatic bioassays. *Ecotoxicology*, Springer, v. 23, p. 1784–1793, 2014.
- BHUYAN, M. S. et al. Water quality assessment using water quality indicators and multivariate analyses of the old Brahmaputra River. *Pollution*, University of Tehran, v. 4, n. 3, p. 481–493, 2018.
- BIERNBAUM, J. Organic matters: feeding the soil and building soil quality. *Department of Horticulture, Michigan State University*, 2012.
- BRASIL, C. et al. Effect of bacillus thuringiensis on microbial functional groups in sorghum rhizosphere. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, SciELO Brasil, v. 41, p. 873–877, 2006.
- BRASIL, E. C.; CRAVO, M. d. S. Interpretação dos resultados de análises de solo. *CRAVO, M. da S.; VIÉGAS, I. de JM*, p. 43–47, 2007.

- BROWN, D. M. et al. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 596, p. 284–292, 2017.
- BROWN, R. W. et al. Nutrient (C, N and P) enrichment induces significant changes in the soil metabolite profile and microbial carbon partitioning. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 172, p. 108779, 2022.
- BUTPHU, S. et al. Eucalyptus biochar application enhances ca uptake of upland rice, soil available p, exchangeable k, yield, and n use efficiency of sugarcane in a crop rotation system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Wiley Online Library, v. 183, n. 1, p. 58–68, 2020.
- CALDEIRA, M. V. W. et al. Composto orgânico na produção de mudas de aroeira-vermelha. *Scientia Agraria*, v. 9, n. 1, p. 027–033, 2008.
- CARVALHO, S. R.; BÔA, G. S. V.; FADIGAS, F. S. Concentrações naturais de metais pesados em solos derivados de sedimentos do grupo barreiras. *Cadernos de Geociências*, v. 10, n. 2, p. 97–107, 2013.
- CECCHIN, I. et al. Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 119, p. 419–428, 2017.
- CHAGAS-SPINELLI, A. C. et al. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of environmental management*, Elsevier, v. 113, p. 510–516, 2012.
- CHANDRA, S.; BHATTACHARYA, J. Influence of temperature and duration of pyrolysis on the property heterogeneity of rice straw biochar and optimization of pyrolysis conditions for its application in soils. *Journal of cleaner production*, Elsevier, v. 215, p. 1123–1139, 2019.
- CHAUDHARY, D. K. et al. Insights into the biodegradation of diesel oil and changes in bacterial communities in diesel-contaminated soil as a consequence of various soil amendments. *Chemosphere*, Elsevier, v. 285, p. 131416, 2021.
- CHEN, B.; CHEN, Z. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere*, Elsevier, v. 76, n. 1, p. 127–133, 2009.
- CHEN, C.-H.; LIU, P.-W. G.; WHANG, L.-M. Effects of natural organic matters on bioavailability of petroleum hydrocarbons in soil-water environments. *Chemosphere*, Elsevier, v. 233, p. 843–851, 2019.
- CHEVRON. *Diesel Fuels Technical Review*. 2007. Disponível em: <https://www.chevron.com/-/media/chevron/operations/documents/diesel-fuel-tech-review.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2023.
- CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE, B. O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, Springer, v. 1, p. 117–138, 2011.

CHRISTENSEN, D. G.; VISICK, K. L. *Vibrio fischeri*: laboratory cultivation, storage, and common phenotypic assays. *Current protocols in microbiology*, Wiley Online Library, v. 57, n. 1, p. e103, 2020.

CIPULLO, S. et al. Linking bioavailability and toxicity changes of complex chemicals mixture to support decision making for remediation endpoint of contaminated soils. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 650, p. 2150–2163, 2019.

