

LUCAS NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E ESTRUTURA
MORFOANATÔMICA DAS PLÂNTULAS DE *Allophylus edulis* (Saint-
Hilaire) Radlkofer (SAPINDACEAE) EM SOLO CONTAMINADO COM
PETRÓLEO E SOLO BIORREMEDIADO**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Botânica, Curso de Pós-Graduação em
Botânica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleusa Bona

Co-orientadores:

Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza

Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos

CURITIBA

2008

Aos meus pais Antonio Carlos Nogueira e Maria da Graça Pires Nogueira, mercedores de todo meu respeito e amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua presença, proteção e ajuda em todos os momentos da minha vida e em especial nestes dois anos de mestrado.

Aos meus pais Antonio Carlos Nogueira (pelo apoio, conselhos e exemplo irrepreensível de vida familiar e profissional) e Maria da Graça Pires Nogueira (pelas inúmeras palavras de incentivo, orações e pelo amor incondicional prestado em todas as ocasiões). À minha irmã Fernanda Maria Nogueira pela grande amizade, paciência e fidelidade em inúmeras situações.

À minha noiva, amiga, colega de profissão e companheira fiel Elaine Luiza Kõb por estar ao meu lado me incentivando, apoiando e ajudando com paciência, dedicação e organização.

À Prof^a. Dr^a Cleusa Bona pela confiança prestada, paciência, dedicação, profissionalismo e acima de tudo pelo imenso conhecimento que adquiri sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza pelas preciosas sugestões e correções e por sua disposição em compartilhar seu vasto conhecimento.

Ao Prof. Dr. Gedir de Oliveira Santos pela co-orientação, esclarecimento de dúvidas e grande colaboração na correção deste trabalho.

Ao biólogo Nilson Belém Filho não só pelas inúmeras ajudas na parte laboratorial deste trabalho, mas principalmente pela amizade, incentivo e apoio prestados.

Ao ex-funcionário José Carlos que, apesar do pouco tempo de convívio, foi uma das pessoas que grandemente me incentivou nos momentos difíceis.

A funcionária Vera Regina do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná na preparação do material para microscopia eletrônica de varredura.

Ao estagiário do Laboratório de Botânica Estrutural Lucas Peixoto pela imensa colaboração nas secções das amostras e confecção das lâminas.

Ao colega de mestrado Marcelo Reginato pelo compromisso e coragem em assumir a representação discente juntamente comigo.

Aos grandes amigos do mestrado Katiane Paula Bagatini, Renata Charvet Inckot, Giovanna dos Santos e Julio César Costin pelo companheirismo, cumplicidade, incentivo e ajuda em vários momentos.

Aos demais colegas de mestrado pela convivência e troca de experiências e conhecimentos.

À minha família, aos meus amigos e irmãos da Comunidade Cristã Salém que me apoiaram e me incentivaram nesta jornada.

E finalmente, a Repar – Petrobrás pelo financiamento deste trabalho e fornecimento dos solos para montagem do experimento e à Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo durante um ano.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	05
3 MATERIAL E MÉTODOS	06
3.1 COLETA DOS FRUTOS.....	06
3.2 OBTENÇÃO DO SOLO.....	06
3.3 MONTAGEM DO EXPERIMENTO.....	07
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
CAPÍTULO I - Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
CAPÍTULO II - Avaliação da estrutura morfoanatômica das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS	51
ANEXO I	57
ANEXO II	62
ANEXO III	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado

Tabela 1 – Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado com petróleo (C)..... 17

CAPÍTULO II - Avaliação da estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado

Tabela 1 – Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado com petróleo (C)..... 35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Detalhe das folhas compostas de <i>Allophylus edulis</i>	05
Figura 2 – Plântula fanerocotiledonar de <i>Allophylus edulis</i>	05
Figura 3 – Mapa referente à localização da sub-área de coleta dos solos não contaminado, biorremediado e contaminado por petróleo na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Fonte: Furtado, 2002).....	08
Figuras 4 a 9 – Coleta dos solos e montagem do experimento; 4. Detalhe do solo contaminado por petróleo; 5. Área biorremediada; 6. Área do solo não contaminado; 7. Coleta e armazenamento do solo em bandejas recobertas com papel filme; 8. Interior da casa de vegetação; 9. Identificação e disposição aleatória das bandejas.....	09
CAPÍTULO I - Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado	
Figura 1 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes de <i>Allophylus edulis</i> submetidas aos tratamentos solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão (ns – não significativo).....	19
Figura 2 - Biomassa da raiz, da parte aérea e total das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo).....	22
Figura 3 – Plântulas e sistema radicial das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> após 30 e 60 dias da semeadura respectivamente. A e D. solo não contaminado; B e E. solo biorremediado; C e F. solo contaminado com petróleo.....	23
Figura 4 – Comprimento da raiz principal das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	25

Figura 5 – Comprimento da parte aérea das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 26

Figura 6 – Área foliar das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo)..... 28

CAPÍTULO II - Avaliação da estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado

Figuras 1 a 6. Secções longitudinais do ápice da raiz principal e raízes laterais das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da semeadura; 1, 2 e 3. Ápice da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 4. Raiz lateral em solo não contaminado; 5 e 6. Raiz lateral com pêlos absorventes em solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Coifa (Cf), Meristema fundamental (Mf), Procâmbio (Pc), Protoderme (Pd) e Promeristema (Pm). Barras 1 a 6 = 200µm..... 38

Figuras 7 a 12. Secções transversais da raiz a um centímetro do ápice das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da semeadura; 7, 8 e 9. Epiderme e região cortical da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 10, 11 e 12. Região do cilindro vascular da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Endoderme (En), Epiderme (Ep), Exoderme (Ex), Metaxilema (Mx), Periciclo (P) e Protoxilema (Px). Barras 7 a 12 = 50µm..... 41

Figuras 13 a 20. Secções transversais do hipocótilo das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da semeadura; 13, 14 e 15. Detalhes da epiderme e células corticais das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 16. Detalhe de tricoma tector de plântula em solo biorremediado; 17, 18 e 19. Detalhes de parte do córtex e cilindro central das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 20. Periderme com felogênio de origem subepidérmica (seta) em plântula de solo biorremediado. Célula com substância mucilagínosa (*), Epiderme (Ep), Floema (F), Fibras (Fi), Medula (Me), Tricoma (Tr) e Xilema secundário (Xs). Barras 13, 14, 15, 17, 18 e 19 = 100µm. Barras 16 e 20 = 50µm..... 42

Figura 21 – Diâmetro total da raiz e do hipocótilo das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão (ns – não significativo).....	43
Figuras 22 a 30. Secções transversais da lâmina cotiledonar das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> após 30 dias da semeadura; 22. Região adaxial e central de plântula em solo contaminado por petróleo; 23. Região abaxial e central de plântula em solo biorremediado; 24. Feixe colateral central de plântula em solo biorremediado); 25, 26 e 27. Epiderme e mesofilo da face adaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 28, 29 e 30. Epiderme e mesofilo da face abaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Células mucilaginosas (*), Epiderme (Ep), Floema (F) e Xilema (X). Barras 22 e 23 = 200µm. Barras 24 a 30 = 100µm.....	45
Figura 31 – Espessura do cotilédone das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	45
Figuras 32 a 40. Superfícies adaxial e abaxial dos eofilos das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em microscopia eletrônica de varredura; 32, 33 e 34. Epiderme da face adaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 35, 36 e 37. Epiderme da face abaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 38. Tricoma glandular na epiderme da face abaxial de plântula em solo não contaminado; 39. Tricoma glandular na epiderme da face abaxial de plântula em solo contaminado por petróleo; 40. Tricomas glandulares e tector na epiderme da face adaxial de plântula em solo biorremediado. Barras 32 a 37 = 10µm. Barras 38 a 40 = 50µm.....	47
Figura 41 – Índice estomático do eofilo das plântulas de <i>Allophylus edulis</i> em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão (ns – não significativo).....	48

Figuras 42 a 46. Secções transversais do eofilo das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da sementeira; 42, 43 e 44. Detalhes anatómicos do limbo dos eofilos das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 45. Parênquima paliçádico com monocristais (setas) em plântula de solo não contaminado; 46. Região da nervura central de plântula em solo não contaminado. Epiderme face abaxial (Ab), Epiderme face adaxial (Ad), Estômato (Et), Floema (F), Parênquima lacunoso (PL), Parênquima paliçádico (PP) e Xilema (X). Barras 42, 43, 44 e 46 = 100µm. Barra 45 = 50µm..... 49

Figura 47 – Espessura do eofilo das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo)..... 50

RESUMO

A contaminação do solo por petróleo prejudica suas condições hidrológicas e propriedades físicas, além de ocasionar um efeito tóxico na vegetação. Geralmente, a presença de hidrocarbonetos do petróleo no solo é um obstáculo para o desenvolvimento de algumas espécies. A fitorremediação compreende o uso da vegetação no processo de descontaminação ambiental. Desta forma, a tolerância das plantas ao petróleo e a habilidade de sobreviverem em solo contaminado com este poluente são condições necessárias para o sucesso desta técnica. *Allophylus edulis* (vacum) ocorre na área da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar/Petrobrás), localizada no município de Araucária-PR, onde ocorreu um grande vazamento de petróleo no ano de 2000. Esta espécie apresenta boa capacidade de regeneração e crescimento rápido, sendo recomendada na recuperação de ecossistemas degradados. Existem poucas informações quando se trata de espécies nativas em solo contaminado e solo biorremediado. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado, provenientes da área da Repar, na germinação, desenvolvimento e estrutura morfoanatômica de *A. edulis*. O experimento, montado em casa de vegetação, consistiu em três tratamentos com cinco repetições: solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Após 30 dias da semeadura, foram coletadas amostras da raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo para análise anatômica. A porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram registrados durante 30 dias, enquanto que a análise do desenvolvimento foi realizada após 30 e 60 dias da semeadura. As médias referentes à porcentagem de germinação, IVG, biomassa da parte aérea e área foliar não diferiram estatisticamente entre os tratamentos após 30 dias. Por outro lado, a biomassa da raiz e o comprimento da parte aérea das plântulas do tratamento NC apresentaram as menores médias tanto em 30 quanto 60 dias. A estrutura interna do hipocótilo e cotilédone não apresentou modificações anatômicas. Entretanto, foram verificadas algumas alterações nas epidermes da raiz e do eofilo bem como na região meristemática da raiz nas plântulas do tratamento C. Através dos dados obtidos, pode-se concluir que *A. edulis* foi capaz de germinar e se desenvolver no solo contaminado por petróleo e solo biorremediado da área da Repar, demonstrando ser uma espécie tolerante à contaminação dos solos com hidrocarbonetos e possivelmente fitorremediadora.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos; Fitorremediação; Plântula; Desenvolvimento.

ABSTRACT

The soil contamination by crude oil harms their physical properties and moisture conditions, besides causing a toxic effect in vegetation. Usually, the presence of crude oil in soil is an obstacle for the development of some species. The phytoremediation uses the vegetation in the process of environmental cleaning. This way, the tolerance of plants to the crude oil and the ability of they survive in polluted soil with this pollutant are necessary conditions for the success of this technique. However, the information on the toxicity of this pollutant to the plants are limited. *Allophylus edulis* (vacum) occurs in the area of the Repar/Petrobrás, in Araucária-PR, contaminated in 2000 by crude oil. This species presents good regeneration capacity and fast growth, being recommended in the recovery of degraded ecosystems. There are few information when it is treated of native species in polluted soil and bioremediated soil. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of the polluted soil by crude oil and bioremediated soil, coming of the area of Repar, on germination, development and anatomical structure of *A. edulis*. The experiment consisted of three treatments with five repetitions: polluted soil by crude oil (C), bioremediated soil (BR) and uncontaminated soil (NC). After 30 days of sowing, samples of the root, hipocotyl, cotyledon and eophyll were collected for anatomical analysis. The percentage and index of germination speed (IVG) were registered for 30 days, while the analysis of the development was accomplished after 30 and 60 days of sowing. The averages regarding the percentage of germination, IVG, biomass of the aerial part and foliate area did not differ significantly among the treatments after 30 days. On the other hand, the biomass of the root and the length of the aerial part of the plants of the treatment NC presented the smallest averages in 30 and 60 days. The internal structure of the hipocotyl and cotyledon did not present anatomical modifications. However, some alterations were verified in the epidermal region of the root and of the eophyll as well as in the meristematic region of the root in the plants of the treatment C. It can be concluded that *A. edulis* was capable to germinate and to develop either in the polluted soil by crude oil and bioremediated soil of the area of Repar, demonstrating to be a tolerant species to the contamination of soils with hydrocarbons.

Key-words: Hydrocarbons; Phytoremediation; Seedling; Development.

1. INTRODUÇÃO

Na tarde do dia 16 de julho de 2000, quatro milhões de litros de óleo cru vazaram, durante duas horas, de um duto da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar - Petrobrás), localizada no município de Araucária – PR. O acidente foi provocado pela ruptura de uma junta de expansão que faz a ligação entre os tubos e o tanque de refino. Cerca de 2,7 milhões de litros de óleo que vazaram ficou retida numa área dentro da refinaria, enquanto que aproximadamente 1,3 milhões de litros escoaram para o Rio Barigüi, a dez quilômetros de encontro com o Rio Iguaçu. Portanto, além de contaminar as águas destes dois importantes rios, o vazamento de óleo contaminou também o solo, afetando a flora e fauna da região (FREITAS, 2000).

O acidente na Repar foi considerado o segundo maior derramamento de petróleo no Brasil. Após o acidente, grande parte do óleo derramado foi removida fisicamente em três meses. Dos quatro milhões de litros, cerca de 20% (570 mil) evaporou nos primeiros dias. Nos três meses seguintes, aproximadamente 1,3 milhões de litros foram retirados dos rios Barigüi e Iguaçu e em suas margens, ao longo de 65km, com mantas absorventes e barreiras flutuantes para conter o avanço da mancha. Dos 2,7 milhões de litros de óleo retidos na área interna da Petrobrás, a maior parte foi recuperada de imediato por bombas a vácuo e manualmente. Restaram 132 mil litros de petróleo no solo, dos quais 36 mil foram removidos por meio de um sistema de canalização que arrasta o óleo do fluxo subterrâneo para separadores. Portanto, os 96 mil litros restantes desse óleo, agregados no solo da floresta nativa, inspiraram o emprego da biorremediação com bactérias heterotróficas e fungos hidrocarbonoclasticos (FURTADO, 2002). Porém, existem algumas áreas na região do acidente em que o solo ainda não foi biorremediado.

O derramamento de petróleo no meio ambiente representa um fator de risco aos ecossistemas e à saúde humana, além de ser um dos maiores contaminantes de solos em todo o mundo (BANKS e SCHULTZ, 2005). O efeito de um derramamento depende da interação de vários fatores, como a quantidade de óleo liberada no ambiente, fatores geográficos e biota da área afetada, entre outros (KINAKO, 1981). O petróleo é uma complexa mistura de hidrocarbonetos, metais pesados, enxofre, nitrogênio e oxigênio (BAKER,

1970). Alguns compostos presentes no petróleo são conhecidos por sua ação mutagênica e carcinogênica (BANKS e SCHULTZ, 2005).

A necessidade de proteger ambientes de vários tipos de poluição é uma questão muito importante e urgente. Atualmente, como consequência da atividade antropogênica, as plantas estão cada vez mais suscetíveis a substâncias potencialmente danosas. LARCHER (2000) ressalta que o excessivo consumo de combustíveis fósseis é um dos principais fatores que contribuem na disseminação de substâncias tóxicas para a atmosfera, água e solo. De acordo com TISCHER e HUBNER (2002), o uso de combustíveis fósseis por muitos anos tem conduzido a sérios problemas ambientais, pois grande quantidade das substâncias tóxicas são frequentemente lançadas no ambiente durante a extração, transporte e utilização destes produtos.

A partir dos anos 80, a contaminação dos solos com hidrocarbonetos se agravou mundialmente, gerando diversos efeitos negativos no ambiente (XU e JOHNSON, 1997). Segundo KECHAVARZI *et al.* (2007), a contaminação do solo devido a vazamentos acidentais ou não de hidrocarbonetos tem sido freqüente. De acordo com XU e JOHNSON (1997), os hidrocarbonetos do petróleo podem ocasionar alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Um dos efeitos mais importantes do petróleo no solo é a redução na capacidade de retenção de água, tornando-o hidrofóbico e hidrorrepelente (ROY *et al.*, 2003). Desta forma, a hidrofobicidade dos solos contaminados com petróleo pode induzir um estresse hídrico (LI *et al.*, 1997) e de oxigênio (RENTZ *et al.*, 2003) nas plantas.

A presença de hidrocarbonetos de petróleo no solo é um obstáculo para o crescimento e desenvolvimento das plantas (LI *et al.*, 1997), ocasionando inibição na germinação de sementes (ADAM e DUNCAN, 2002; AGBOGIDI *et al.*, 2006), redução da biomassa (MERKL *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007) e inibição da divisão celular (ACHUBA, 2006; BARDELI-DA-SILVA, 2006). De acordo com ACHUBA (2006), as plantas apresentam várias mudanças bioquímicas associadas à contaminação do solo com óleo cru, dentre elas: inibição da atividade de algumas enzimas (amilase e fosforilase), redução no conteúdo de clorofila, além do aumento na quantidade de aminoácidos e açúcares. CHUPAKHINA e MASLENNIKOV (2004) verificaram alterações nos

conteúdos de antocianina, ácido ascórbico e riboflavina em plantas crescendo sob condições de poluição com produtos do petróleo.

Atualmente, existem métodos para minimizar os impactos negativos da contaminação do solo. Entre eles, destaca-se a biorremediação, ou seja, o uso de organismos vivos a fim de remover os poluentes do solo, da água e da atmosfera (PANDEY *et al.*, 2000; COLLIN, 2001). Alguns trabalhos têm confirmado a diminuição da toxicidade dos solos contaminados por petróleo depois que foram submetidos à biorremediação (DORN e SALANITRO, 2000; OGBONNA *et al.*, 2007). Segundo ODOKUMA e DICKSON (2003), o uso de equipamentos de baixo custo e que não ocasionam impactos no meio ambiente são algumas das vantagens da biorremediação. A utilização combinada de microrganismos, fertilizantes e vegetação torna o processo de biorremediação de solos contaminados mais eficiente (HUTCHINSON *et al.*, 2001; OGBONNA *et al.*, 2007).