CLEAN WATER TEAM. *Electrical conductivity/salinity Fact Sheet*. 2004. Disponível em: https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3130en.pdf. Acesso em: 12 fev. 2024.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Manual de gerenciamento de áreas contaminadas*. 2021. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/documentacao/manual-de-gerenciamento-de-areas-contaminadas/informacoes-gerais/apresentacao-2/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Utilização das técnicas de remediação no gerenciamento das áreas contaminadas*. 2023. Disponível em: <https://mapas.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/portal/apps/MapJournal/index.html?appid=28e7bb2238a443819447a8ec3ae4abe5>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CONAWAY, C. F. *The Petroleum Industry: A nontechnical guide*. Tulsa, Oklahoma: PennWell, 1999. 1-341 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. *Resolução Nº 420, de 28 de dezembro de 2009*. Rio de Janeiro, 2009.

CORNELISSEN, G. et al. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental science & technology*, ACS Publications, v. 39, n. 18, p. 6881–6895, 2005.

COTTA, J. A. de O.; LEMOS, G. S.; LIMA, E. N. Ensaios ecotoxicológicos de solo contaminado por diesel submetido à degradação pela espécie *Eisenia fétida*. *Research, Society and Development*, Research, Society and Development, v. 9, n. 2, p. e106922122, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2122>.

COUTO, M. N. P. et al. Role of natural attenuation, phytoremediation and hybrid technologies in the remediation of a refinery soil with old/recent petroleum hydrocarbons contamination. *Environmental technology*, Taylor & Francis, v. 33, n. 18, p. 2097–2104, 2012.

DAAR, A. S. et al. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. *Nature genetics*, Nature Publishing Group US New York, v. 32, n. 2, p. 229–232, 2002.

DIKE, C. C. et al. Can biochar be an effective and reliable biostimulating agent for the remediation of hydrocarbon-contaminated soils? *Environment International*, Elsevier, v. 154, p. 106553, 2021.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. *International Energy Outlook 2021(IEO2021)*. 2021. Disponível em: <https://www.eia.gov/outlooks/ieo/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

- EUROPEAN BIOCHAR CERTIFICATION. *European Biochar Certificate: Guidelines for a sustainable production of biochar*. Arbaz, Suíça, 2012. 24 p.
- EZE, M. O.; GEORGE, S. C.; HOSE, G. C. Dose-response analysis of diesel fuel phytotoxicity on selected plant species. *Chemosphere*, Elsevier, v. 263, p. 128382, 2021.
- EZIUZOR, S. C.; OKPOKWASILI, G. C. Effect of mechanical mixing and microbial population dynamics in slurry-phase bioremediation. *Microbiology*, v. 1, n. 1, p. 1003, 2013.
- FAHIM, M. A.; AL-SAHHAF, T. A.; ELKILANI, A. *Fundamentals of petroleum refining*. [S.l.]: Elsevier, 2009.
- FAO; UNEP. Global assessment of soil pollution: Report. *FAO and UNEP*, Rome, Italy, 2021.
- FENG, D. et al. Biochar enhanced the degradation of organic pollutants through a fenton process using trace aqueous iron. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier, v. 9, n. 1, p. 104677, 2021.
- FERNÁNDEZ, M. D. et al. Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. *Ecotoxicology and environmental safety*, Elsevier, v. 74, n. 8, p. 2133–2140, 2011.
- FIRMINO, P. I. M. et al. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 260, p. 503–512, 2015.
- FRAGKOU, E. et al. In situ aerobic bioremediation of sediments polluted with petroleum hydrocarbons: a critical review. *Journal of Marine Science and Engineering*, MDPI, v. 9, n. 9, p. 1003, 2021.
- GALITSKAYA, P.; AKHMETZYANOVA, L.; SELIVANOVSKAYA, S. Biochar-carrying hydrocarbon decomposers promote degradation during the early stage of bioremediation. *Biogeosciences*, Copernicus GmbH, v. 13, n. 20, p. 5739–5752, 2016.
- GAMA, J. *ecotoxocology: Methods for Ecotoxicology*. [S.l.], 2014. R package version 1.0.1. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/ecotoxocology/index.html>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- GASCO, G. et al. Relation between biochar properties and effects on seed germination and plant development. *Biological Agriculture & Horticulture*, Taylor & Francis, v. 32, n. 4, p. 237–247, 2016.
- GODLEWSKA, P.; OK, Y. S.; OLESZCZUK, P. The dark side of black gold: Ecotoxicological aspects of biochar and biochar-amended soils. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 403, p. 123833, 2021.
- GONÇALVES, A. F. et al. Fitotoxicidade de solo contaminado em bacias de contenção de tanques de armazenamento de diesel. In: *32º Congresso da ABES*. Belo Horizonte - MG: [s.n.], 2023.

- GOU, Y. et al. Insights into the effects of fenton oxidation on pah removal and indigenous bacteria in aged subsurface soil. *Environmental Pollution*, Elsevier, v. 298, p. 118872, 2022.
- GRACE, R. *Oil: An overview of the petroleum industry*. 6. ed. [S.l.]: Elsevier, 2007. 1–41 p.
- GROELE, J.; FOSTER, J. Hydrogen peroxide interference in chemical oxygen demand assessments of plasma treated waters. *Plasma*, MDPI, v. 2, n. 3, p. 294–302, 2019.
- GUIRADO, M. et al. Effectiveness of biochar application and bioaugmentation techniques for the remediation of freshly and aged diesel-polluted soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 163, p. 105259, 2021.
- HAKEEM, K. R.; AKHTAR, J.; SABIR, M. *Soil science: agricultural and environmental perspectives*. [S.l.]: Springer, 2016.
- HAN, T. et al. Combination of biochar amendment and phytoremediation for hydrocarbon removal in petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, v. 23, p. 21219–21228, 2016.
- HARITASH, A.; KAUSHIK, C. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 169, n. 1-3, p. 1–15, 2009.
- HAWROT-PAW, M. et al. Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 1, p. 16436, 2020.
- HENNER, P. et al. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic geochemistry*, Elsevier, v. 30, n. 8, p. 963–969, 1999.
- HIMANEN, M.; HÄNNINEN, K. Effect of commercial mineral-based additives on composting and compost quality. *Waste management*, Elsevier, v. 29, n. 8, p. 2265–2273, 2009.
- HUANG, G. et al. Removal of ammonium-nitrogen from groundwater using a fully passive permeable reactive barrier with oxygen-releasing compound and clinoptilolite. *Journal of environmental management*, Elsevier, v. 154, p. 1–7, 2015.
- HUNG, C.-M. et al. Degradation of 4-nonylphenol in marine sediments using calcium peroxide activated by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)-derived biochar. *Environmental Research*, Elsevier, v. 211, p. 113076, 2022.
- HUSSAIN, F. et al. Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany*, Elsevier, v. 153, p. 80–88, 2018.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. *Relatório Anual 2022*. 2022. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Manual de construção e operação do forno rabo-quente*. Natal, 1999. 24 p.

INTERNATIONAL BIOCHAR INITIATIVE. *IBI Biochar Standards: Standardized product definition and product testing guidelines for biochar that is used in soil*. [S.l.], 2016.

JAROSŁAWIECKA, A. K.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. The effect of heavy metals on microbial communities in industrial soil in the area of Piekary Śląskie and Bukowno (Poland). *Microbiology Research*, MDPI, v. 13, n. 3, p. 626–642, 2022.

JEFFERY, S. et al. Biochar boosts tropical but not temperate crop yields. *Environmental Research Letters*, IOP Publishing, v. 12, n. 5, p. 053001, 2017.

JEREZ, S. et al. Application of a fenton process for the pretreatment of an iron-containing oily sludge: A sustainable management for refinery wastes. *Journal of Environmental Management*, Elsevier, v. 304, p. 114244, 2022.

JIANG, Y. F. et al. Impact of biochar produced from post-harvest residue on the adsorption behavior of diesel oil on loess soil. *Environmental geochemistry and health*, Springer, v. 38, p. 243–253, 2016.

JONER, E. J. et al. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental science & technology*, ACS Publications, v. 35, n. 13, p. 2773–2777, 2001.