A fitorremediação compreende o uso da vegetação e de microrganismos associados às raízes no processo de limpeza ou descontaminação ambiental. O estudo da toxicidade do petróleo nas plantas tem contribuído para o desenvolvimento de tecnologias na fitorremediação, pois uma das principais condições para o sucesso desta técnica é o conhecimento da habilidade de algumas plantas em tolerar e se desenvolver no solo contaminado com petróleo (PILON-SMITS, 2005). De acordo com SUNG *et al.* (2001), a fitorremediação depende da constituição do solo, das propriedades físico-químicas do contaminante e das características da planta, tais como: rápida germinação (ADAM e DUNCAN, 2002); rápido e vigoroso crescimento (TISCHER e HUBNER, 2002); aumento na biomassa da raiz e da parte aérea (HUTCHINSON *et al.*, 2001); distribuição ampla das raízes (HUTCHINSON *et al.*, 2001; MERKL *et al.*, 2005; KECHAVARZI *et al.*, 2007); alta competitividade e taxa reprodutiva, além da tolerância ao contaminante (TISCHER e HUBNER, 2002). Segundo ADAM e DUNCAN (1999), a fitorremediação é uma área relativamente nova do interesse científico e também aplicável em casos de contaminação do solo com outros poluentes orgânicos derivados do petróleo, como por exemplo, óleo diesel (ADAM e DUNCAN, 2002; KECHAVARZI *et al.*, 2007), fenantreno (ALKIO *et al.*, 2005), benzeno, tolueno e xileno (SUOMINEN *et al.*, 2000).

MERKL *et al.* (2004), avaliando o efeito tóxico do óleo cru no crescimento de gramíneas e leguminosas, identificaram algumas espécies com potencial para serem usadas na fitorremediação. Segundo estes autores, as gramíneas são usualmente utilizadas por causa de seu crescimento rápido e ampla capacidade para formar raízes ramificadas. De acordo com MERKL *et al.* (2005), o óleo cru pode alterar a biomassa e também a morfologia das raízes, influenciando diretamente na aquisição de água e nutrientes bem como no crescimento da planta e o seu uso na fitorremediação.

Outro aspecto importante é a utilização de plantas no processo de revegetação de áreas contaminadas com resíduos oleosos. Segundo MAYER *et al.* (2005), *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg é uma espécie apta para recompor áreas contaminadas por petróleo devido a sua tolerância a este tipo de contaminação. Além disso, algumas espécies podem ser utilizadas no monitoramento do solo contaminado com óleo. MALALLAH *et al.* (1996) afirmam que *Vicia faba* pode ser usada como bioindicadora da poluição de solos com óleo. GILL *et al.* (1992) sugerem que *Chromolaena odorata* (L.) K.&R. também pode ser utilizada como bioindicadora de áreas poluídas com óleo. No entanto, existem poucas citações de espécies nativas que possam ser utilizadas para esse fim.

Allophylus edulis (Saint-Hilaire) Radlkofer, objeto de estudo do presente trabalho, ocorre na área da Repar onde aconteceu o acidente. Em estudo fitossociológico realizado em um trecho de Floresta Ombrófila Mista Aluvial situado no terreno da Repar, BARDDAL (2002) afirma que *A. edulis* é a maior caracterizadora do sub-bosque da floresta estudada, apresentando abundante número de indivíduos jovens. *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae), conhecida popularmente como vacum, possui hábito arbustivo ou arbóreo e folhas compostas trifolioladas (Figura 1). É uma espécie ciófito e seletiva higrófito que ocorre em matas primárias, capoeiras, capoeirões e beira de rios (REITZ, 1980). A germinação das sementes de *A. edulis* é do tipo fanerocotiledonar (Figura 2), tem início ao oitavo dia e pode ser encerrada no décimo quinto dia após a semeadura (ABREU *et al.*, 2005). Segundo LORENZI (1992), *A. edulis* se desenvolve tanto em solos úmidos quanto rochosos, apresentando boa capacidade de regeneração natural e crescimento rápido, sendo recomendada na recuperação de ecossistemas degradados.



Figura 1 - Detalhe das folhas compostas de *Allophylus edulis*.
Figura 2 - Plântula fanerocotiledonar de *Allophylus edulis*.

No Brasil, ainda são escassos os trabalhos a respeito da germinação, desenvolvimento e estrutura morfoanatômica de espécies nativas cultivadas em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. Desta forma, há uma crescente necessidade de estudos que avaliem os efeitos do solo contaminado com petróleo e solo biorremediado e que forneçam informações sobre espécies potencialmente fitorremediadoras.

2. OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho é analisar a germinação de sementes, o desenvolvimento e a estrutura das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. em solo contaminado por petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado, a fim de verificar se os solos contaminado e biorremediado causam alterações estruturais e no desenvolvimento de *A. edulis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DOS FRUTOS

Os frutos de *Allophylus edulis* foram coletados aleatoriamente de 12 indivíduos, com uma distância mínima de 100m um do outro, em duas épocas: primeiramente em dezembro de 2005, para montagem do experimento relacionado à anatomia, e em novembro de 2006 para montagem do experimento referente à análise da germinação e desenvolvimento. As coletas foram realizadas no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, próxima a área da Embrapa Florestas. Posteriormente, os frutos foram transportados ao Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná para serem macerados e despolidos em água corrente para obtenção das sementes. No mesmo laboratório, foi realizado um teste de germinação a fim de verificar a viabilidade das sementes. O teste consistiu em quatro repetições de 25 sementes, a temperatura constante de 25°C, com substrato contendo 20g de vermiculita e 60ml de água.

3.2. OBTENÇÃO DO SOLO

Após o acidente na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar-Petrobrás) que ocorreu no ano de 2000, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente para que fosse feita a biorremediação do solo com bactérias heterotróficas e fungos hidrocarbonoclasticos. A Petrobrás conseguiu criar uma técnica própria de descontaminação de hidrocarbonetos baseada na fomentação de microrganismos degradadores presentes no próprio solo. Esta técnica surgiu com a finalidade de remover 96 mil litros de petróleo retidos no solo em um perímetro de aproximadamente 15 hectares, entre o local do vazamento e o Rio Barigüi. Esta região contaminada foi dividida em 12 sub-áreas (Figura 3) destinadas à biorremediação do solo. No entanto, algumas regiões dentro destas sub-áreas permaneceram isoladas sem nenhum tipo de intervenção no solo.

As sub-áreas que permaneceram sob biorremediação passaram por procedimentos comuns entre elas. A população microbiana se desenvolveu pela chamada bioaugmentação. Isso é feito pela inoculação de fungos e bactérias autóctones (do solo local) desenvolvidos nas áreas de biorremediação dos resíduos. O solo, contendo esses organismos devidamente preparados por meio de controle nutritivo, foi peneirado em malha de 10mm e armazenado em big-bags. Depois do preparo, o inóculo foi espalhado nas áreas contaminadas pelo óleo por um trator agrícola de grade aradora.

O solo utilizado na montagem do experimento foi obtido na sub-área três (Figura 3) localizada no próprio terreno da Repar, município de Araucária/PR. Foram coletados solo contaminado, solo biorremediado e solo não contaminado em áreas próximas a cerca de 5m umas das outras. A coleta do solo contaminado (Figura 4) foi realizada na área em que não sofreu intervenção, enquanto que o solo biorremediado (Figura 5) foi coletado no local onde a vegetação foi retirada para a biorremediação do solo e, finalmente, o solo não contaminado (Figura 6) foi obtido em uma área recoberta pela vegetação nativa. Posteriormente, o solo foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas (Figura 7).

3.3. MONTAGEM DO EXPERIMENTO

O experimento, montado em casa de vegetação (Figura 8) no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, foi composto por três tratamentos: solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições com 50 sementes cada. As bandejas (29cm de comprimento x 22cm de largura x 6cm de altura) foram dispostas aleatoriamente (Figura 9) e permaneceram sob nebulização de 20 segundos a cada 30 minutos. Adotou-se ao experimento o delineamento inteiramente casualizado, pois suas unidades experimentais permaneceram sob condições homogêneas.

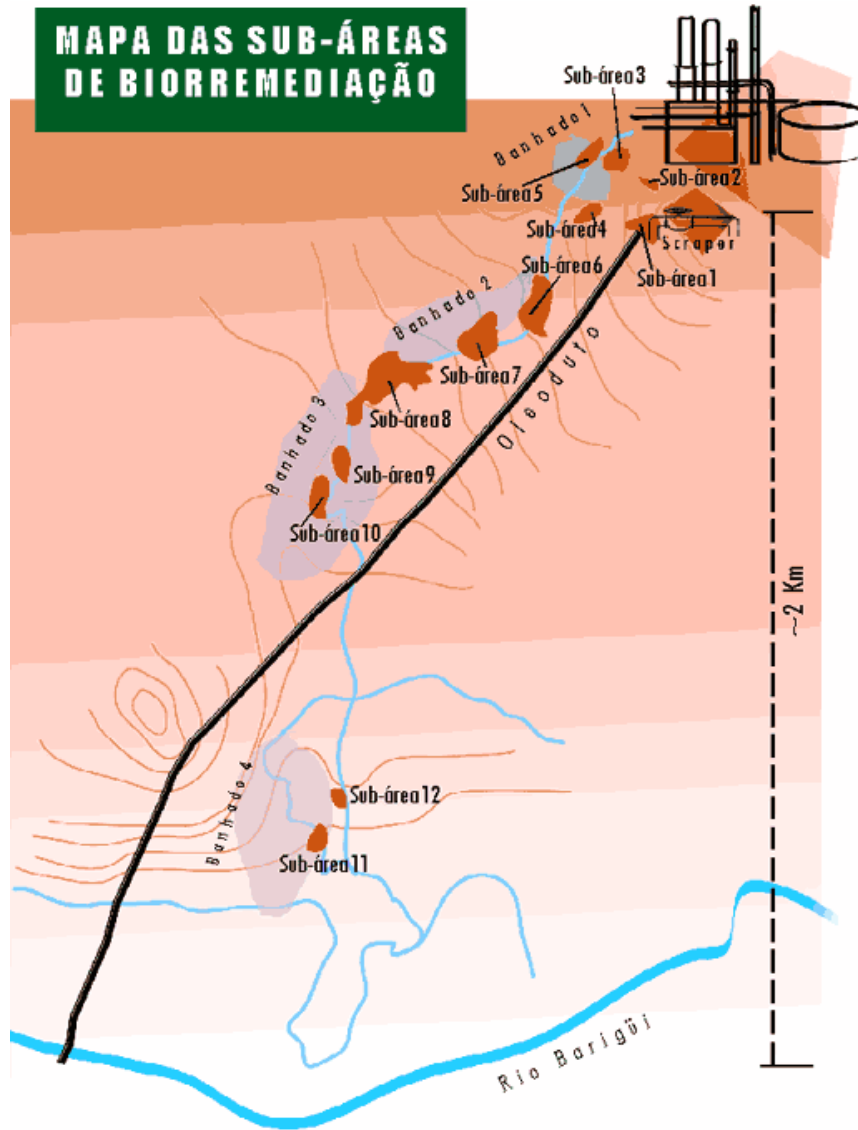


Figura 3 – Mapa referente à localização da sub-área de coleta dos solos não contaminado, biorremediado e contaminado por petróleo na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Fonte: Furtado, 2002).



Figuras 4 a 9 – Coleta dos solos e montagem do experimento; 4. Detalhe do solo contaminado por petróleo; 5. Área biorremediada; 6. Área do solo não contaminado; 7. Coleta e armazenamento do solo em bandejas recobertas com papel filme; 8. Interior da casa de vegetação; 9. Identificação e disposição aleatória das bandejas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, bem como a discussão dos mesmos, foram apresentados sob a forma de capítulos, sendo que cada capítulo corresponde a um artigo, que foi organizado de acordo com as normas da revista na qual será submetido. O capítulo I, intitulado “Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado”, está de acordo com as normas da revista *Rodriguésia* (Anexo I), ISSN 0370-6583. A revista é brasileira e está classificada como Qualis A. O capítulo II, referente à “Avaliação da estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado”, está de acordo com as normas da revista nacional *Acta Botanica Brasílica* (Anexo II), ISSN 0102-3306 e classificada como Qualis A.

**CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS
PLÂNTULAS DE *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (SAPINDACEAE) EM
SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEIADO**

RESUMO

(Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado).

A presença de petróleo no solo é um obstáculo para o desenvolvimento de algumas espécies, podendo inibir a germinação de sementes. A tolerância das plantas e a habilidade de germinarem em solo contaminado são condições necessárias para a fitorremediação. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado na germinação e desenvolvimento de *Allophylus edulis*. O experimento consistiu em três tratamentos: solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). A porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram registrados durante 30 dias, enquanto que a análise do desenvolvimento foi realizada após 30 e 60 dias. A porcentagem de germinação, IVG, biomassa da parte aérea e área foliar não diferiram estatisticamente entre os tratamentos após 30 dias, enquanto que a biomassa da raiz e o comprimento da parte aérea nas plântulas do tratamento NC foram significativamente menores. Após 60 dias, a biomassa da raiz e área foliar foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos. Pode-se concluir que *A. edulis* foi capaz de germinar e se desenvolver em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado, apresentando potencial para fitorremediação.

Palavras-chave: hidrocarbonetos, fitorremediação, plântula, crescimento, biomassa.

ABSTRACT

(Evaluation of the germination and development of *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) seedlings in polluted soil by crude oil and bioremediated soil).

The presence of crude oil in soil is an obstacle for the development of some species, causing inhibition on seeds germination. The tolerance of plants and the ability for germinate in polluted soil are necessary conditions in the phytoremediation. The objective of this work was to evaluate the effects of the polluted soil by crude oil and bioremediated soil on germination and development of *Allophylus edulis*. The experiment consisted of three treatments: polluted soil by crude oil (C), bioremediated soil (BR) and uncontaminated soil (NC). The percentage and index of germination speed (IVG) were registered for 30 days, while the analysis of the development was accomplished after 30 and 60 days. The percentage of germination, IVG, biomass of the aerial part and foliate area didn't differ significantly among the treatments after 30 days, while the biomass of the root and length of the aerial part of the plants of the treatment NC were significantly lower. After 60 days, the biomass of the root and foliate area were statistically different among the treatments. It can be concluded that *A. edulis* was capable to germinate and to develop in polluted soil by crude oil and bioremediated soil, presenting potential for phytoremediation.

Key words: hydrocarbons, phytoremediation, seedling, growing, biomass.

Introdução

As plantas podem ser divididas em dois grupos distintos: espécies sensíveis, com sensibilidade variada aos efeitos de um contaminante e que podem morrer devido à poluição, e espécies tolerantes, as quais sobrevivem mesmo expostas a um poluente (Malallah *et al.* 1996). A tolerância das plantas ao petróleo e a habilidade de germinarem em solo contaminado com este poluente varia grandemente entre as espécies, assim como dentro da mesma espécie (Adam & Duncan 1999). Segundo Banks & Schultz (2005), as sementes de diversas espécies respondem de forma variável quando submetidas à germinação em solo contaminado por petróleo.

Adam & Duncan (1999) verificaram uma ampla diferença na germinação em gramíneas submetidas ao óleo diesel, observando certas espécies com sucesso em germinarem em baixos níveis de contaminação e outras intolerantes ao óleo diesel. Banks & Schultz (2005) constaram sensibilidade significativa em *Lactuca sativa* L. submetida a testes de germinação com solo contaminado por petróleo, indicando o uso desta espécie como bioindicadora de contaminação ambiental.

A germinação e o estabelecimento de plantas são amplamente afetados em ambientes estressados, com diminuição do vigor e, conseqüentemente, redução nas expectativas para o estabelecimento da cobertura vegetal (Willian *et al.* 1982). Altas concentrações de petróleo no solo podem impedir a germinação de sementes (Chupakhina & Maslennikov 2004) e desta forma, o contaminante pode penetrar na semente e, conseqüentemente, ocasionar a morte do embrião, ou ainda pode formar uma película sobre a semente, agindo como uma barreira física e impedindo a entrada de oxigênio e água, elementos essenciais no processo germinativo (Baker 1970; Adam & Duncan 2002).

A contaminação por hidrocarbonetos de petróleo frequentemente gera uma condição de hidrorrepelência no solo (Morley *et al.* 2005), dificultando a retenção de água e desencadeando efeitos adversos no desenvolvimento das plantas (Li *et al.* 1997), tais como: inibição na germinação de sementes (Adam & Duncan 2002; Agbogidi *et al.* 2006), menor crescimento (Adam & Duncan 1999; Merkl *et al.* 2004) e redução da biomassa (Malallah *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2007).

Em 16 de julho de 2000, quatro milhões de litros de óleo vazaram na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar - Petrobrás) localizada no município de Araucária - PR. Este episódio, além de contaminar as águas do rio Barigüi e Iguaçu, contaminou também o solo, afetando a flora e fauna da região (Freitas 2000). Após o acidente, na área onde ocorreu o vazamento foi feita a remoção mecânica do petróleo superficial e da vegetação morta e posterior biorremediação do solo com bactérias heterotróficas e fungos hidrocarbonoclasticos (Furtado 2002). Porém, existem algumas áreas na região do acidente em que o solo ainda não foi biorremediado.

Allophylus edulis (Saint-Hilaire) Radlkofer, objeto de estudo do presente trabalho, ocorre na área da Repar onde aconteceu o acidente. Pertencente a família Sapindaceae e conhecida popularmente como vacum, *A. edulis* possui hábito arbustivo ou arbóreo, é uma espécie ciófito e seletiva higrófito que ocorre em matas primárias, capoeiras, capoeirões e beira de rios (Reitz 1980). Segundo Lorenzi (1992), *A. edulis* se desenvolve tanto em solos úmidos quanto rochosos e apresenta boa capacidade de regeneração natural e crescimento rápido, sendo recomendada na recuperação de ecossistemas degradados.

A biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos para remover contaminantes do solo, da água e da atmosfera (Pandey *et al.* 2000; Collin 2001). Segundo Dorn & Salanitro (2000), a biorremediação de solo contaminado por óleo cru

pode reduzir sua toxicidade, facilitando a restauração da vegetação em ambientes contaminados. Alguns trabalhos têm mostrado aumento na germinação de sementes em solos biorremediados (Dorn & Salanitro 2000; Ogbonna *et al.* 2007), porém ainda são escassos os estudos sobre o desenvolvimento de espécies nativas do Brasil nestes solos. Como uma alternativa da biorremediação, a técnica denominada fitorremediação utiliza a vegetação para remover, degradar ou inativar contaminantes do solo, os quais podem ser absorvidos pelas raízes e subsequentemente armazenados ou metabolizados pelas plantas (Merkl *et al.* 2005). De acordo com Sung *et al.* (2001), a fitorremediação depende da constituição do solo, das propriedades físico-químicas do contaminante e das características da planta.

O estudo dos efeitos do petróleo e seus derivados, no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais, teve grande impulso a partir dos anos 90 devido a constatação de que as plantas, e os microrganismos associados a elas, contribuem grandemente na descontaminação de solos contaminados com petróleo (Cunningham *et al.* 1996). A análise da germinação é considerada um estudo de curto prazo capaz de avaliar os efeitos da toxicidade gerada pela contaminação do solo. Nos estudos de germinação, sementes são plantadas em uma pequena quantidade de solo contaminado. Após um período pré-determinado, as sementes que germinaram são contabilizadas e os resultados comparados com os dados da germinação de sementes em solo não contaminado (Banks & Schultz 2005). No entanto, existem poucas informações quando se trata de espécies nativas se desenvolvendo em solo contaminado com petróleo. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado na germinação e no desenvolvimento das plântulas de *Allophylus edulis*.

Material e Métodos

Os frutos de *Allophylus edulis* foram coletados, em novembro de 2006, aleatoriamente de 12 indivíduos com uma distância mínima de 100 m um do outro. A coleta foi realizada no município de Colombo/PR, região metropolitana de Curitiba, próxima a área da Embrapa Florestas. Posteriormente, os frutos foram transportados ao Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná para serem macerados e despulpados em água corrente para obtenção das sementes.

O solo utilizado na montagem do experimento foi obtido na área da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar-Petrobrás), município de Araucária/PR, onde ocorreu o vazamento de petróleo no ano de 2000. Após o acidente na Repar, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente para que fosse feita a biorremediação do solo com microrganismos. No entanto, algumas áreas permaneceram isoladas sem nenhum tipo de intervenção no solo. Foram coletados solo contaminado, solo biorremediado e solo não contaminado em áreas próximas a cerca de 5 m umas das outras. A coleta do solo contaminado foi realizada na área em que não sofreu intervenção, enquanto que o solo biorremediado foi coletado no local onde a vegetação foi retirada para a biorremediação do solo e, finalmente, o solo não contaminado foi obtido em uma área recoberta pela vegetação nativa.

A determinação do teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foi realizada através da metodologia ASTM D5765 pelo Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC), enquanto que a caracterização dos atributos físico-químicos dos solos foi realizada pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal do Paraná (Tab. 1).

Tabela 1 – Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado com petróleo (C).

	NC	BR	C
Areia (%)	26,1	19,7	24,8
Silte (%)	21,3	35,2	25,2
Argila (%)	52,5	45,0	50,0
pH (CaCl ₂)	3,70	5,80	4,20
Alumínio (cmol _c dm ⁻³)	6,00	0,00	4,10
Carbono (g dm ⁻³)	23,8	19,6	26,9
Nitrogênio (g kg ⁻¹)	2,4	1,7	2,2
Fósforo (mg dm ⁻³)	3,50	1,20	1,60
Potássio (cmol _c dm ⁻³)	0,10	0,21	0,24
Cálcio (cmol _c dm ⁻³)	0,40	16,80	2,00
Magnésio (cmol _c dm ⁻³)	0,20	1,80	1,50
TPH (mg kg ⁻¹)	243	2713	5809

O experimento, montado em casa de vegetação no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, foi composto por três tratamentos: solo contaminado (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições de 50 sementes cada, totalizando 250 sementes por tratamento. O solo referente a cada tratamento foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas (29cm de comprimento x 22cm de largura x 6cm de altura). Estas foram dispostas aleatoriamente e permaneceram sob nebulização de 20s a cada 30min. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, pois suas unidades experimentais permaneceram sob condições homogêneas.

A germinação foi acompanhada durante 30 dias a fim de se obter dados para análise da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG), os quais foram registrados diariamente no período avaliado. As temperaturas mínima e

máxima também foram registradas diariamente durante todo o período de avaliação (mín. = 17,5°C e máx. = 37,5°C). No cálculo do IVG, foi empregada a fórmula sugerida por Maguire (1962): $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$, sendo:

IVG = índice de velocidade de germinação;

G_1 , G_2 e G_n = número de sementes germinadas na primeira, segunda e última contagem;

N_1 , N_2 e N_n = número de dias após o plantio das sementes.

A análise do desenvolvimento foi realizada após 30 e 60 dias da semeadura, utilizando-se três plântulas por bandeja, totalizando 15 por tratamento. Desta forma, foram mensurados o comprimento e a biomassa da raiz e da parte aérea da plântula, bem como a área dos eofilos (primeiras folhas). A mensuração da parte aérea foi feita da região do colo até o ápice caulinar, enquanto que o comprimento da raiz foi mensurado a partir da região do colo até o ápice da raiz principal. Estas duas variáveis foram estimadas com auxílio de uma régua milimetrada. Para determinação da biomassa seca, as plântulas foram prensadas, desidratadas em estufa à 70°C durante 48 horas e posteriormente pesadas em balança digital. A partir das plântulas prensadas e desidratadas foram separados os eofilos e esses digitalizados em scanner e suas respectivas áreas estimadas pelo programa Sigma Scan Pro (Version 5.0, SPSS Inc., Chicago IL, USA).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa MSTATC[®]. Primeiramente, foram calculados as médias e desvio padrão de todas as variáveis. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A germinação de *A. edulis* ocorreu após 10 dias da sementeira e encerrou-se no décimo nono dia. As sementes germinaram igualmente tanto em solo contaminado por petróleo e biorremediado quanto em solo não contaminado. As médias referentes à percentagem de germinação e IVG não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Fig. 1).

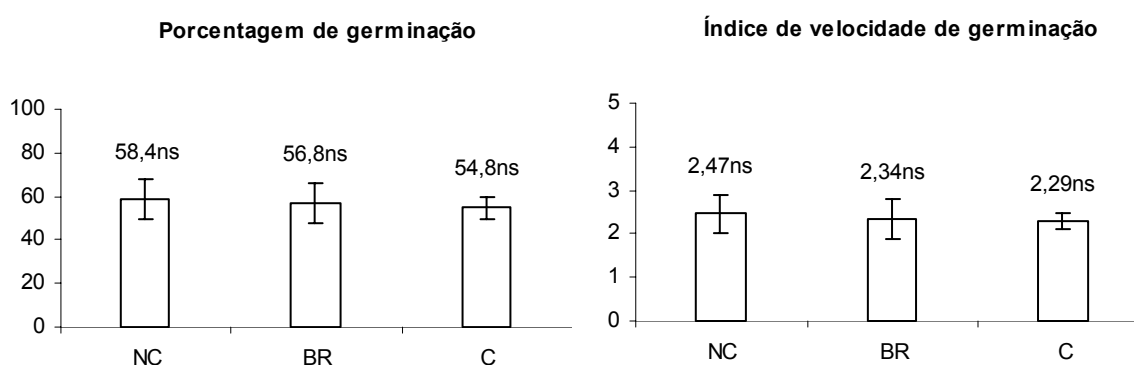


Figura 1 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação das sementes de *Allophylus edulis* submetidas aos tratamentos solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão (ns – não significativo).

Li *et al.* (1997) verificaram que a percentagem de germinação de *Hordeum vulgare* L. crescendo em solo contaminado por hidrocarbonetos (40000 mg kg^{-1} TEH), solo biorremediado (20000 mg kg^{-1} TEH) e não contaminado também não diferiu estatisticamente. Merkl *et al.* (2004), analisando a germinação de oito espécies (duas gramíneas e seis leguminosas) em solo contaminado por óleo cru, não observaram alterações significativas na germinação de sete espécies quando comparadas ao solo controle.

Diferentemente dos resultados encontrados na germinação de *A. edulis*, grande parte da literatura relata uma redução na germinação de sementes em solo contaminado por petróleo e derivados. Dorn & Salanitro (2000) constataram que a germinação de *Zea*

mays L., *Triticum aestivum* L. e *Avena sativa* L. foi significativamente afetada em solo contaminado por óleo cru leve, porém melhorou com a biorremediação do solo. Gill *et al.* (1992) observaram uma redução no número de sementes germinadas de *Chromolaena odorata* (L.) K.&R. em solo contaminado com petróleo. Agbogidi *et al.* (2006) verificaram um declínio na porcentagem de germinação das sementes de *Dennettia tripetala* (Bak.) submetidas a diferentes níveis de concentração de óleo cru. Estes autores atribuem esta redução à tensão gerada na disponibilidade de oxigênio em solos contaminados. Desta forma, esta tensão pode afetar o sistema respiratório do embrião e conseqüentemente sua viabilidade. Adam & Duncan (1999) observaram um decréscimo na germinação da maioria das 22 espécies analisadas após 14 dias em solo contaminado com óleo diesel.

Segundo Baker (1970), o efeito inibitório do óleo na germinação pode ser atribuído à barreira física formada pelo contaminante ao redor das sementes, impedindo assim a passagem de oxigênio e água ao embrião. De acordo com Adam & Duncan (2002), a baixa germinação de sementes em solos contaminados com óleo diesel se deve principalmente à fração volátil e à impermeabilidade do óleo, bem como ao tempo após a contaminação. Estes autores observaram um declínio na porcentagem de germinação de sementes em solo contaminado por óleo diesel no dia do plantio em comparação ao solo contaminado três semanas antes da semeadura.

Bardelli da Silva (2006) constatou que a porcentagem e o índice de velocidade de germinação em *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs foram menores no tratamento com solo contaminado com óleo diesel há 60 dias e maiores no solo contaminado há 120 e 210 dias antes do plantio. Rezende (2006) observou que a porcentagem e velocidade de germinação em *Schinus terebinthifolius* Raddi foram afetadas significativamente no tratamento com solo contaminado com óleo diesel há 30

dias, enquanto que no solo contaminado há 90 e 180 dias antes do plantio a germinação não foi afetada. De acordo com Bardelli da Silva (2006) e Rezende (2006), quanto maior foi o tempo após a contaminação, menores foram os efeitos danosos sobre a germinação das espécies por eles estudadas.

Inckot (2007) constatou que a porcentagem e a velocidade de germinação de *Mimosa pilulifera* Bentham não foram afetadas significativamente pelo solo contaminado e solo biorremediado procedentes da mesma área na Repar, atribuindo este fato ao teor não fitotóxico de hidrocarbonetos, à ausência de compostos voláteis no solo e ao tempo após a contaminação. Portanto, estes fatores citados por Inckot (2007) também podem explicar a similaridade na germinação de *A. edulis* entre os tratamentos analisados neste trabalho. Além disso, sugere-se que, tanto tempo após a contaminação do solo (mais de seis anos), provavelmente as moléculas de hidrocarbonetos estão adsorvidas às partículas do solo e, dificilmente, penetrariam nas sementes ou formariam uma película sobre as mesmas.

De acordo com a Figura 2, a biomassa da raiz das plântulas do tratamento solo não contaminado apresentou a menor média e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos tanto em 30 quanto 60 dias. Por outro lado, a biomassa da parte aérea não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos após 30 dias da semeadura, porém aos 60 dias, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos solo biorremediado e não contaminado. Semelhantemente à biomassa da parte aérea após 30 dias do plantio, a biomassa total das plântulas não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, aos 60 dias após a semeadura, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

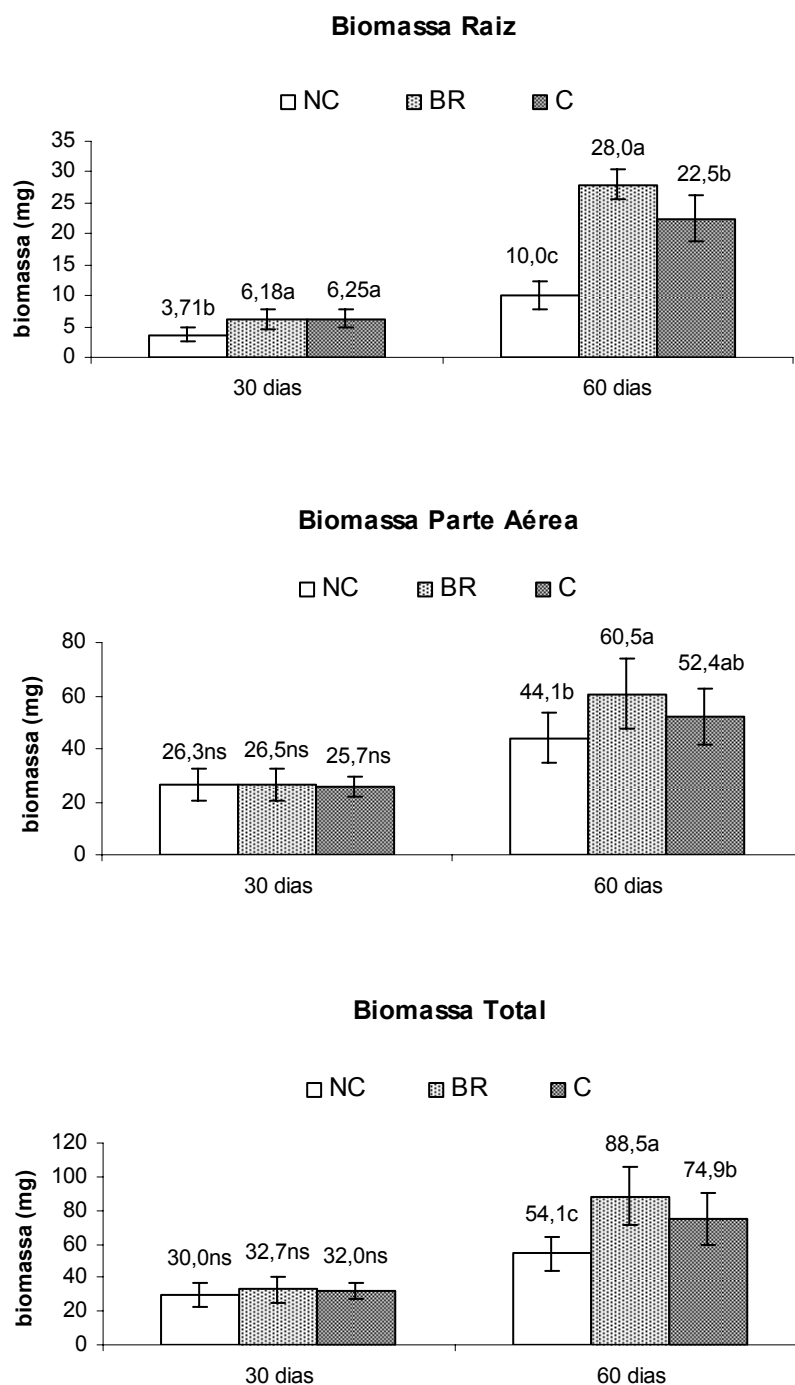


Figura 2 - Biomassa da raiz, da parte aérea e total das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo).

A biomassa das raízes de *H. vulgare* no solo contaminado por hidrocarbonetos e solo biorremediado foi estatisticamente similar à biomassa das plantas do solo controle (Li *et al.* 1997). Inckot (2007) verificou que a biomassa radicial de *M. pilulifera* foi

estatisticamente semelhante entre os solos contaminado por petróleo, biorremediado e não contaminado, provenientes da Repar, após 30, 60 e 90 dias da semeadura.

Adam & Duncan (1999), por sua vez, observaram redução da biomassa da raiz de gramíneas submetidas ao óleo diesel. Além disso, grande parte das plantas analisadas por estes autores desenvolveu raízes adventícias e exibiu um incremento de raízes laterais no solo contaminado. Plantas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. com um ano de desenvolvimento em solo contaminado por petróleo apresentaram maior biomassa da raiz quando comparadas às plantas do solo não contaminado (Mayer *et al.* 2005). De acordo com estes autores, provavelmente esta diferença se deve a grande ramificação de raízes laterais nas plantas do solo contaminado. Nas condições analisadas para *A. edulis*, também foi possível constatar um aumento na biomassa e na ramificação lateral das raízes das plântulas em solo contaminado por petróleo e no solo biorremediado (Fig. 3).

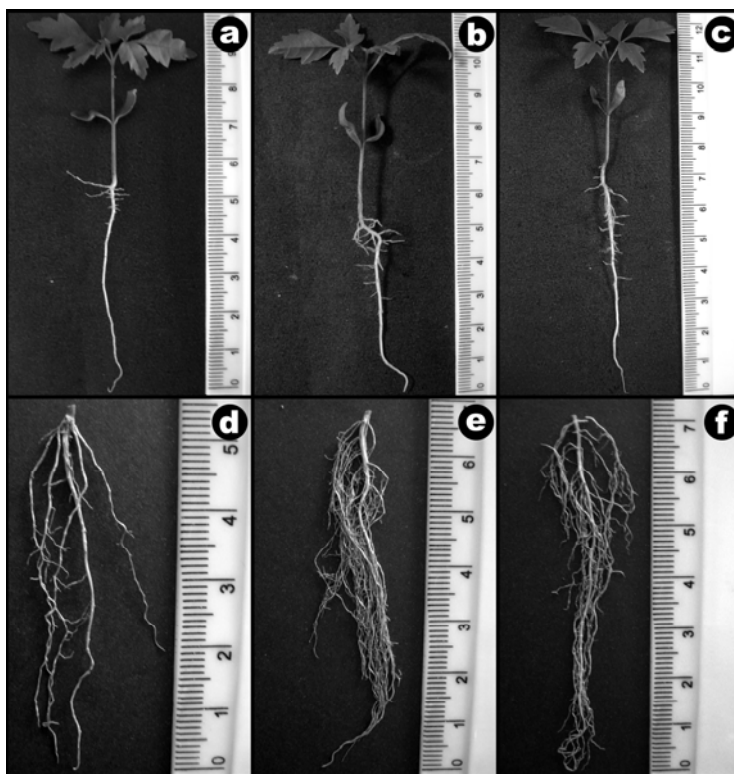


Figura 3 – Plântulas e sistema radicial das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 e 60 dias da semeadura respectivamente. A e D. solo não contaminado; B e E. solo biorremediado; C e F. solo contaminado com petróleo.

De acordo com Tischer & Hübner (2002), a presença de grande quantidade de raízes aumenta a população microbiana, melhora a estrutura física do solo e auxilia na degradação de hidrocarbonetos. Segundo Hutchinson *et al.* (2001), um amplo sistema radicial é capaz de obter maior quantidade de água através da rizosfera, transportar mais nutrientes através do solo e aumentar a área de superfície para a atividade microbiana. Mayer *et al.* (2005) sugerem a maior ramificação das raízes com a falta de oxigênio e Larcher (2000) com a redução da disponibilidade de nutrientes.

Segundo Hutchinson *et al.* (2001), os nutrientes inorgânicos que se encontram mais limitados na biorremediação de poluentes orgânicos são o nitrogênio e o fósforo. De acordo com a Tabela 1, verifica-se que os solos biorremediado e contaminado apresentam uma baixa concentração de fósforo em comparação ao solo não contaminado. Portanto, o desenvolvimento acentuado de raízes laterais com conseqüente aumento na biomassa da raiz das plântulas submetidas aos solos biorremediado e contaminado provavelmente se devem à baixa disponibilidade de fósforo nestes solos.