KACHIENG'A, L.; MOMBA, M. Biodegradation of petroleum hydrocarbon functional groups in contaminated water using selected protozoan isolates. *Journal of environmental chemical engineering*, Elsevier, v. 5, n. 2, p. 1885–1891, 2017.

KACHIENG'A, L. O.; MOMBA, M. Biodegradation of fats and oils in domestic wastewater by selected protozoan isolates. *Water, Air, & Soil Pollution*, Springer, v. 226, p. 1–15, 2015.

KADRI, T. et al. Column tests for evaluation of the enzymatic biodegradation capacity of hydrocarbons (c10–c50) contaminated soil. *Environmental Pollution*, Elsevier, v. 290, p. 117986, 2021.

KANG, Y. W.; CHO, M.-J.; HWANG, K.-Y. Correction of hydrogen peroxide interference on standard chemical oxygen demand test. *Water research*, Elsevier, v. 33, n. 5, p. 1247–1251, 1999.

KANOUE, B. M. D.; ALLAIRE, S. E.; MUNSON, A. D. Quality of biochars made from eucalyptus tree bark and corncob using a pilot-scale retort kiln. *Waste and Biomass Valorization*, Springer, v. 9, p. 899–909, 2018.

KHUDUR, L. S. et al. Evaluating the efficacy of bioremediating a diesel-contaminated soil using ecotoxicological and bacterial community indices. *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, v. 22, p. 14809–14819, 2015.

- KOENIGSBERG, S. S.; SANDEFUR, C. A. The use of oxygen release compound for the accelerated bioremediation of aerobically degradable contaminants: The advent of time-release electron acceptors. *Remediation Journal*, Wiley Online Library, v. 10, n. 1, p. 3–29, 1999.
- KOŁTOWSKI, M.; OLESZCZUK, P. Effect of activated carbon or biochars on toxicity of different soils contaminated by mixture of native polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Wiley Online Library, v. 35, n. 5, p. 1321–1328, 2016.
- KOŃCZAK, M. et al. Carbon dioxide as a carrier gas and mixed feedstock pyrolysis decreased toxicity of sewage sludge biochar. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 723, p. 137796, 2020.
- KONG, L. et al. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 343, p. 276–284, 2018.
- KONG, L. et al. Effects of soil organic matter on biochar application in developing the biodegradation potentials of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Applied Soil Ecology*, Elsevier, v. 167, p. 104046, 2021.
- KOZAK, J.; WŁODARCZYK-MAKUŁA, M. Photo-oxidation of PAHs with calcium peroxide as a source of the hydroxyl radicals. In: EDP SCIENCES. *E3S Web of Conferences*. [S.l.], 2018. v. 30, p. 02009.
- KUNUKCU, Y. K. In situ bioremediation of groundwater contaminated with petroleum constituents using oxygen release compounds (orcs). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, Taylor & Francis, v. 42, n. 7, p. 839–845, 2007.
- KUPPUSAMY, S. et al. Environmental fate, toxicity, and remediation. *Total Petroleum Hydrocarbons*, p. 167–205, 2020.
- LAPINSKIENĖ, A.; MARTINKUS, P.; RĖBŽDAITĖ, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution*, Elsevier, v. 142, n. 3, p. 432–437, 2006.
- LEE, E. et al. Hydrogen peroxide interference in chemical oxygen demand during ozone based advanced oxidation of anaerobically digested livestock wastewater. *International Journal of Environmental Science & Technology*, Springer, v. 8, p. 381–388, 2011.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. Biochar for environmental management: an introduction. In: *Biochar for environmental management*. [S.l.]: Routledge, 2015. p. 1–13.
- LI, F. et al. Investigation of glyphosate removal from aqueous solution using calcium peroxide. In: IOP PUBLISHING. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. [S.l.], 2022. v. 1257, n. 1, p. 012041.
- LI, X. et al. Combined effects of maize straw biochar and oxalic acid on the dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons and microbial community structures in soil: a mechanistic study. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 364, p. 325–331, 2019.