Santos (2006) observou que a biomassa da raiz e da parte aérea nas mudas de *A. edulis* não foram significativamente diferentes após 58 semanas em solo contaminado com petróleo (12559 mg kg⁻¹ TPH) e não contaminado. Por outro lado, Kechavarzi *et al.* (2007) constataram que a biomassa da raiz e da parte aérea das plantas de *L. perenne* expostas ao solo contaminado com óleo diesel foram significativamente inferiores em relação ao solo não contaminado.

Malallah *et al.* (1996) observaram um significativo decréscimo na biomassa das plantas de *Vicia faba* L. submetidas ao solo contaminado com óleo quando comparadas às plantas do solo controle. Ogbonna *et al.* (2007) verificaram uma redução significativa na biomassa das plantas de *Abelmoshus esculentus* (L.) Moench. em solo contaminado

por petróleo e posterior aumento da mesma através da biorremediação do solo com microrganismos e fertilizantes.

Após 30 dias da sementeira, o comprimento da raiz em solo contaminado foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação aos demais tratamentos. Após 60 dias, o comprimento da raiz foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) nas plântulas dos solos biorremediado e contaminado e significativamente menor ($p < 0,05$) nas plântulas do solo não contaminado. Além disso, observa-se que as raízes das plântulas, do tratamento com solo não contaminado, não tiveram um desenvolvimento significativo entre 30 e 60 dias (Fig. 4).

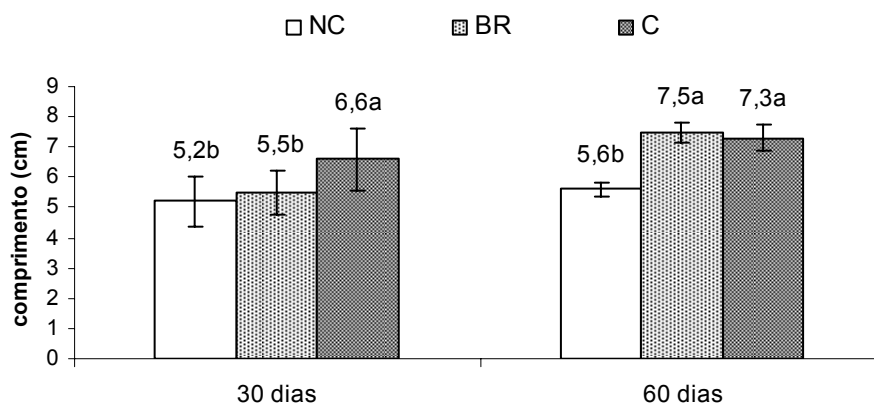


Figura 4 – Comprimento da raiz principal das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comprimento da raiz de *M. pilulifera*, após 30 dias da sementeira, foi significativamente maior no solo biorremediado, enquanto que após 60 dias, o comprimento foi significativamente menor no solo contaminado por petróleo (Inckot 2007). Merkl *et al.* (2004) constataram uma redução significativa no comprimento da raiz de *Centrosema brasilianum* (L.) Benth., *Calopogonium mucunoides* Desv. e *Stylosanthes capitata* Vogel submetidas ao solo contaminado com óleo cru. Kechavarzi *et al.* (2007) também observaram uma significativa redução no comprimento da raiz de *L. perenne* em solo contaminado com óleo diesel. Estes resultados indicam que o

comprimento da raiz tende a diminuir em solo contaminado e diferem dos registrados para *A. edulis*, evidenciando que a presença de hidrocarbonetos do petróleo no solo não prejudicou o desenvolvimento das raízes da espécie em estudo.

Os valores médios referentes ao comprimento da parte aérea das plântulas se encontram na Figura 5. Nas plântulas do tratamento solo não contaminado, o comprimento da parte aérea foi significativamente inferior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos após 30 dias da semeadura. Já aos 60 dias, o comprimento da parte aérea das plântulas do tratamento solo não contaminado foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) às plântulas do tratamento solo contaminado, porém foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado às plântulas do solo biorremediado.

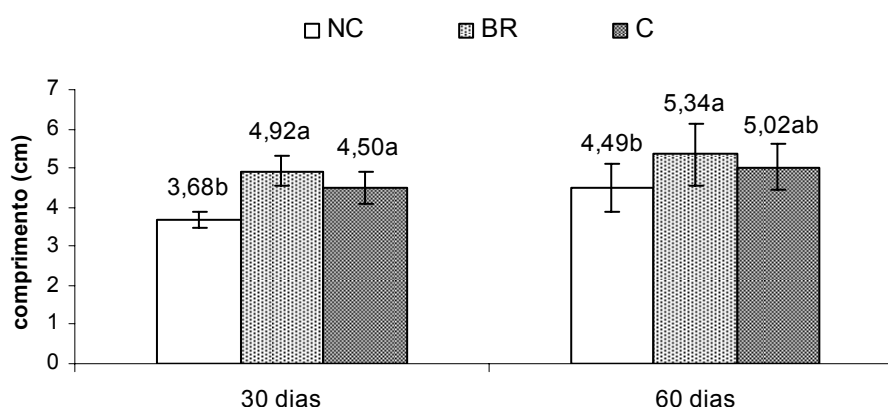


Figura 5 – Comprimento da parte aérea das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Adam & Duncan (1999) observaram uma redução na altura da maioria das plantas expostas ao óleo diesel quando comparadas às plantas em solo não contaminado. Rezende (2006) verificou que a altura das plântulas de *S. terebinthifolius* foi maior no tratamento controle e menor no solo com contaminação mais recente (após 30 dias). Bardelli da Silva (2006) também observou que a altura da parte aérea de *S.*

commersoniana foi significativamente menor no solo mais recentemente contaminado com óleo diesel.

Segundo Inckot (2007), *M. pilulifera* apresentou menor comprimento da parte aérea em solo contaminado por petróleo, quando comparada às plantas do solo não contaminado, após 30 e 60 dias da sementeira. Proffitt *et al.* (1995) verificaram que o crescimento da parte aérea de *Rhizophora mangle* L. reduziu no solo contaminado com óleo em comparação ao controle. Santos (2006) constatou uma redução na altura das plantas de *A. edulis* em solo contaminado com petróleo durante 58 semanas.

De acordo Merkl *et al.* (2004), os hidrocarbonetos do petróleo, em certas concentrações, podem estimular o crescimento das plantas. Este efeito positivo no crescimento pode ser devido à resposta da planta ao estresse do solo, sintetizando substâncias reguladoras do crescimento (Baker, 1970) com conseqüente aumento na divisão celular (Bamidele & Agbogidi, 2000). Semelhantemente ao observado nas raízes de *A. edulis*, os hidrocarbonetos do petróleo não retardaram o crescimento da espécie dentro das condições analisadas neste trabalho, ou seja, após seis anos da contaminação do solo na Repar.

A área foliar foi estatisticamente semelhante ($p>0,05$) entre os tratamentos após 30 dias da sementeira. No entanto, foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) e distinta nos três tratamentos após 60 dias. A maior área foliar foi registrada no tratamento com solo biorremediado e a menor no tratamento com solo não contaminado (Fig. 6).

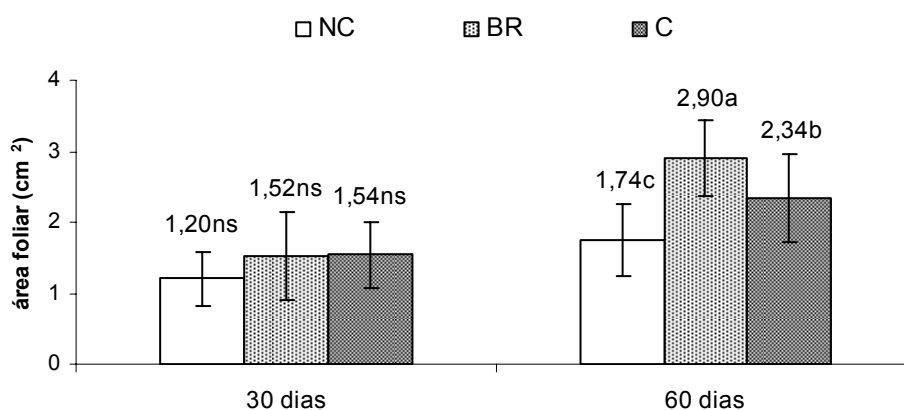


Figura 6 – Área foliar das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo).

Mayer *et al.* (2005) não observaram diferenças estatísticas na área foliar das mudas de *C. xanthocarpa* em solo contaminado com petróleo após um ano de desenvolvimento. Ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho, Inckot (2007) observou que a área foliar de *M. pilulifera* em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado, após 30 dias da semeadura, foi significativamente menor em comparação às plântulas do solo não contaminado. Bardelli da Silva (2006) verificou que a área foliar das plântulas de *S. commersoniana*, no solo não contaminado, foi superior e estatisticamente diferente em relação ao solo contaminado com óleo diesel, como também foi observado por Rezende (2006) em *S. terebinthifolius*.

Maranho *et al.* (2006) constataram que indivíduos de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl. expostos à poluição por petróleo apresentaram uma redução significativa na área foliar. A área foliar das plantas de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. em solo contaminado com petróleo foi significativamente menor quando comparada ao solo não contaminado (Farias, 2005). Para *A. edulis*, o teor de hidrocarbonetos, após seis anos da contaminação, pode ter estimulado o crescimento desta espécie nos solos contaminado e biorremediado, após 60 dias da semeadura, e consequentemente gerado um aumento na área foliar.

Portanto, *Allophylus edulis* foi capaz de germinar e se desenvolver no solo contaminado por petróleo e solo biorremediado provenientes da área da Repar. A biorremediação do solo aumentou o crescimento de *A. edulis* e o solo contaminado não prejudicou o desenvolvimento das plântulas nas condições analisadas. Desta forma, *A. edulis* demonstrou ser uma espécie tolerante a contaminação do solo com hidrocarbonetos, apresentando potencial para estudos de fitorremediação.

**CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA MORFOANATÔMICA DAS
PLÂNTULAS DE *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (SAPINDACEAE) EM
SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO E SOLO BIORREMEIADO**

RESUMO

(Avaliação da estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado).

Os hidrocarbonetos do petróleo podem ocasionar drásticos efeitos nas plantas. Porém, as informações sobre a toxicidade destes poluentes na estrutura interna da planta são limitadas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado na estrutura morfoanatômica de *Allophylus edulis*. O experimento consistiu em três tratamentos: solo contaminado por petróleo (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Após 30 dias da semeadura, foram coletadas amostras da raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo, as quais foram fixadas e processadas para análise anatômica. Além disso, foram realizadas mensurações do diâmetro da raiz e hipocótilo e da espessura do cotilédone e eofilo. Não foram observadas modificações na estrutura anatômica do hipocótilo e do cotilédone, nem diferenças significativas no diâmetro da raiz e do hipocótilo e na espessura do eofilo entre os tratamentos. Por outro lado, a espessura do cotilédone nas plântulas do tratamento BR foi significativamente maior aos demais tratamentos. A estrutura da raiz e do eofilo apresentou algumas alterações anatômicas em solo contaminado por petróleo, as quais não interferiram na sobrevivência de *A. edulis*.

Palavras-chave: hidrocarbonetos, raiz, hipocótilo, cotilédone, eofilo.

ABSTRACT

(Evaluation of the anatomical structure of *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. (Sapindaceae) seedlings in polluted soil by crude oil and bioremediated soil).

The crude oil hydrocarbons cause drastic effects in the plants. However, the information on the toxicity of these pollutants in the internal structure of the plant are limited. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of the polluted soil by crude oil and bioremediated soil in the anatomical structure of *Allophylus edulis*. The experiment consisted of three treatments: polluted soil by crude oil (C), bioremediated soil (BR) and uncontaminated soil (NC). After 30 days of sowing, samples of the root, hypocotyl, cotyledon and eophyll were collected, fixed and processed for anatomical analysis. Besides, measurements of the diameter of the root and hypocotyl and the thickness of the cotyledon and eophyll were taken. Modifications in the anatomical structure of the hypocotyl and of the cotyledon and significant differences in the diameter of the root and of the hypocotyl and in the thickness of the eophyll were not observed among the treatments. On the other hand, the thickness of the cotyledon in the plants of the treatment BR was significantly larger to the other treatments. The structure of the root and eophyll presented some anatomical alterations in polluted soil by crude oil, which did not interfered in the survival of *A. edulis*.

Key words: hydrocarbons, root, hypocotyl, cotyledon, eophyll.

Introdução

Em 16 de julho de 2000, quatro milhões de litros de óleo vazaram na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar - Petrobrás) localizada no município de Araucária - PR. Este episódio, além de contaminar as águas do rio Barigüi e Iguçu, contaminou também o solo, afetando a flora e fauna da região (Freitas 2000). Após o acidente, na área onde ocorreu o vazamento foi feita a remoção mecânica do petróleo superficial e da vegetação morta e posterior biorremediação do solo com bactérias heterotróficas e fungos hidrocarbonoclasticos (Furtado 2002). Porém, existem algumas áreas na região do acidente em que o solo ainda não foi biorremediado.

Allophylus edulis (Saint-Hilaire) Radlkofer, objeto de estudo do presente trabalho, ocorre na área da Repar onde aconteceu o acidente. Pertencente a família Sapindaceae e conhecida popularmente como vacum, *A. edulis* possui hábito arbustivo ou arbóreo, é uma espécie ciófito e seletiva higrófito que ocorre em matas primárias, capoeiras, capoeirões e beira de rios (Reitz 1980). Segundo Lorenzi (1992), *A. edulis* se desenvolve tanto em solos úmidos quanto rochosos e apresenta boa capacidade de regeneração natural e crescimento rápido, sendo recomendada na recuperação de ecossistemas degradados.

A biorremediação consiste no uso de organismos vivos a fim de remover poluentes do solo, da água e da atmosfera (Pandey *et al.* 2000; Collin 2001). Segundo Dorn & Salanitro (2000), a biorremediação de solo contaminado por petróleo pode reduzir sua toxicidade, facilitando a restauração da vegetação em ambientes contaminados. Como uma alternativa da biorremediação, a técnica denominada fitorremediação utiliza a vegetação para remover, degradar ou inativar contaminantes do solo, os quais podem ser absorvidos pelas raízes e subsequentemente armazenados ou metabolizados pelas plantas (Merkl *et al.* 2005).

O petróleo e seus derivados podem ocasionar efeitos tóxicos nas plantas, como por exemplo: redução no conteúdo de clorofilas (Achuba 2006), clorose nas folhas (Peña-Castro *et al.* 2006) e desestruturação da arquitetura radicial (Kechavarzi *et al.* 2007). Os hidrocarbonetos que compõem o petróleo podem alterar a biomassa da raiz como também toda sua estrutura interna (Merkl *et al.* 2005). Além disso, a presença de hidrocarbonetos no solo pode reduzir as divisões celulares da raiz (Merkl *et al.* 2004; Achuba 2006).

Quando o óleo penetra na planta, ele atinge os espaços intercelulares e possivelmente o sistema vascular. As membranas das células são afetadas pela

penetração das moléculas de hidrocarbonetos, ocorrendo o extravasamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, a entrada do óleo nas células. Além disso, o óleo reduz a taxa de transpiração e a fotossíntese provavelmente bloqueando os espaços estomáticos e intercelulares. Os efeitos do óleo na respiração da planta são variáveis, mas um aumento na taxa respiratória freqüentemente ocorre devido aos danos ocasionados nas mitocôndrias. Além disso, constata-se que o óleo inibe a translocação de solutos provavelmente por interferência física. Portanto, os efeitos da poluição variam de acordo com o tipo e a quantidade de óleo, das condições ambientais, sazonalidade, das espécies e idade das plantas consideradas (Baker 1970).

As plantas podem ser divididas em dois grupos: espécies sensíveis, com sensibilidade variada aos efeitos de um contaminante, que podem morrer devido à poluição, e espécies tolerantes que sobrevivem mesmo expostas a um poluente (Malallah *et al.* 1996). Certas plantas são capazes de absorver hidrocarbonetos, causando redução no crescimento da raiz e diminuição no tamanho e número de folhas (Alkio *et al.* 2005). Estes autores observaram em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. submetida ao fenantreno, um composto de hidrocarboneto, a presença deste contaminante no interior das raízes e folhas, sugerindo que a absorção do fenantreno ocasionou alterações estruturais nestes órgãos.

Maranho (2004), avaliando os efeitos diretos do derramamento de petróleo na estrutura da folha e do lenho de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., constatou que esta espécie mostrou diferenças significativas quando exposta ao petróleo. Rodrigues (2005), analisando os efeitos do solo contaminado com petróleo em *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. e *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs, registrou alterações significativas na estrutura anatômica do lenho de ambas as espécies. Por outro lado, Santos (2006) não observou nenhuma alteração significativa quanto à estrutura anatômica do lenho de *Allophylus edulis* (St. Hill) Radlk. em solo contaminado por petróleo.

Embora os hidrocarbonetos do petróleo sejam poluentes ambientais difundidos e a sua biodegradação seja assunto central de numerosas investigações, as informações sobre a sua toxicidade às plantas presentes em solo contaminado são limitadas. Os trabalhos relacionados ao efeito do solo contaminado por petróleo nas plantas avaliam, principalmente, parâmetros como a germinação e crescimento vegetal. Desta forma, o que se observa é a escassez de estudos sobre os efeitos deste poluente sobre a estrutura

interna (Maranho *et al.* 2006). Mayer *et al.* (2005) consideram escassos os estudos do impacto do óleo em regiões continentais, bem como seus efeitos a médio e longo prazo.

Considerando, portanto, a escassez de informações a respeito de alterações morfoanatômicas de espécies cultivadas em solo biorremediado e contaminado por petróleo, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do solo contaminado por petróleo e solo biorremediado na estrutura morfoanatômica das plântulas de *Allophylus edulis*.

Material e Métodos

Os frutos de *Allophylus edulis* foram coletados, em dezembro de 2005, aleatoriamente de 12 indivíduos com uma distância mínima de 100 m um do outro. A coleta foi realizada no município de Colombo/PR, região metropolitana de Curitiba, próxima a área da Embrapa Florestas. Posteriormente, os frutos foram transportados ao Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná para serem macerados e despolpados em água corrente para obtenção das sementes.