- LI, X.; XU, J.; YANG, Z. Efficient catalytic degradation of alkanes in soil by a novel heterogeneous fenton catalyst of functionalized magnetic biochar. *Chemosphere*, Elsevier, v. 301, p. 134693, 2022.
- LIAO, X. et al. Effect of various chemical oxidation reagents on soil indigenous microbial diversity in remediation of soil contaminated by PAHs. *Chemosphere*, Elsevier, v. 226, p. 483–491, 2019.
- LIU, C. et al. Evaluating a novel permeable reactive bio-barrier to remediate pah-contaminated groundwater. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 368, p. 444–451, 2019.
- LOCATELLI, M. A. et al. Endogenous iron as a photo-fenton reaction catalyst for the degradation of pah's in soils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, SciELO Brasil, v. 19, p. 329–336, 2008.
- LOGESHWARAN, P. et al. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental technology & innovation*, Elsevier, v. 10, p. 175–193, 2018.
- LU, S.; ZHANG, X.; XUE, Y. Application of calcium peroxide in water and soil treatment: a review. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 337, p. 163–177, 2017.
- LUO, Y. et al. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, Elsevier, v. 71, p. 109–114, 2018.
- MACHADO, S. L. et al. Optimal ranges of soil index properties for diesel containment using compacted barriers. *Environmental Geotechnics*, Thomas Telford Ltd, v. 7, n. 8, p. 540–553, 2019.
- MADDELA, N. R. et al. Removal of petroleum hydrocarbons from crude oil in solid and slurry phase by mixed soil microorganisms isolated from ecuadorian oil fields. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 108, p. 85–90, 2016.
- MANFRA, L. et al. Long-term lethal toxicity test with the crustacean *Artemia franciscana*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 62, p. e3790, 2012.
- MARMIROLI, M. et al. Building a risk matrix for the safety assessment of wood derived biochars. *Science of the Total Environment*, Elsevier, v. 839, p. 156265, 2022.
- MASTORGIO, A. F. et al. In situ aerobic biostimulation of groundwater at a national priority site in italy. In: *Battelle 2019 Bioremediation Symposium Proceedings*. [S.l.: s.n.], 2019. p. 1–9.
- MAZETTE, S. et al. Fast pyrolysis biochar in eucalyptus seedling production. *J Appl Biotechnol Bioeng*, v. 7, n. 5, p. 196–198, 2020.
- MCCORMAC, K. R.; BEAZLEY, M. J. Fabrication and characterization of biodegradable oxygen-releasing micromaterials for treatment of hypoxic environmental waters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier, v. 8, n. 4, p. 103979, 2020.

- MCINNIS, J. A. *Biodegradation and Dewatering of an Industrial Waste Oil*. 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) — Instituto politecnico da Virginia, Blacksburg, 2003.
- MEI, J. et al. Seed pelleting with calcium peroxide improves crop establishment of direct-seeded rice under waterlogging conditions. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group UK London, v. 7, n. 1, p. 4878, 2017.
- MENDES, W. de S. et al. The brazilian soil mid-infrared spectral library: the power of the fundamental range. *Geoderma*, Elsevier, v. 415, p. 115776, 2022.
- MENENDEZ-VEGA, D. et al. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*, Elsevier, v. 43, n. 5-6, p. 310–321, 2007.
- Merck Milipore. *Tryptic Soy Agar (Tryptone Soya Agar, TSA, CASO Agar, Soybean Casein digest Agar)*. [S.l.], 2018. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/122/065/22091dat.pdf>. Acesso em: 15 fev, 2020.
- MIA, S. et al. Biochar application rate affects biological nitrogen fixation in red clover conditional on potassium availability. *Agriculture, ecosystems & environment*, Elsevier, v. 191, p. 83–91, 2014.
- MIRJANI, M.; SOLEIMANI, M.; SALARI, V. Toxicity assessment of total petroleum hydrocarbons in aquatic environments using the bioluminescent bacterium *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier, v. 207, p. 111554, 2021.
- MISHRA, R. K. et al. Production and beneficial impact of biochar for environmental application: A review on types of feedstocks, chemical compositions, operating parameters, techno-economic study, and life cycle assessment. *Fuel*, Elsevier, v. 343, p. 127968, 2023.
- MOTA, M. F. et al. Biochar como alternativa de substrato para produção de mudas de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, SciELO Brasil, v. 25, p. 826–832, 2021.
- NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Métodos utilizados para a correção da acidez do solo no brasil. *RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 6, n. 1, p. 97–111, 2004.
- NORTHUP, A.; CASSIDY, D. Calcium peroxide (cao₂) for use in modified fenton chemistry. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 152, n. 3, p. 1164–1170, 2008.
- ODENCRANTZ, J. E.; JOHNSON, J. G.; KOENIGSBERG, S. S. Enhanced intrinsic bioremediation of hydrocarbons using an oxygen-releasing compound. *Remediation Journal*, Wiley Online Library, v. 6, n. 4, p. 99–114, 1996.
- OK, Y. S. et al. *Soil and Groundwater Remediation Technologies: a practical guide*. [S.l.]: CRC Press, 2020.
- OLESZCZUK, P.; JOŚKO, I.; KUŚMIERZ, M. Biochar properties regarding to contaminants content and ecotoxicological assessment. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 260, p. 375–382, 2013.

- OLESZCZUK, P.; KOLTOWSKI, M. Effect of co-application of nano-zero valent iron and biochar on the total and freely dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons removal and toxicity of contaminated soils. *Chemosphere*, Elsevier, v. 168, p. 1467–1476, 2017.
- OLMEZ-HANCI, T.; ARSLAN-ALATON, I.; DURSUN, D. Investigation of the toxicity of common oxidants used in advanced oxidation processes and their quenching agents. *Journal of hazardous materials*, Elsevier, v. 278, p. 330–335, 2014.
- OMONI, V. T. et al. The impact of enhanced and non-enhanced biochars on the catabolism of 14c-phenanthrene in soil. *Environmental Technology & Innovation*, Elsevier, v. 20, p. 101146, 2020.
- ORTEGA, M. F. et al. Weighted linear models for simulation and prediction of biodegradation in diesel polluted soils. *Science of the total environment*, Elsevier, v. 686, p. 580–589, 2019.
- OSSAI, I. C. et al. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, Elsevier, v. 17, p. 100526, 2020.
- PAGNOUT, C. et al. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium sp.* strain SNP11. *Ecotoxicology and environmental safety*, Elsevier, v. 65, n. 2, p. 151–158, 2006.
- PARK, J.; CRAGGS, R. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, IWA Publishing, v. 61, n. 3, p. 633–639, 2010.
- PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment international*, Elsevier, v. 32, n. 2, p. 265–268, 2006.
- PEREIRA, C. M. M. et al. Use of a portable x-ray fluorescence spectrometry (pXRF) for chemical analysis of eucalyptus (*Eucalyptus sp.*) wood biochar. In: VII INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON AGRICULTURAL AND AGROINDUSTRIAL WASTE MANAGEMENT, 7., 2021, Online. Concórdia, SC: Sbera, 2021.
- PETROBRÁS. *Óleo Diesel*: Informações técnicas. 2021. Disponível em: https://petrobras.com.br/data/files/04/93/72/4C/5A39C710E2EF93B7B8E99EA8/Manual-de-Diesel_2021.pdf. Acesso em: 12 jun. 2023.
- PETROBRÁS. *Óleo diesel: o combustível que movimenta o país*. 2024. Disponível em: <https://petrobras.com.br/quem-somos/oleo-diesel>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- PINCELLI, A.; MOURA, L. d.; BRITO, J. Quantificação dos resíduos da colheita em florestas de eucalyptus grandis e pinus caribaea var. hondurensis. *Scientia Forestalis*, v. 45, n. 115, p. 519–526, 2017.
- PINTO, C. d. S. *Curso Básico de Mecânica dos Solos em 16 Aulas*. 3. ed. [S.l.]: Oficina de Textos, 2006.