O solo utilizado na montagem do experimento foi obtido na área da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar-Petrobrás), município de Araucária/PR, onde ocorreu o vazamento de petróleo no ano de 2000. Após o acidente na Repar, o petróleo superficial e a vegetação morta foram removidos mecanicamente para que fosse feita a biorremediação do solo com microrganismos. No entanto, algumas áreas permaneceram isoladas sem nenhum tipo de intervenção no solo. Foram coletados solo contaminado, solo biorremediado e solo não contaminado em áreas próximas a cerca de 5 m umas das outras. A coleta do solo contaminado foi realizada na área em que não sofreu intervenção, enquanto que o solo biorremediado foi coletado no local onde a vegetação foi retirada para a biorremediação do solo e, finalmente, o solo não contaminado foi obtido em uma área recoberta pela vegetação nativa.

A determinação do teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foi realizada através da metodologia ASTM D5765 pelo Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC), enquanto que a caracterização dos atributos físico-químicos dos solos foi realizada pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal do Paraná (Tab. 1).

Tabela 1 – Atributos físico-químicos e teor de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) do solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado com petróleo (C).

	NC	BR	C
Areia (%)	26,1	19,7	24,8
Silte (%)	21,3	35,2	25,2
Argila (%)	52,5	45,0	50,0
pH (CaCl ₂)	3,70	5,80	4,20
Alumínio (cmol _c dm ⁻³)	6,00	0,00	4,10
Carbono (g dm ⁻³)	23,8	19,6	26,9
Nitrogênio (g kg ⁻¹)	2,4	1,7	2,2
Fósforo (mg dm ⁻³)	3,50	1,20	1,60
Potássio (cmol _c dm ⁻³)	0,10	0,21	0,24
Cálcio (cmol _c dm ⁻³)	0,40	16,80	2,00
Magnésio (cmol _c dm ⁻³)	0,20	1,80	1,50
TPH (mg kg ⁻¹)	1354	2004	13651

O experimento, montado em casa de vegetação no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, foi composto por três tratamentos: solo contaminado (C), solo biorremediado (BR) e solo não contaminado (NC). Em cada tratamento foram realizadas cinco repetições de 50 sementes cada, totalizando 250 sementes por tratamento. O solo referente a cada tratamento foi peneirado, homogeneizado e distribuído em bandejas plásticas (29 cm de comprimento x 22 cm de largura x 6 cm de altura). Estas foram dispostas aleatoriamente e permaneceram sob nebulização de 20 segundos a cada 30 minutos. Além disso, as temperaturas mínima e máxima foram registradas diariamente (mín. = 19,0°C e máx. = 38,0°C). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, pois suas unidades experimentais permaneceram sob condições homogêneas.

Após 30 dias da semeadura, realizou-se a coleta das plântulas para efetuar a análise anatômica. Foram utilizadas duas plântulas por repetição, totalizando dez por tratamento. Primeiramente, foram retiradas amostras do ápice e a um centímetro do ápice da raiz, região mediana do hipocótilo, do cotilédone e do eofilo. Em seguida, parte das amostras foi fixada em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (McDowell & Trump

1976) e outras em FAA 50 (Johansen 1940), armazenadas em álcool etílico 70% e processadas segundo indicações do fabricante para inclusão em historresina Leica® (2-hidroxietilmeta-acrilato). Além disso, para observação de pêlos radiciais, raízes laterais foram clarificadas em solução de hipoclorito, coradas com azul de astra (Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin 1997) e montadas entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada.

As secções foram realizadas em micrótopo de rotação, distendidas em lâminas, coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1965) e montadas em resina Permount®. Além disso, foram feitos testes microquímicos, dentre eles: lugol (Johansen 1940) para identificar amido, cloreto férrico (Johansen 1940) para detectar compostos fenólicos, sudam III (Sass 1951) para detectar a presença de substâncias graxas e azul de astra (Bukatsch 1972 *apud* Kraus & Arduin 1997) para identificar mucilagem. Finalmente, as análises microscópicas e registros fotográficos foram realizados em microscópio fotônico da marca Zeiss® com câmara fotográfica digital (Sony Cyber-Shot P200®) acoplada.

Para a análise do eofilo (primeira folha) em microscopia eletrônica de varredura, foram utilizadas quatro plântulas por tratamento. Amostras fixadas em FAA 50 foram desidratadas em série alcoólica, submetidas ao ponto crítico com CO₂ no aparelho Bal-Tec CPD-030® e posteriormente metalizadas com ouro no equipamento Balzers Union FL 9496 SCK 030®. As observações foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná em microscópio eletrônico de varredura Jeol® (JSM-6360 LV).

Para a mensuração anatômica, secções transversais da raiz, hipocótilo, cotilédone e eofilo de cada tratamento foram analisadas em microscópio fotônico com ocular micrometrada. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção respectivo à objetiva utilizada, obtendo-se assim o valor real (em micrômetros) do diâmetro da raiz e hipocótilo e da espessura do eofilo e cotilédone. Para contagem estomática, amostras do eofilo foram colocadas em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético (Franklin 1945 *apud* Kraus & Arduin 1997) durante 24 horas, coradas com azul de astra e montadas entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada. Posteriormente, estas amostras foram observadas em microscópio fotônico com câmara clara acoplada, projetando-se a epiderme de cada eofilo sobre uma área conhecida a fim de estimar o número de estômatos por milímetro quadrado.

Os dados morfométricos obtidos foram analisados estatisticamente mediante o programa Mstatc[®]. Primeiramente, foram calculadas as médias e o desvio padrão das variáveis. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

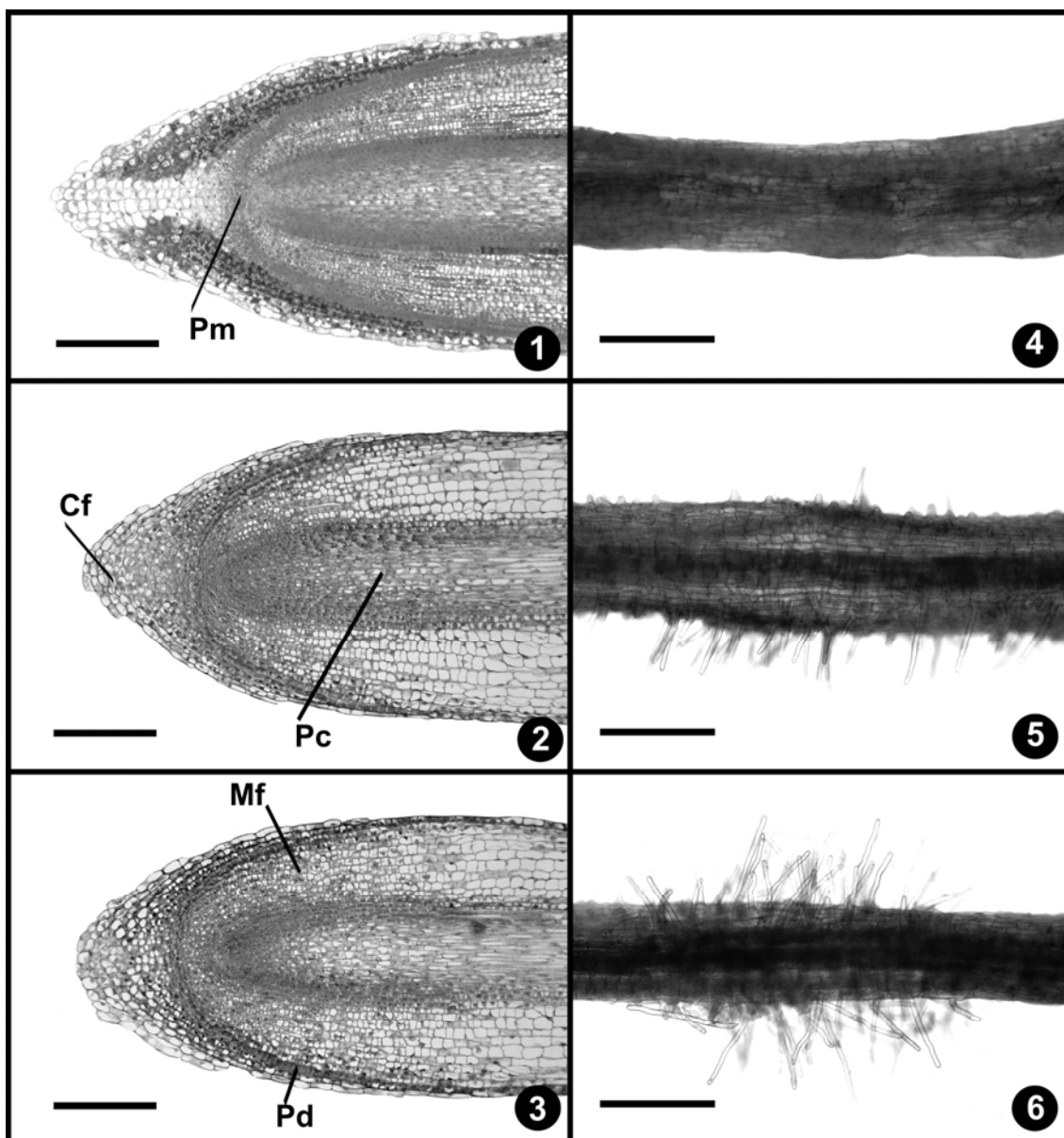
Em secção longitudinal, observa-se que há diferenças estruturais entre os ápices das raízes de *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radlk. A região apical das raízes das plântulas do solo não contaminado apresentou coifa e cilindro procambial mais desenvolvidos que as plântulas de solo biorremediado e solo contaminado (Fig. 1 a 3). Além disso, observa-se na coifa das plântulas de solo não contaminado columela bem diferenciada (Fig. 1), não verificada nas plântulas dos demais tratamentos.

Resultados semelhantes quanto ao desenvolvimento da região meristemática também foram observados no ápice das raízes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. & Downs, que se desenvolveram em solo contaminado por óleo diesel (Bardelli da Silva 2006), e no ápice radicial de *Mimosa pilulifera* Bentham em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado (Inckot 2007). Por outro lado, Rezende (2006) não encontrou diferenças na estrutura do ápice das raízes de *Schinus terebinthifolius* Raddi em solo contaminado com óleo diesel e solo não contaminado. Achuba (2006) constatou uma redução no tamanho das células e na atividade mitótica no meristema apical das raízes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. crescendo em solo contaminado com petróleo.

Com referência ao desenvolvimento de pêlos absorventes nas raízes de *A. edulis*, nota-se que as raízes laterais das plântulas de solo contaminado e solo biorremediado são providas desses apêndices epidérmicos. Por outro lado, não foram observados pêlos nas raízes laterais das plântulas que cresceram em solo não contaminado (Fig. 4 a 6). A presença de pêlos nas raízes de *A. edulis* pode ser uma característica importante na sua sobrevivência em solo contaminado e biorremediado, pois com isso deve superar a baixa concentração de fósforo observada nestes solos (Tab. 1).

Segundo Ma *et al.* (2001), a grande densidade de pêlos radiciais verificada em *Aradopsis thaliana* (L.) Heynh. está relacionada à baixa disponibilidade de fósforo. Semelhantemente às raízes de *A. edulis*, Bardelli da Silva (2006) também não detectou a presença de pêlos radiciais em *Sebastiania commersoniana* no solo não contaminado, mas somente nas plantas que cresceram em solo contaminado por óleo diesel. Inckot (2007) observou que as raízes de *Mimosa pilulifera*, desenvolvidas em solo

contaminado por petróleo, apresentaram maior densidade de pêlos em relação às raízes das plantas do solo biorremediado e solo não contaminado. Alkio *et al.* (2005) constataram que o desenvolvimento de pêlos radiciais em *Arabidopsis thaliana* foi drasticamente inibido na presença de fenantreno (composto de hidrocarboneto).



Figuras 1 a 6. Seções longitudinais do ápice da raiz principal e raízes laterais das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da semeadura; 1, 2 e 3. Ápice da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 4. Raiz lateral em solo não contaminado; 5 e 6. Raiz lateral com pêlos absorventes em solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Coifa (Cf), Meristema fundamental (Mf), Procâmbio (Pc), Protoderme (Pd) e Promeristema (Pm). Barras 1 a 6 = 200 μ m.

A um centímetro do ápice, em secção transversal da raiz, observa-se que a epiderme, nas plântulas cultivadas em solo não contaminado e biorremediado, é

unisseriada e constituída por células de formato arredondado com paredes delgadas (Fig. 7 e 8). Nas raízes das plântulas cultivadas em solo contaminado, as células epidérmicas podem se apresentar comprimidas ou deformadas (Fig. 9). Alterações no formato de células epidérmicas também foram constatadas por Gill *et al.* (1992), em raízes de *Chromolaena odorata* (L.) K.&R., devido à presença de petróleo no solo que ocasiona, provavelmente, condições de seca e indisponibilidade de nutrientes para as plantas.

Por outro lado, há registros na literatura que as células epidérmicas de plantas submetidas à ação do petróleo podem não sofrer modificações estruturais significativas. Bardelli da Silva (2006) verificou que a epiderme da raiz das plântulas de *Sebastiania commersoniana*, em estrutura primária, não apresentou alterações em solo contaminado com óleo diesel. Farias (2005), por sua vez, também não observou diferenças na disposição da epiderme das raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. nem tampouco danos celulares causados pelo petróleo presente no solo. Finalmente, Inckot (2007), analisando a raiz de *Mimosa pilulifera* a um centímetro do ápice, em solo contaminado por petróleo e em solo biorremediado, não constatou alterações na disposição, conteúdo e formato das células epidérmicas.

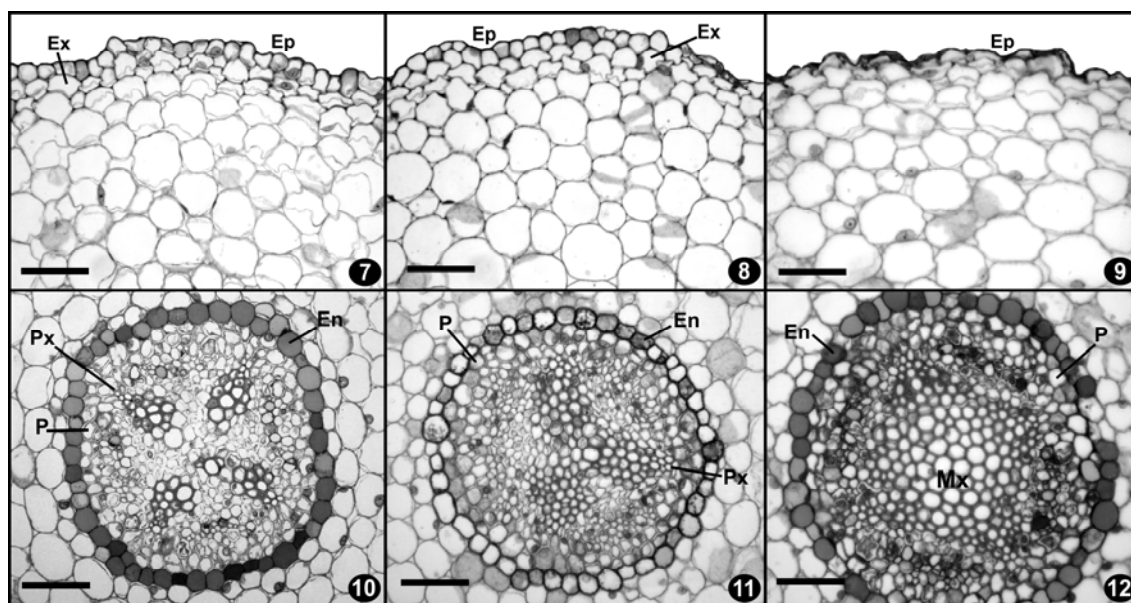
O córtex da raiz da espécie em estudo é composto por exoderme unisseriada, células parenquimáticas que formam entre si pequenos espaços intercelulares, predominantemente triangulares (Fig. 7 a 9), e mais internamente pela endoderme, que é constituída por uma camada de células de paredes delgadas (Fig. 10 a 12). O parênquima cortical não apresenta diferenças significativas entre as plântulas do solo não contaminado e aquelas sob tratamento.

Os estudos com outras espécies cultivadas em solo contaminado por petróleo mostraram que este pode ou não provocar alterações corticais em raízes, independentemente da espécie ou do tipo de experimento realizado. Assim, Bardelli da Silva (2006) verificou em *Sebastiania commersoniana* que, na maioria das plântulas submetidas ao solo contaminado com óleo diesel, o córtex apresentou células rompidas, indicando princípio de formação de aerênquima lisígeno. Rezende (2006) registrou até 45% a mais de área lacunar nas raízes das plantas de *Schinus terebinthifolius* submetidas à contaminação por óleo diesel. Farias (2005) não observou diferença na disposição das células do córtex e nem danos celulares causados pela contaminação do solo por petróleo nas raízes de *Rhynchospora corymbosa*, ao contrário de Gill *et al.*

(1992), os quais constataram que o petróleo provocou distorção das células corticais da raiz de *Chromolaena odorata*.

O cilindro vascular da raiz das plântulas possui periciclo parenquimático unisseriado, xilema e floema primários alternados, com quatro pólos de protoxilema (Fig. 10 a 12), caracterizando a raiz como tetrarca. As raízes das plântulas em solo biorremediado e solo contaminado se encontram em início de crescimento secundário, com câmbio ativo (Fig. 11 e 12). A ativação antecipada do câmbio e conseqüente formação de tecidos vasculares secundários podem ocorrer em outras plantas que se desenvolvem em solos contaminados por petróleo e derivados. Bardelli da Silva (2006) também observou que o cilindro vascular da raiz de *Sebastiania commersoniana*, nos tratamentos com contaminação por óleo diesel, se encontrava em estágio mais desenvolvido, com o câmbio instalado e início de crescimento secundário na região a um centímetro do ápice. Da mesma forma, Inckot (2007) verificou que, após 30 dias da sementeira, as plântulas de *Mimosa pilulifera* nos solos contaminado por petróleo e biorremediado já apresentavam início de instalação do câmbio na raiz principal.

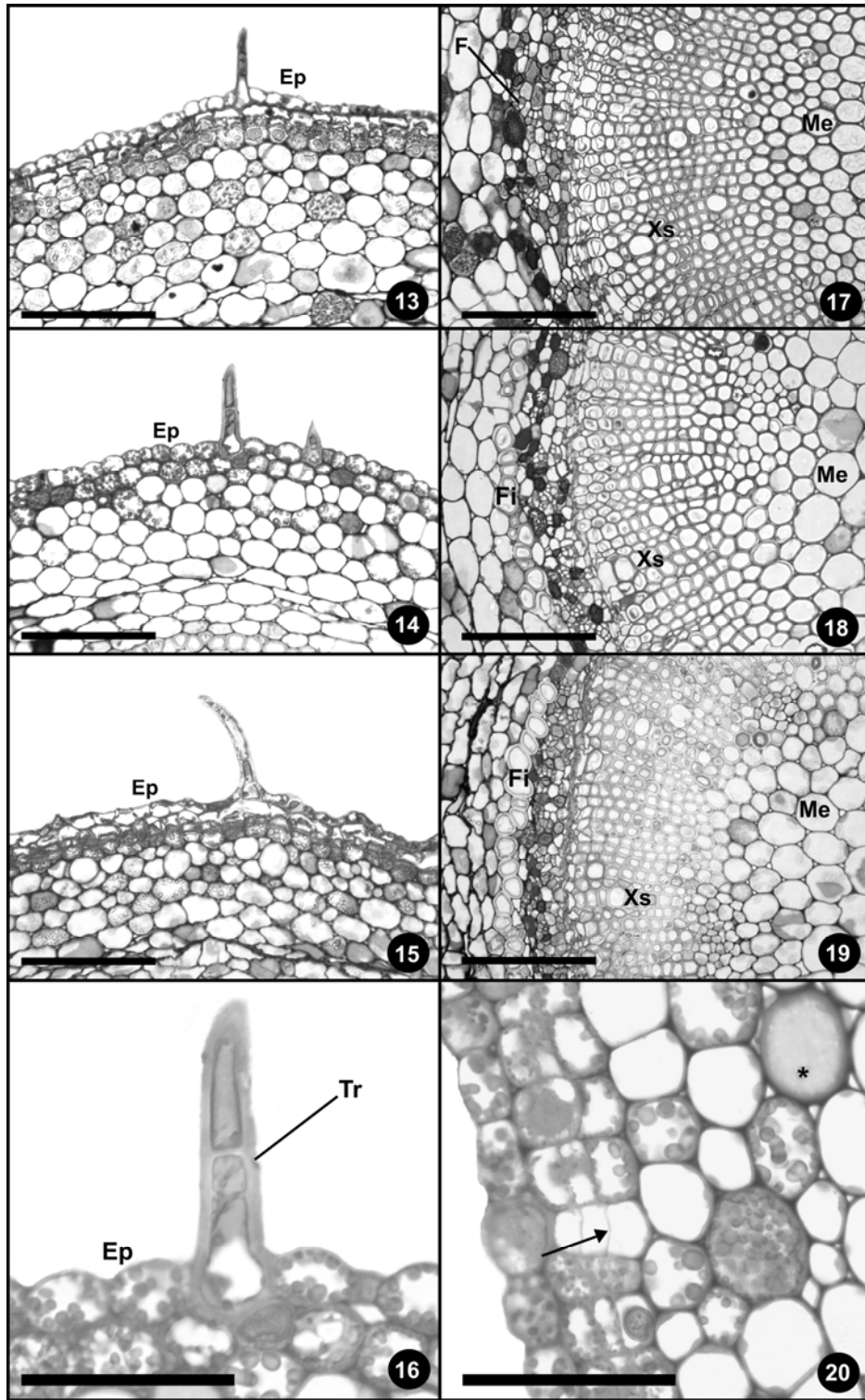
Assim como verificado para o córtex de raízes, também há plantas que apresentam cilindro central aparentemente inalterado quando comparado com o de plantas submetidas à ação do petróleo. Isso pode ser verificado em *Rhynchospora corymbosa* que não mostrou diferenças na disposição das células do cilindro vascular das raízes nem tampouco danos celulares causados pela contaminação do solo por petróleo (Farias, 2005). Rezende (2006) também não encontrou alterações anatômicas visíveis no cilindro vascular das raízes de *Schinus terebinthifolius* submetidas ao solo contaminado por óleo diesel.



Figuras 7 a 12. Secções transversais da raiz a um centímetro do ápice das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da sementeira; 7, 8 e 9. Epiderme e região cortical da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 10, 11 e 12. Região do cilindro vascular da raiz em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Endoderme (En), Epiderme (Ep), Exoderme (Ex), Metaxilema (Mx), Periciclo (P) e Protoxilema (Px). Barras 7 a 12 = 50µm.

O hipocótilo das plântulas se encontra em início de crescimento secundário (Fig. 17 a 20). A epiderme é uniestratificada e apresenta tricomas tectores pluricelulares unisseriados (Fig. 13 a 16). O córtex é parenquimático (Fig. 13 a 20), com cloroplastídios principalmente nos estratos celulares localizados mais próximos da epiderme. Além disso, há célula mucilaginosa no córtex (Fig. 20). Não foi evidenciada endoderme com estrias de Caspary. Nas plântulas de solo não contaminado e naquelas sob tratamento, desenvolve-se periderme (Fig. 13 e 15), cujo felogênio tem origem subepidérmica (Fig. 20). Na periferia do cilindro central, na face floemática, ocorrem grupos de fibras (Figura 19). O hipocótilo apresenta tecidos vasculares primários e secundários (Fig. 17 a 19) que envolvem medula parenquimática. Além disso, as células parenquimáticas medulares apresentam grande quantidade de amido, sendo semelhante em todos os tratamentos.

Não há diferenças evidentes na estrutura anatômica do hipocótilo das plântulas de *A. edulis* entre os solos não contaminado, biorremediado e contaminado. Inckot (2007), em estudo do hipocótilo de *Mimosa pilulifera*, também não constatou alteração na estrutura do hipocótilo das plântulas de solo contaminado por petróleo e no solo biorremediado.



Figuras 13 a 20. Secções transversais do hipocótilo das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da sementeira; 13, 14 e 15. Detalhes da epiderme e células corticais das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 16. Detalhe de tricoma tector de plântula em solo biorremediado; 17, 18 e 19. Detalhes de parte do córtex e cilindro central das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 20. Periderme com felogênio de origem subepidérmica (seta) em plântula de solo biorremediado. Célula com substância mucilaginosa (*), Epiderme (Ep), Floema (F), Fibras (Fi), Medula (Me), Tricoma (Tr) e Xilema secundário (Xs). Barras 13, 14, 15, 17, 18 e 19 = 100µm. Barras 16 e 20 = 50µm.

O diâmetro total da raiz a um centímetro do ápice não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre as plântulas do solo não contaminado e as plântulas sob tratamento (Fig. 21). Bardelli da Silva (2006), por outro lado, registrou diâmetro total da raiz, em *Sebastiania commersoniana*, significativamente maior nas plantas submetidas ao solo contaminado com óleo diesel. Farias (2005), à semelhança do verificado em *A. edulis*, não encontrou diferença significativa no diâmetro total das raízes de *Rhynchospora corymbosa* crescendo em solo contaminado com petróleo.

Quanto ao diâmetro total do hipocótilo de *A. edulis*, também não houve diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre as plântulas de solo contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo (Fig. 21). Resultado semelhante ao do hipocótilo de *A. edulis* foi registrado por Inckot (2007) para *Mimosa pilulifera*.

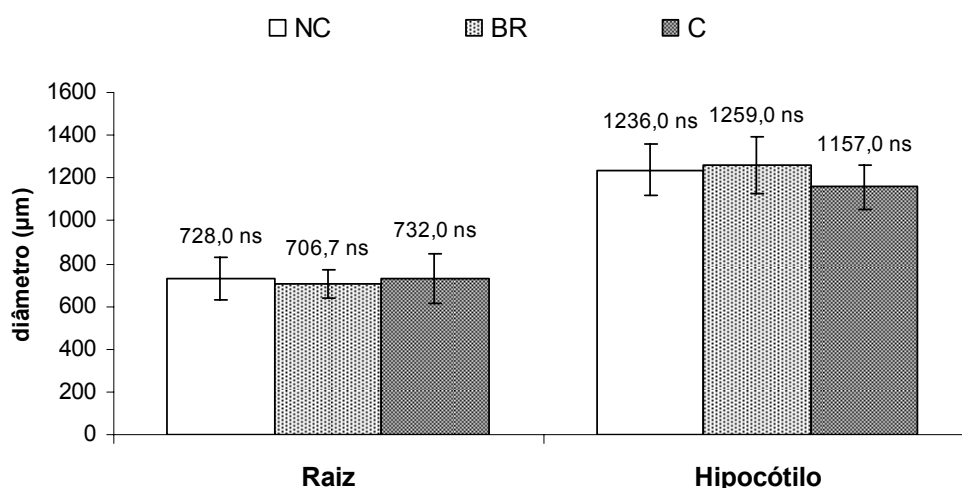


Figura 21 – Diâmetro total da raiz e do hipocótilo das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão (ns – não significativo).

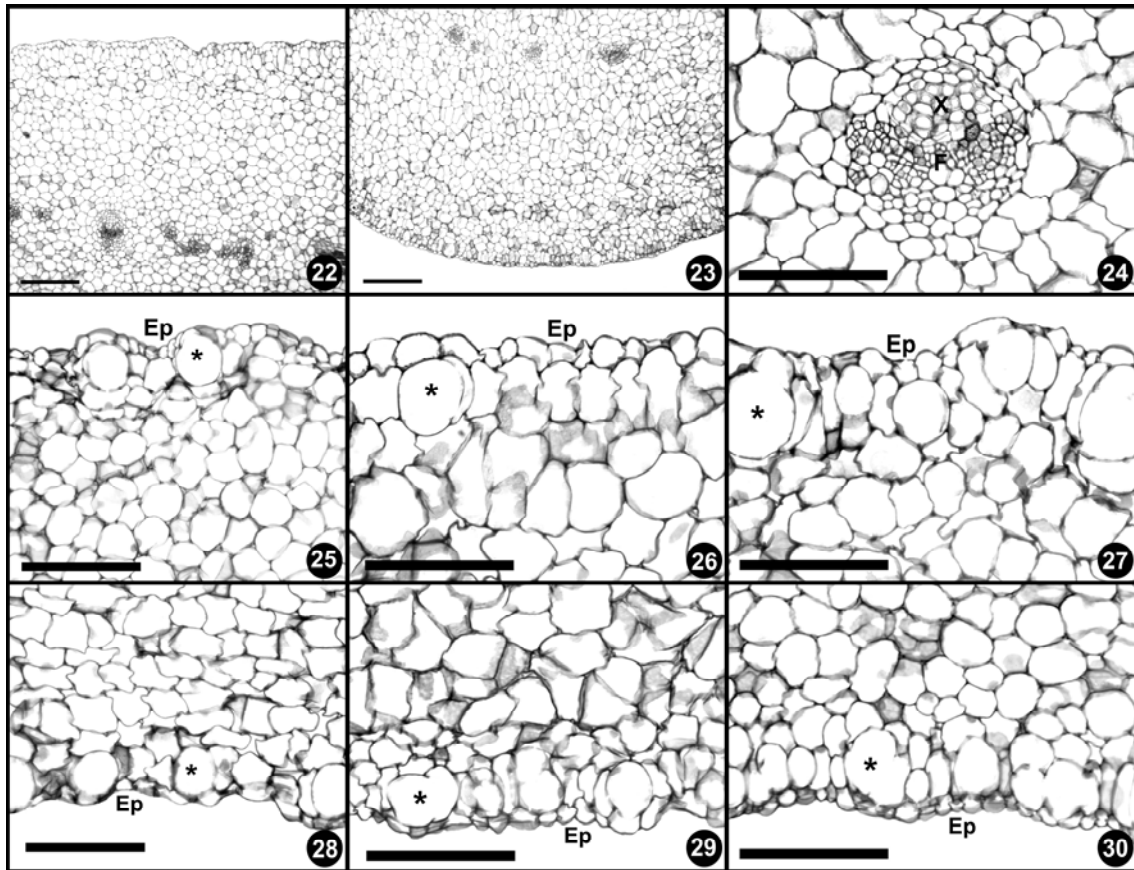
Em secção transversal do cotilédone, nota-se que a superfície adaxial é plana, enquanto que a superfície abaxial é convexa (Fig. 22 e 23). Em ambas as faces, a epiderme é simples e composta por células de formato irregular, as quais apresentam paredes delgadas (Fig. 25 a 30). Não foram encontradas diferenças anatômicas na epiderme entre as plântulas do solo não contaminado e as plântulas de solos biorremediado e contaminado.

O mesofilo cotiledonar é homogêneo, embora a camada parenquimática localizada sob a epiderme da face adaxial mostre células ligeiramente alongadas (Fig. 25 a 27). No mesofilo, verifica-se a presença de células mucilaginosas logo abaixo da

epiderme de ambas as faces (Fig. 25 a 30). Salienta-se, aliás, que folhas com mesofilo homogêneo e células contendo tanino e mucilagem ocorrem comumente em Sapindaceae (Solereeder 1908).

Com referência às nervuras, nota-se que a nervura central do cotilédone de *A. edulis* não apresenta proeminência em ambas as faces. As nervuras, constituídas por feixes vasculares colaterais, estão imersas no mesofilo e alinham-se na região média do mesofilo (Fig. 22 a 24). Assim como na espécie em estudo, Inckot (2007) também não registrou alterações significativas na estrutura dos cotilédones de *Mimosa pilulifera* em solo contaminado por petróleo, solo biorremediado e solo não contaminado.

A espessura dos cotilédones das plântulas cultivadas em solo biorremediado foi maior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) em relação às plântulas em solo não contaminado e solo contaminado (Fig. 31). Provavelmente, pode ter havido maior utilização das reservas do cotilédone das plântulas nos solos não contaminado e contaminado, diminuindo assim a espessura do cotilédone. Diferente de *A. edulis*, *Mimosa pilulifera* não apresentou alteração da espessura dos cotilédones quando cultivada em solo contaminado com petróleo e também em solo biorremediado (Inckot 2007).



Figuras 22 a 30. Seções transversais da lâmina cotiledonar das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da sementeira; 22. Região adaxial e central de plântula em solo contaminado por petróleo; 23. Região abaxial e central de plântula em solo biorremediado; 24. Feixe colateral central de plântula em solo biorremediado); 25, 26 e 27. Epiderme e mesofilo da face adaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 28, 29 e 30. Epiderme e mesofilo da face abaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente. Células mucilaginosas (*), Epiderme (Ep), Floema (F) e Xilema (X). Barras 22 e 23 = 200 μ m. Barras 24 a 30 = 100 μ m.

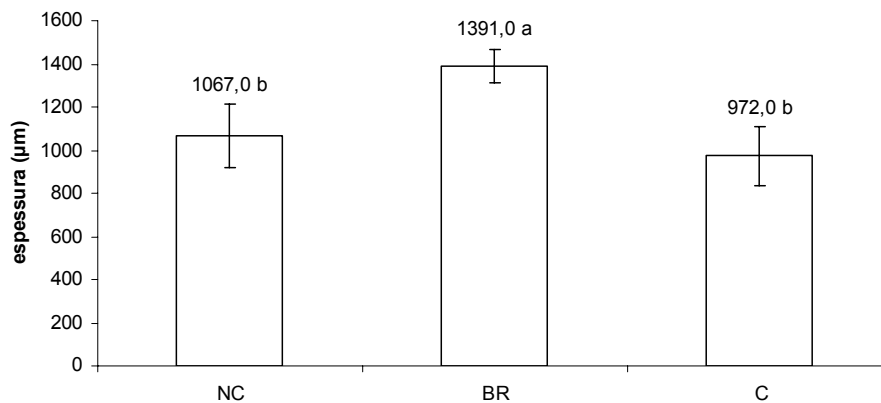


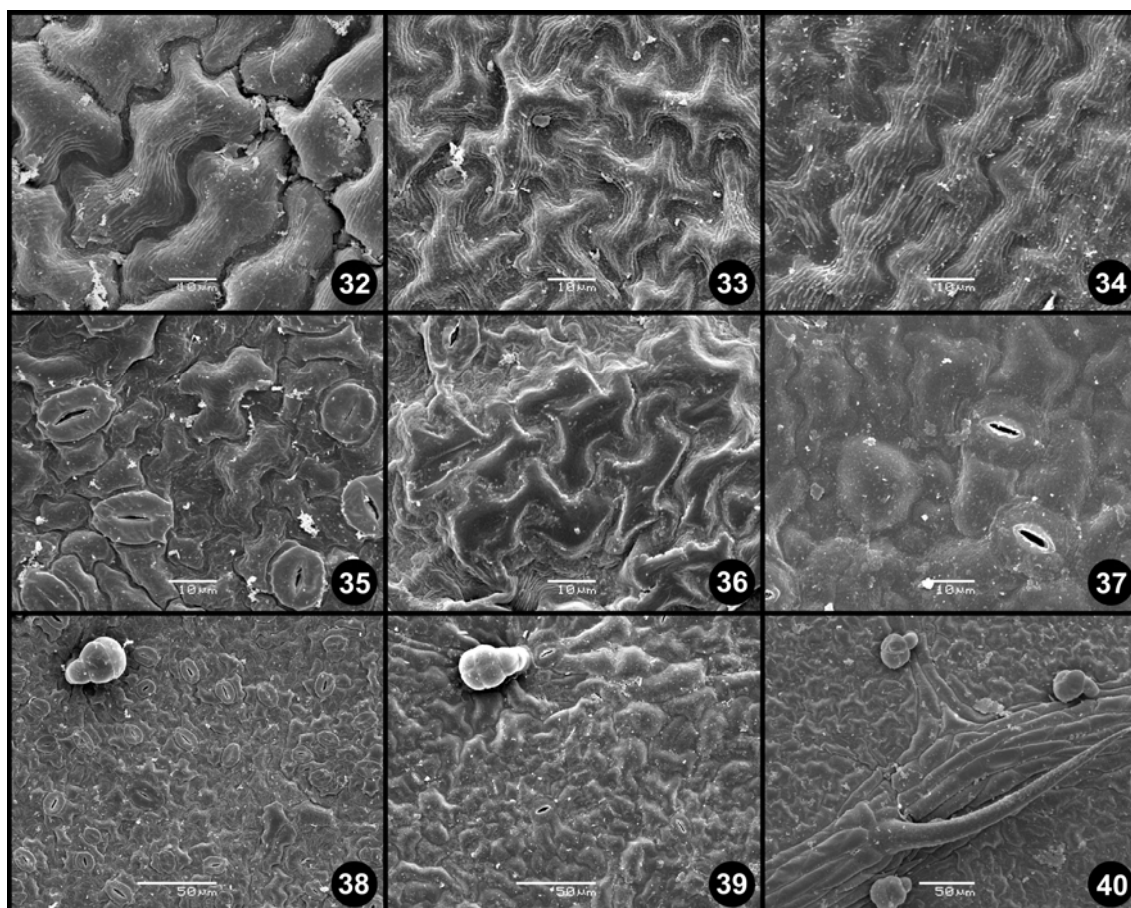
Figura 31 – Espessura do cotilédone das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A epiderme da face adaxial do eofilo, em vista frontal, possui estrias epicuticulares com mesma morfologia em todas as plântulas analisadas (Fig. 32 a 34). Observação semelhante fez Bardelli da Silva (2006) para o eofilo de *Sebastiania commersoniana*, que também não registrou diferenças morfológicas nas estrias epicuticulares das plântulas desenvolvidas em solo contaminado por óleo diesel e solo não contaminado.