- QIN, G.; GONG, D.; FAN, M.-Y. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 85, p. 150–155, 2013.
- QUILLIAM, R. S. et al. Life in the ‘charosphere’—does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms? *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier, v. 65, p. 287–293, 2013.
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 fev, 2024.
- RABELO, T. S. et al. Otimização de ensaios de germinação para avaliação toxicológica de solos contaminados por efluentes oleosos. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA - ECOTOX 2018, 15., 2018, Sergipe. *Anais do XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*. Sergipe, 2018. p. 2998–3000.
- RAHMAN, M. K.; HOSSAIN, M. S. Assessing the water quality of canals in Dhaka City, Bangladesh. Scientific and Academic Publishing, 2020.
- RANDALL, J. D.; HEMMINGSEN, B. B. Evaluation of mineral agar plates for the enumeration of hydrocarbon-degrading bacteria. *Journal of microbiological methods*, Elsevier, v. 20, n. 2, p. 103–113, 1994.
- RICE, E. W. et al. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. [S.l.]: American public health association Washington, DC, 2012. v. 10.
- RIO DE JANEIRO. *NOP Inea 45 - Estabelece critérios e padrões de lançamento de esgoto sanitário*. 2021.
- ROBLES-GONZÁLEZ, I. V.; FAVA, F.; POGGI-VARALDO, H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*, Springer, v. 7, p. 1–16, 2008.
- ROCHA, V. Comparative study on biochar salt absorption capacity in different saline concentrated solutions. *Bionatura*, Clinical Biotec, v. 6, n. 4, p. 2150–2155, nov. 2021. ISSN 1390-9355. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2021.06.04.3>.
- RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Campinas, SP: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010., 2010.
- RUSSELL, D. L. *Remediation manual for contaminated sites*. [S.l.]: CRC press, 2011.
- SABATÉ, J.; VINAS, M.; SOLANAS, A. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International biodeterioration & biodegradation*, Elsevier, v. 54, n. 1, p. 19–25, 2004.
- SAEED, M. et al. Development of novel kinetic model based on microbiome and biochar for in-situ remediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) contaminated soil. *Chemosphere*, Elsevier, v. 324, p. 138311, 2023.
- SAEZ, J. M. et al. Enhanced lindane removal from soil slurry by immobilized streptomyces consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 93, p. 63–69, 2014.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. *Chemistry for environmental engineering and science*. [S.l.]: McGraw-Hill, 2003.

SHEN, C. et al. Controlled synthesis of innovative carbon-based cao₂ materials with boosted oxygen release performance in the aqueous environment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier, v. 11, n. 3, p. 109616, 2023.

SHIN, K.-H. et al. Earthworm toxicity during chemical oxidation of diesel-contaminated sand. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, Wiley Online Library, v. 24, n. 8, p. 1924–1929, 2005.

SOARES, C. R. F. S. et al. Fitotoxidez de cádmio para eucalyptus maculata e e. urophylla em solução nutritiva. *Revista Árvore*, SciELO Brasil, v. 29, p. 175–183, 2005.

SOUZA, W. R. d. *Análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs – em sedimentos do Ribeirão do Funil na região de Ouro Preto – MG*. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) — Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Ouro Preto, 2007.

STEFANIUK, M.; OLESZCZUK, P.; RÓŻYŁO, K. Co-application of sewage sludge with biochar increases disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons from fertilized soil in long term field experiment. *Science of The Total Environment*, Elsevier, v. 599, p. 854–862, 2017.

SUN, L.; WAN, S.; LUO, W. Biochars prepared from anaerobic digestion residue, palm bark, and eucalyptus for adsorption of cationic methylene blue dye: characterization, equilibrium, and kinetic studies. *Bioresource technology*, Elsevier, v. 140, p. 406–413, 2013.

SWAGATHNATH, G. et al. Influence of biochar application on growth of oryza sativa and its associated soil microbial ecology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, Springer, v. 9, p. 341–352, 2019.