Os estômatos estão presentes somente na face abaxial do eofilo (Fig. 35 a 37). Na epiderme do eofilo também ocorrem tricomas glandulares na face adaxial e abaxial (Fig. 38 a 40) e tricomas tectores simples sobre as nervuras da face adaxial (Fig. 40) e abaxial. Com referência aos estômatos e tricomas, não foram registradas diferenças entre as plântulas do solo não contaminado e aquelas submetidas aos solos biorremediado e contaminado. Diferentemente de *A. edulis*, Alkio *et al.* (2005) observaram deformações nos tricomas e redução no tamanho e número dos mesmos nas folhas de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao fenantreno (composto de hidrocarboneto).

Rezende (2006) observou que os eofilos das plantas de *Schinus terebinthifolius*, em solo contaminado com óleo diesel, possuíam áreas com alterações celulares, em que as células se encontravam deformadas e com cutícula alterada, o que não ocorreu com os eofilos das plantas em solo não contaminado. Bardelli da Silva (2006) verificou no eofilo de *Sebastiania commersoniana* alterações na forma das células nas plantas do solo contaminado por óleo diesel 60 dias antes do plantio. Além disso, nas plantas em solo contaminado mais recentemente, esta autora registrou ausência de ceras epicuticulares na maior parte da superfície do eofilo.

Entretanto, a superfície foliar dos eofilos também pode não ser afetada pela ação do petróleo. Inckot (2007) não constatou nenhuma alteração nas células epidérmicas, nos tricomas e nas ceras epicuticulares do eofilo de *Mimosa pilulifera* em solos contaminado por petróleo, biorremediado e não contaminado. Segundo a autora, isto se deve à provável ausência de compostos voláteis e ao baixo nível de toxicidade do solo contaminado. A ausência de alterações na superfície epidérmica do eofilo de *A. edulis* provavelmente se deve ao tempo de contaminação do solo (mais de seis anos), pois é possível que não haja mais compostos voláteis e que o teor de TPH (13651 mg kg^{-1}) no solo contaminado não seja fitotóxico para *A. edulis*.



Figuras 32 a 40. Superfícies adaxial e abaxial dos eofilos das plântulas de *Allophylus edulis* em microscopia eletrônica de varredura; 32, 33 e 34. Epiderme da face adaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 35, 36 e 37. Epiderme da face abaxial das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 38. Tricoma glandular na epiderme da face abaxial de plântula em solo não contaminado; 39. Tricoma glandular na epiderme da face abaxial de plântula em solo contaminado por petróleo; 40. Tricomas glandulares e tector na epiderme da face adaxial de plântula em solo biorremediado. Barras 32 a 37 = 10 μ m. Barras 38 a 40 = 50 μ m.

O índice estomático do efilo de *A. edulis* não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre as plântulas de solo não contaminado, biorremediado e contaminado por petróleo (Fig. 41). Outras espécies, em estudos com plantas jovens em solo contaminado com petróleo há bastante, também não mostraram diferenças neste índice. São os casos de *Mimosa pilulifera* (Inckot 2007) e de *Rhynchospora corymbosa* (Farias 2005). De outra forma, plantas adultas que sofreram o impacto direto do petróleo, como em *Sebastiania commersoniana* (Silva *et al.* 2004) e *Podocarpus lambertii* (Maranho *et al.* 2006), apresentaram um aumento significativo na densidade estomática em solo contaminado.

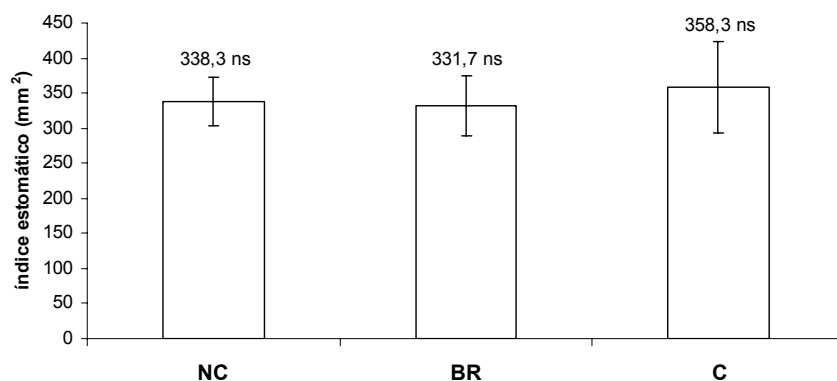


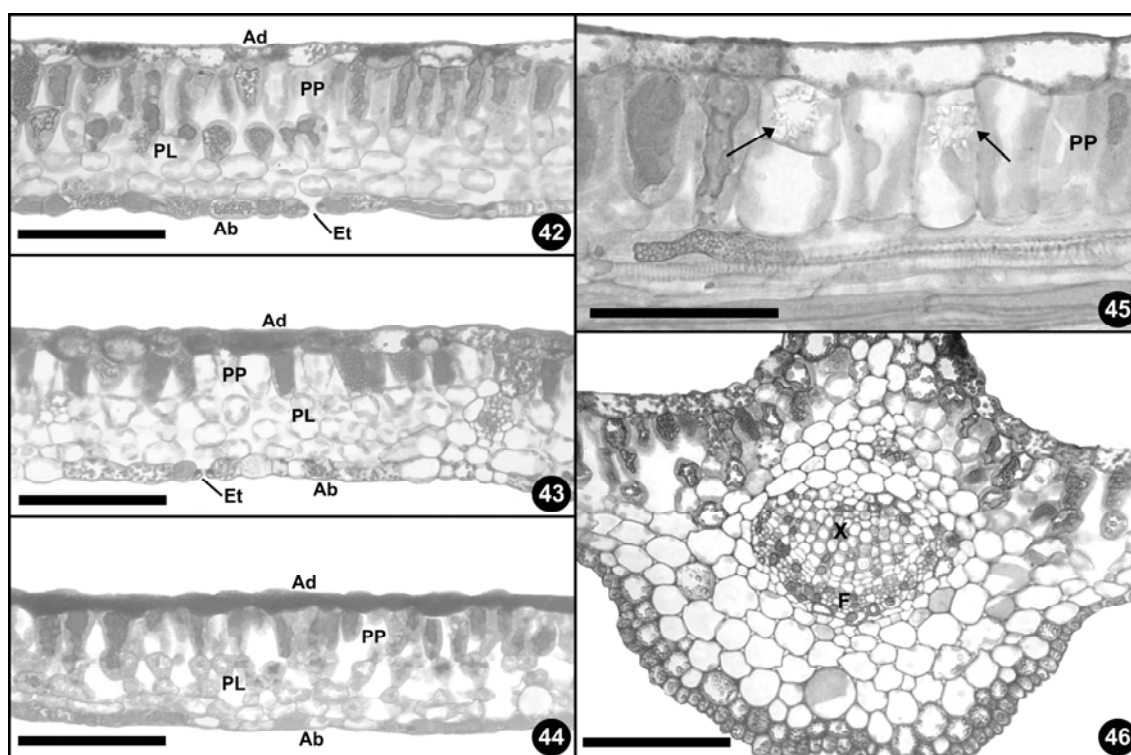
Figura 41 – Índice estomático do eofilo das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da sementeira. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão (ns – não significativo).

A epiderme do eofilo de *A. edulis*, em seção transversal, é unisseriada e apresenta células de paredes periclinais externas espessadas. As células epidérmicas da face adaxial são maiores quando comparadas às células da face abaxial (Fig. 42 a 44). Os estômatos ocorrem somente na face abaxial da folha (Fig. 42 e 43), ou seja, a folha é hipostomática. A epiderme da face adaxial possui células mucilaginosas, ocorrendo estas em maior quantidade nas plântulas de solo contaminado (Fig. 44).

Outras plantas podem ter a diferenciação da epiderme influenciada pela ação do petróleo. Gill *et al.* (1992), por exemplo, verificaram que o petróleo pode ocasionar pronunciada distorção de células na epiderme da face abaxial das folhas de *Chromolaena odorata*. Por outro lado, Farias (2005) e Inckot (2007) não observaram alterações entre as células epidérmicas das folhas de *Rhynchospora corymbosa* e *Mimosa pilulifera*, respectivamente, crescendo em solo contaminado e não contaminado por petróleo.

O mesofilo é dorsiventral composto por uma camada de parênquima paliçádico e três a quatro camadas de parênquima lacunoso (Fig. 42 a 44). Monocristais em forma de drusa ocorrem nas células do parênquima paliçádico (Fig. 45) nos eofilos das plântulas sob tratamento ou não. O mesofilo parece ser mais delgado nos eofilos das plântulas em solo contaminado, devido à presença de células menores e de espaços intercelulares mais evidentes (Fig. 44). Ao contrário de *A. edulis*, o eofilo das plantas de *Sebastiania commersoniana* em solo não contaminado apresentou maior frequência de espaços intercelulares quando comparado aos tratamentos com contaminação por óleo diesel (Bardelli da Silva 2006).

O sistema vascular do eofilo é composto por feixes colaterais de pequeno calibre ao longo do mesofilo e por um feixe colateral grande na nervura central (Fig. 46). Esta, por sua vez, é convexa em ambas as faces, com proeminência maior na superfície abaxial. O sistema vascular dos eofilos das plântulas de *A. edulis* em solo não contaminado, biorremediado e contaminado possui estrutura semelhante, parecendo não ser afetado pela presença de petróleo. De modo semelhante, Rezende (2006) não observou diferenças estruturais em células e tecidos na nervura central das folhas de *Schinus terebinthifolius* crescendo em solo contaminado por óleo diesel. Já as plantas de *Sebastiania commersoniana*, desenvolvidas em solo contaminado por óleo diesel, mostraram tecidos da nervura central menos diferenciados em comparação às plantas do solo não contaminado (Bardelli da Silva 2006).



Figuras 42 a 46. Seções transversais do eofilo das plântulas de *Allophylus edulis* após 30 dias da sementeira; 42, 43 e 44. Detalhes anatômicos do limbo dos eofilos das plântulas em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado por petróleo, respectivamente; 45. Parênquima paliçádico com monocristais (setas) em plântula de solo não contaminado; 46. Região da nervura central de plântula em solo não contaminado. Epiderme face abaxial (Ab), Epiderme face adaxial (Ad), Estômato (Et), Floema (F), Parênquima lacunoso (PL), Parênquima paliçádico (PP) e Xilema (X). Barras 42, 43, 44 e 46 = 100µm. Barra 45 = 50µm.

Quanto à espessura do limbo do eofilo de *A. edulis*, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as plântulas (Fig. 47), como foi verificado em *Rhynchospora corymbosa*, em estudo semelhante realizado por Farias (2005). Ao

contrário, em *Sebastiania commersoniana*, a espessura do limbo foi menor e significativamente diferente nas plantas que se desenvolveram em solo contaminado por óleo diesel (Bardelli da Silva 2006). Outras plantas, como *Mimosa pilulifera* (Inckot 2007) e *Podocarpus lambertii* (Maranho *et al.* 2006), também apresentaram alteração da espessura da lâmina foliar do eofilo por influência do petróleo.

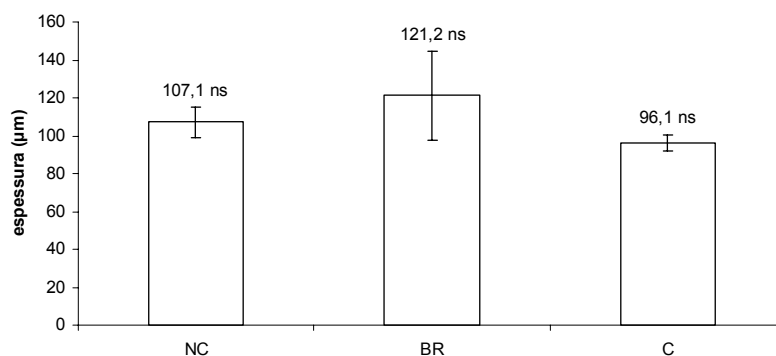


Figura 47 – Espessura do eofilo das plântulas de *Allophylus edulis* em solo não contaminado (NC), solo biorremediado (BR) e solo contaminado (C) com petróleo após 30 dias da semeadura. Valores representam a média e barras indicam o desvio-padrão. Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ns – não significativo).

A diferenciação estrutural das raízes da plântula de *Allophylus edulis* foi afetada significativamente pela contaminação do solo com petróleo, nas regiões apical, de revestimento, cortical e do cilindro central. O processo de biorremediação do solo diminuiu a ação tóxica do petróleo, mas não impediu a ocorrência de alterações estruturais de tecidos importantes da raiz, como os meristemas, a epiderme, endoderme e tecidos vasculares.

A porção aérea da plântula dessa espécie foi afetada minimamente pela ação do petróleo, ocorrendo modificação estrutural significativa apenas na espessura da lâmina cotiledonar e na epiderme do eofilo.

As alterações estruturais, verificadas nas plântulas de *Allophylus edulis*, por ação do petróleo, não afetaram a resistência da espécie durante o desenvolvimento em solo contaminado por este poluente no período de realização do experimento.

5. CONCLUSÃO

A contaminação do solo não interferiu na germinação das sementes de *Allophylus edulis* nos tratamentos analisados, porém afetou a estrutura interna das raízes. A biorremediação do solo favoreceu o crescimento das plântulas e minimizou a ação tóxica do petróleo, porém não impediu a alteração de alguns tecidos da raiz nas plântulas submetidas ao solo contaminado com petróleo. De acordo com as condições de experimento deste trabalho, os indivíduos de *A. edulis* demonstraram ser tolerantes a contaminação do solo com hidrocarbonetos, apresentando grande potencial para estudos relacionados à fitorremediação.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C. A. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Allophylus edulis* (St.-Hil.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 59-66, 2005.
- ACHUBA, F. I. The Effect of Sublethal Concentrations of Crude Oil on the Growth and Metabolism of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Seedlings. **The Environmentalist**, v. 26, p. 17-20, 2006.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environmental Geochemistry an Health**, v. 21, p. 353-357, 1999.
- _____. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370, 2002.
- AGBOGIDI, O. M.; ONOSODE, A. T.; OKONTA, B. C. Susceptibility of *Dennettia tripetala* (Bak.) F. seeds to crude oil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 4, n. 2, p. 350-352, 2006.
- ALKIO, M. et al. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, 2005.
- BAKER, J. M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, v. 1, p. 27-44, 1970.

- BAMIDELE, J. F.; AGBOGIDI, O. M. Toxic of odidi petroleum oil and its water soluble faction on three aquatic macrophytes. **Nigerian Journal of Science and Environment**, v. 2, p. 113–121, 2000.
- BANKS, M. K; SCHULTZ, K. E. Comparison of Plants for Germination Toxicity Tests in Petroleum-Contaminated Soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 211–219, 2005.
- BARDDAL, M. L. **Aspectos florísticos e fitossociológicos do componente arbóreo-arbustivo de uma Floresta Ombrófila Mista Aluvial – Araucária, PR**. Curitiba, 2002, 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.
- BARDELLI-DA-SILVA, M. Y. **Efeitos do solo contaminado com óleo diesel na germinação, crescimento e morfoanatomia de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L.B.Sm. e Downs (Euphorbiaceae)**. Curitiba, 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V. Plant adaptation to oil stress. **Russian Journal of Ecology**, v. 35, n. 5, p. 290-295, 2004.
- COLLIN, P. H. **Dictionary of Ecology and the Environment**. London: Peter Collin Publishing, 2001.
- CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 55-114, 1996.
- DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.
- FARIAS, L. H. M. **Efeitos do solo contaminado por petróleo nas folhas e raízes de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britt. (Cyperaceae)**. Curitiba, 2005, 75f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- FREITAS, R. 2000. Atentado ao Iguaçu. **Revista Época**. Disponível em: <<http://epoca.globo.com/edic/20000724/index.htm>> Acesso em: 06 abr. 2008.
- FURTADO, M. 2002. Petrobrás descontamina vazamento com micróbios. **Revista Química e Derivados**. Disponível em: <<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd404/ambiente1.htm>> Acesso em: 06 abr. 2008.
- GILL, L. S.; NYAWUAME, H. G. K.; EHIKHAMETALOR, A. O. Effect of crude oil on the growth and anatomical features of *Chromolaena odorata* (L) K. e R. **Newsletter**, v. 6, n.1, p.1-6, 1992.

- HUTCHINSON, S. L.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 395-403, 2001.
- INCKOT, R. C. **Germinação, desenvolvimento e morfoanatomia de *Mimosa pilulifera* Bentham (Leguminosae) em solo contaminado por petróleo e solo biorremediado**. Curitiba, 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book Co. Inc., 1940.
- KECHAVARZI, C. et al. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 68-74, 2007.
- KINAKO, P. D. S. Short-term effects of oil pollution on species numbers and productivity of a simple terrestrial ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 26, p. 87-91, 1981.
- KRAUS, E. J.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000.
- LI, X.; FENG, Y.; SAWATSKY, N. Importance of soil–water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. **Plant and Soil**, v. 192, p. 219–226, 1997.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.
- MA, Z.; BIELENBERG, D. G.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environmentalist**, v. 24, p. 459-467, 2001.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p. 176-177, 1962.
- MALALLAH, G. et al. *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 2, p. 213–217, 1996.
- MARANHO, L. T. et al. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n.3, p. 615-624, 2006.
- MAYER, J. L. S. et al. Efeito do solo contaminado com petróleo no crescimento e desenvolvimento de *Capomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae). In: Simpósio Nacional e Congresso Latino-Americano sobre Recuperação de Áreas Degradadas, 6, 2005, Curitiba. **Anais do 6º Simpósio Nacional e**

Congresso Latino-americano sobre Recuperação de Áreas Degradadas.
Curitiba: UFPR, 2005.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 100, p. 405-414, 1976.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the Tropics - The Effect of Crude Oil on the Growth of Tropical Plants. **Bioremediation Journal**, v. 8 (3-4), p. 177-184, 2004.

_____. Phytoremediation in the Tropics – Influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 86-91, 2005.

MORLEY, C. P. et al. Organic compounds at different depths in a sand soil and their role in water repellency. **Australian Journal of Soil Research**, v. 43, n.3, p. 239-249, 2005.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, **59**: p. 368-373, 1965.

ODOKUMA, L. O.; DICKSON, A. A. Biorremediation of a crude oil polluted tropical mangrove environment. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 7, n. 2, p. 23-29, 2003.

OGBONNA, D. N. et al. Effect of bioremediation on the growth of Okro (*Abelmoshus esculetus*) in the Niger Delta soils. **Environmentalist**, v. 27, p. 303-309, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PEÑA-CASTRO, J. M. et al. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. **Plant Science**, v. 170, p. 724-731, 2006.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Reviews Plant Biology**, vol. 56, p. 15-39, 2005.