TEIXEIRA, P. C. et al. *Manual de métodos de análise de solo*. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181717/1/Manual-de-Metodos-de-Analise-de-Solo-2017.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2024.

THURMANN, U. et al. Correlation between microbial ex situ activities of two neighbouring uncontaminated and fuel oil contaminated subsurface sites. *Biotechnology techniques*, Springer, v. 13, p. 271–275, 1999.

TIWARI, N.; SATYAM, N. An experimental study on the behavior of lime and silica fume treated coir geotextile reinforced expansive soil subgrade. *Engineering Science and Technology, an International Journal*, Elsevier, v. 23, n. 5, p. 1214–1222, 2020.

USEPA. *ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, AND SOILS*. Washington, DC, 1996. Technical Report.

USEPA. *Alumina Column Cleanup*. Washington, DC, 1996. Hazardous Waste Test Methods.

USEPA. *Silica Gel Cleanup*. Washington, DC, 1996. Hazardous Waste Test Methods.

- USEPA. *Soxhlet Extraction*. Washington, DC, 1996. Hazardous Waste Test Methods.
- USEPA. *Best Management Practices for Soil Treatment Technologies*. Washington, DC, 1997. Technical Report.
- USEPA. *Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography*. Washington, DC, 2007. Hazardous Waste Test Methods.
- USEPA. *Ecological effects test guidelines. OCSPP 850.4100, Seedling Emergence and Growth*. Washington, DC, 2012. Technical Report.
- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier, v. 120, p. 71–83, 2017.
- VOLNOV, I. I.; PETROCELLI, A. *Peroxides, superoxides, and ozonides of alkali and alkaline earth metals*. [S.l.]: Springer, 1966.
- WAITE, A. J.; BONNER, J. S.; AUTENRIETH, R. Kinetics and stoichiometry of oxygen release from solid peroxides. *Environmental engineering science*, v. 16, n. 3, p. 187–199, 1999.
- WANG, L. et al. Biochar composites: Emerging trends, field successes and sustainability implications. *Soil Use and Management*, Wiley Online Library, v. 38, n. 1, p. 14–38, 2022.
- WANG, Y. et al. Remediation of petroleum-contaminated soil using bulrush straw powder, biochar and nutrients. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, Springer, v. 98, p. 690–697, 2017.
- WANG, Y. et al. Toxicity evaluation of the metabolites derived from the degradation of phenanthrene by one of a soil ubiquitous PAHs-degrading strain *Rhodococcus qingshengii* FF. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 415, p. 125657, 2021.
- WANG, Z. et al. Calcium peroxide alleviates the waterlogging stress of rapeseed by improving root growth status in a rice-rape rotation field. *Frontiers in Plant Science*, Frontiers, v. 13, p. 1048227, 2022.
- XIANG, Y. et al. Effects of biochar application on root traits: a meta-analysis. *GCB bioenergy*, Wiley Online Library, v. 9, n. 10, p. 1563–1572, 2017.
- XIONG, B. et al. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. agilyum* inoculated biochar. *Chemosphere*, Elsevier, v. 182, p. 316–324, 2017.
- YERGIN, D. *The prize: The epic quest for oil, money and power*. New York, NY: Free Press, 2009.
- ZHANG, B.; ZHANG, L.; ZHANG, X. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 60, p. 35304–35311, 2019.
- ZHAO, L. et al. Potential toxicity risk assessment and priority control strategy for PAHs metabolism and transformation behaviors in the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, MDPI, v. 19, n. 17, p. 10972, 2022.

ZHEN, M. et al. Combination of rhamnolipid and biochar in assisting phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using *Spartina anglica*. *Journal of Environmental Sciences*, Elsevier, v. 85, p. 107–118, 2019.

ZHU, F. et al. Efficiency assessment of ZVI-based media as fillers in permeable reactive barrier for multiple heavy metal-contaminated groundwater remediation. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 424, p. 127605, 2022.

ZHU, X. et al. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: a review. *Environmental pollution*, Elsevier, v. 227, p. 98–115, 2017.