PROFFITT, C. E.; DELVIN, D. J.; LINDSEY, M. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 788-793, 1995.

REITZ, R. Sapindáceas. In: Reitz, R. (ed.) **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980.

RENTZ, J. A.; CHAPMAN, B.; ALVAREZ, P. J. J; SCHNOOR, J. L. Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum-contaminated soils through oxygen

- addition and soil nutrient amendments. **International Journal of Phytoremediation**, v.5, n.1, p. 57-62, 2003.
- REZENDE, I. M. **Efeito do solo contaminado por óleo diesel na germinação e desenvolvimento das plântulas de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Curitiba, 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- RODRIGUES, T. T. **Os efeitos do solo contaminado com petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (MYRTACEAE) e *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (EUPHORBIACEAE)**. Curitiba, 2005, 154f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.
- ROY, J. L.; MCGILL, W. B.; LOWEN, H. A.; JOHNSON, R. L. Relationship between water repellency and native and petroleum-derived organic carbon in soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n.2, p.583-590, 2003.
- SANTOS, G. de O. **Crescimento, nutrição e estrutura do lenho juvenil de três espécies florestais com potencial de fitorremediação em solos contaminados com petróleo**. Curitiba, 2006, 179f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2ª ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951.
- SILVA, M. P. et al. Monitoramento da Influência do derramamento de petróleo por meio da estrutura da folha de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae). In: **55º Congresso Nacional de Botânica (Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES)**, Viçosa, MG: UFV, CD-ROM, 2004.
- SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: The Clarendon Press, v. 2, 1908. p. 890.
- SUNG, K. et al. Plant contamination by organic pollutants in phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 2081-2090, 2001.
- SUOMINEN, L. et al. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 239-244, 2000.
- TISCHER, S.; HÜBNER, T. Model trials for phytoremediation of hydrocarbon-contaminated sites by the use of different plant species. **International Journal of Phytoremediation**, v. 4, n. 3, p. 187-203, 2002.
- WILLIAN, A.; PATTERSON, I. I. I.; OLSON, J. J. Effects of heavy metals on radicle growth of selected woody species germinated on filter paper, mineral

and organic soil substrates. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 13, p. 233-238, 1982.

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

ZHANG, C. G. et al. Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorhiza*) to lubricating oil pollution. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 127–136, 2007.

ANEXO I – Normas para submissão de artigos na Revista Rodriguésia

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo

A *Rodriguésia* é uma publicação trimestral do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que publica artigos e notas científicas, em Português, Espanhol ou Inglês em todas as áreas da Biologia Vegetal, bem como em História da Botânica e atividades ligadas a Jardins Botânicos.

Encaminhamento dos manuscritos

Os manuscritos devem ser enviados em 3 vias impressas e em CD-ROM à:

Revista Rodriguésia

Rua Pacheco Leão 915

Rio de Janeiro - RJ

CEP: 22460-030

Brasil

e-mail: rodriguesia@jbrj.gov.br

Os artigos devem ter no máximo 30 páginas digitadas, aqueles que ultrapassem este limite poderão ser publicados após avaliação do Corpo Editorial. O aceite dos trabalhos depende da decisão do Corpo Editorial.

Todos os artigos serão submetidos a 2 consultores *ad hoc*.

Aos autores será solicitado, quando necessário, modificações de forma a adequar o trabalho às sugestões dos revisores e editores. Artigos que não estiverem nas normas descritas serão devolvidos.

Serão enviadas aos autores as provas de página, que deverão ser devolvidas ao Corpo Editorial em no máximo 5 dias úteis a partir da data do recebimento.

Os trabalhos, após a publicação, ficarão disponíveis em formato digital (PDF, AdobeAcrobat) no site do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://rodriguesia.jbrj.gov.br>).

Formato dos manuscritos

Os autores devem utilizar o editor do texto Microsoft Word, versão 6.0 ou superior, fonte Times New Roman, corpo 12, em espaço duplo.

O manuscrito deve ser formatado em tamanho A4, com margens de 2,5 cm e alinhamento justificado, exceto nos casos indicados abaixo, e impresso em apenas um lado do papel. Todas as páginas, exceto a do título, devem ser numeradas, consecutivamente, no canto superior direito. Letras maiúsculas

devem ser utilizadas apenas se as palavras exigem iniciais maiúsculas, de acordo com a respectiva língua do manuscrito. Não serão considerados manuscritos escritos inteiramente em maiúsculas.

Palavras em latim devem estar em itálico, bem como os nomes científicos genéricos e infragenéricos.

Utilizar nomes científicos completos (gênero, espécie e autor) na primeira menção, abreviando o nome genérico subseqüentemente, exceto onde referência a outros gêneros cause confusão. Os nomes dos autores de táxons devem ser citados segundo Brummitt & Powell (1992), na obra "Authors of Plant Names".

Primeira página - deve incluir o título, autores, instituições, apoio financeiro, autor e endereço para correspondência e título abreviado. O título deverá ser conciso e objetivo, expressando a idéia geral do conteúdo do trabalho. Deve ser escrito em negrito com letras maiúsculas utilizadas apenas onde as letras e as palavras devam ser publicadas em maiúsculas.

Segunda página - deve conter Resumo (incluindo título em português ou espanhol), Abstract (incluindo título em inglês) e palavras-chave (até 5, em português ou espanhol e inglês). Resumos e abstracts devem conter até 200 palavras cada. O

Corpo Editorial pode redigir o Resumo a partir da tradução do Abstract em trabalhos de autores não fluentes em português.

Texto – Iniciar em nova página de acordo com seqüência apresentada a seguir: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. Estes itens podem ser omitidos em trabalhos sobre a descrição de novos táxons, mudanças nomenclaturais ou similares. O item Resultados pode ser agrupado com Discussão quando mais adequado. Os títulos (Introdução, Material e Métodos etc.) e subtítulos deverão ser em negrito. Enumere as figuras e tabelas em arábico de acordo com a seqüência em que as mesmas aparecem no texto. As citações de referências no texto devem seguir os seguintes exemplos: Miller (1993), Miller & Maier (1994), Baker *et al.* (1996) para três ou mais autores ou (Miller 1993), (Miller & Maier 1994), (Baker *et al.* 1996). Referência a dados ainda não publicados ou trabalhos submetidos deve ser citada conforme o exemplo: (R.C. Vieira, dados não publicados). Cite resumos

de trabalhos apresentados em Congressos, Encontros e Simpósios se estritamente necessário.

O material examinado nos trabalhos taxonômicos deve ser citado obedecendo a seguinte ordem: local e data de coleta, fl., fr., bot. (para as fases fenológicas), nome e número do coletor (utilizando *et al.* quando houver mais de dois) e sigla(s) do(s) herbário(s) entre parêntesis, segundo o *Index Herbariorum*.

Quando não houver número de coletor, o número de registro do espécime, juntamente com a sigla do herbário, deverá ser citado. Os nomes dos países e dos estados/províncias deverão ser citados por extenso, em letras maiúsculas e em ordem alfabética, seguidos dos respectivos materiais estudados.

Exemplo:

BRASIL. BAHIA: Ilhéus, Reserva da CEPEC, 15.XII.1996, fl. e fr., R. C. *Vieira et al.* 10987 (MBM, RB, SP).

Para números decimais, use vírgula nos artigos em Português e Espanhol (exemplo: 10,5 m) e ponto em artigos em Inglês (exemplo: 10.5 m). Separe as unidades dos valores por um espaço (exceto em porcentagens, graus, minutos e segundos).

Use abreviações para unidades métricas do Systeme International d'Unités (SI) e símbolos químicos amplamente aceitos. Demais abreviações podem ser utilizadas, devendo ser precedidas de seu significado por extenso na primeira menção.

Referências Bibliográficas - Todas as referências citadas no texto devem estar listadas neste item. As referências bibliográficas devem ser relacionadas em ordem alfabética, pelo sobrenome do primeiro autor, com apenas a primeira letra em caixa alta, seguido de todos os demais autores. Quando houver repetição do(s) mesmo(s) autor(es), o nome do mesmo deverá ser substituído por um travessão; quando o mesmo autor publicar vários trabalhos num mesmo ano, deverão ser acrescentadas letras alfabéticas após a data. Os títulos de periódicos não devem ser abreviados.

Exemplos:

Tolbert, R. J. & Johnson, M. A. 1966. A survey of the vegetative shoot apices in the family Malvaceae. *American Journal of Botany* 53(10): 961-970.

Engler, H. G. A. 1878. Araceae. *In*: Martius, C. F. P. von; Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig, 3(2): 26-223.

_____. 1930. Liliaceae. *In*: Engler, H. G. A. & Prantl, K. A. E. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 2. Aufl. Leipzig (Wilhelm Engelmann). 15: 227-386.

Sass, J. E. 1951. Botanical microtechnique. 2ed. Iowa State College Press, Iowa, 228p.

Cite teses e dissertações se estritamente necessário, isto é, quando as informações requeridas para o bom entendimento do texto ainda não foram publicadas em artigos científicos.

Tabelas - devem ser apresentadas em preto e branco, no formato Word for Windows. No texto as tabelas devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Apenas algumas espécies apresentam indumento (Tab. 1)...”

“Os resultados das análises fitoquímicas são apresentados na Tabela 2...”

Figuras - não devem ser inseridas no arquivo de texto. Submeter originais em preto e branco e três cópias de alta resolução para fotos e ilustrações, que também podem ser enviadas em formato eletrônico, com alta resolução, desde que estejam em formato TIF ou compatível com CorelDraw, versão 10 ou superior. Ilustrações de baixa qualidade resultarão na devolução do manuscrito.

No caso do envio das cópias impressas a numeração das figuras, bem como textos nelas inseridos, devem ser assinalados com Letraset ou similar em papel transparente (tipo manteiga), colado na parte superior da prancha, de maneira a sobrepor o papel transparente à prancha, permitindo que os detalhes apareçam nos locais desejados pelo autor. Os gráficos devem ser em preto e branco, possuir bom contraste e estar gravados em arquivos separados em disquete (formato TIF ou outro compatível com CorelDraw 10). As pranchas devem possuir no máximo 15 cm larg. x 22 cm comp. (também serão aceitas figuras que caibam em uma coluna, ou seja, 7,2 cm larg.x 22 cm comp.). As figuras que excederem mais de duas vezes estas medidas serão recusadas.

As imagens digitalizadas devem ter pelo menos 600 dpi de resolução.

No texto as figuras devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo:

“Evidencia-se pela análise das Figuras 25 e 26....”

“Lindman (Fig. 3) destacou as seguintes características para as espécies...”

ANEXO II - Normas para submissão de artigos na Acta Botanica Brasilica

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivo

A Acta Botanica Brasilica, publica artigos originais em todas as áreas da Botânica, básica ou aplicada, em Português, Inglês ou Espanhol. Os trabalhos deverão ser motivados por uma pergunta central que denote a originalidade e o potencial interesse da pesquisa, de acordo com o amplo espectro de leitores nacionais e internacionais da Revista, inserindo-se no debate teórico de sua área.

Normas gerais para publicação de artigos na Acta Botanica

1. A Acta Botanica Brasilica publica artigos originais em todas as áreas da Botânica, básica ou aplicada, em Português, Espanhol ou Inglês. Os trabalhos deverão ser motivados por uma pergunta central que denote a originalidade e o potencial interesse da pesquisa, de acordo com o amplo espectro de leitores nacionais e internacionais da Revista, inserindo-se no debate teórico de sua área.

2. Os artigos devem ser concisos, em quatro vias, com até 25 laudas, seqüencialmente numeradas, incluindo ilustrações e tabelas (usar fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço entre linhas 1,5; imprimir em papel tamanho A4, margens ajustadas em 1,5 cm). A critério da Corpo Editorial, mediante entendimentos prévios, artigos mais extensos poderão ser aceitos, sendo o excedente custeado pelo(s) autor(es).

3. Palavras em latim no título ou no texto, como por exemplo: *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.* devem estar em itálico.

4. O título deve ser escrito em caixa alta e baixa, centralizado, e deve ser citado da mesma maneira no Resumo e Abstract da mesma maneira que o título do trabalho. Se no título houver nome específico, este deve vir acompanhado dos nomes dos autores do táxon, assim como do grupo taxonômico do material tratado (ex.: Gesneriaceae, Hepaticae, etc.).

5. O(s) nome(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) em caixa alta e baixa, todos em seguida, com números sobrescritos que indicarão, em rodapé, a filiação Institucional e/ou fonte financiadora do trabalho (bolsas, auxílios etc.). Créditos de financiamentos devem vir em Agradecimentos, assim como vinculações do artigo a programas de pesquisa mais amplos, e não no rodapé.

Autores devem fornecer os endereços completos, evitando abreviações, elegendo apenas um deles como Autor para correspondência. Se desejarem, todos os autores poderão fornecer e-mail.

6. A estrutura do trabalho deve, sempre que possível, obedecer à seguinte seqüência:

- RESUMO e ABSTRACT (em caixa alta e negrito) - texto corrido, sem referências bibliográficas, em um único parágrafo e com cerca de 200 palavras. Deve ser precedido pelo título do artigo em Português, entre parênteses. Ao final do resumo, citar até cinco palavras-chave à escolha do autor, em ordem de importância. A mesma regra se aplica ao Abstract em Inglês ou Resumen em Espanhol.

- Introdução (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter uma visão clara e concisa de: a) conhecimentos atuais no campo específico do assunto tratado; b) problemas científicos que levou(aram) o(s) autor(es) a desenvolver o trabalho; c) objetivos.

- Material e métodos (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): deve conter descrições breves, suficientes à repetição do trabalho; técnicas já publicadas devem ser apenas citadas e não descritas. Indicar o nome da(s) espécie(s) completo, inclusive com o autor. Mapas - podem ser incluídos se forem de extrema relevância e devem apresentar qualidade adequada para impressão. Todo e qualquer comentário de um procedimento utilizado para a análise de dados em Resultados deve, obrigatoriamente, estar descrito no item Material e métodos.

- Resultados e discussão (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): podem conter tabelas e figuras (gráficos, fotografias, desenhos, mapas e pranchas) estritamente necessárias à compreensão do texto. Dependendo da estrutura do trabalho, resultados e discussão poderão ser apresentados em um mesmo item ou em itens separados.

As figuras devem ser todas numeradas seqüencialmente, com algarismos arábicos, colocados no lado inferior direito; as escalas, sempre que possível, devem se situar à esquerda da figura. As tabelas devem ser seqüencialmente numeradas, em arábico com numeração independente das figuras.

Tanto as figuras como as tabelas devem ser apresentadas em folhas separadas (uma para cada figura e/ou tabela) ao final do texto (originais e 3

cópias). Para garantir a boa qualidade de impressão, as figuras não devem ultrapassar duas vezes a área útil da revista que é de 17,5?23,5 cm. Tabelas - Nomes das espécies dos táxons devem ser mencionados acompanhados dos respectivos autores. Devem constar na legenda informações da área de estudo ou do grupo taxonômico. Itens da tabela, que estejam abreviados, devem ter suas explicações na legenda.

As ilustrações devem respeitar a área útil da revista, devendo ser inseridas em coluna simples ou dupla, sem prejuízo da qualidade gráfica. Devem ser apresentadas em tinta nanquim, sobre papel vegetal ou cartolina ou em versão eletrônica, gravadas em .TIF, com resolução de pelo menos 300 dpi (ideal em 600 dpi). Para pranchas ou fotografias - usar números arábicos, do lado direito das figuras ou fotos. Para gráficos - usar letras maiúsculas do lado direito.

As fotografias devem estar em papel brilhante e em branco e preto. Fotografias coloridas poderão ser aceitas a critério da Corpo Editorial, que deverá ser previamente consultada, e se o(s) autor(es) arcar(em) com os custos de impressão.

As figuras e as tabelas devem ser referidas no texto em caixa alta e baixa, de forma abreviada e sem plural (Fig. e Tab.). Todas as figuras e tabelas apresentadas devem, obrigatoriamente, ter chamada no texto.

Legendas de pranchas necessitam conter nomes dos táxons com respectivos autores. Todos os nomes dos gêneros precisam estar por extenso nas figuras e tabelas. Gráficos - enviar os arquivos em Excel. Se não estiverem em Excel, enviar cópia em papel, com boa qualidade, para reprodução.

As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, devem ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Usar unidades de medida de modo abreviado (Ex.: 11 cm; 2,4 µm), o número separado da unidade, com exceção de percentagem (Ex.: 90%).

Escrever por extenso os números de um a dez (não os maiores), a menos que seja medida. Ex.: quatro árvores; 6,0 mm; 1,0 4,0 mm; 125 exsiccatas.

Em trabalhos taxonômicos o material botânico examinado deve ser selecionado de maneira a citarem-se apenas aqueles representativos do táxon em questão e na seguinte ordem: PAÍS. Estado: Município, data, fenologia, *coletor(es)* número do(s) *coletor(es)* (*sigla do Herbário*).

Ex.: BRASIL. São Paulo: Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., *Milanez 435* (SP).

No caso de mais de três coletores, citar o primeiro seguido de *et al.* Ex.: Silva *et al.* (atentar para o que deve ser grafado em CAIXA ALTA, Caixa Alta e Baixa, caixa baixa, negrito, itálico).

Chaves de identificação devem ser, preferencialmente, indentadas. Nomes de autores de táxons não devem aparecer. Os táxons da chave, se tratados no texto, devem ser numerados seguindo a ordem alfabética. Ex.:

1. Plantas terrestres

2. Folhas orbiculares, mais de 10 cm diâm.

..... 2. *S. orbicularis*

2. Folhas sagitadas, menos de 8 cm compr.

..... 4. *S. sagittalis*

1. Plantas aquáticas

3. Flores brancas 1. *S. albicans*

3. Flores vermelhas 3. *S. purpurea*

O tratamento taxonômico no texto deve reservar o itálico e o negrito simultâneos apenas para os nomes de táxons válidos. Basiônimo e sinonímia aparecem apenas em itálico. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com índice taxonômico do grupo em pauta (Brummit & Powell 1992 para Fanerógamas). Ex.:

1. *Sepulveda albicans* L., Sp. pl. 2: 25. 1753.

Pertencia *albicans* Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.

Fig. 1-12

Subdivisões dentro de Material e métodos ou de Resultados e/ou discussão devem ser escritas em caixa alta e baixa, seguida de um traço e o texto segue a mesma linha. Ex.: Área de estudo - localiza se ...

Resultados e discussão devem estar incluídos em conclusões.

- Agradecimentos (em caixa alta e baixa, negrito, deslocado para a esquerda): devem ser sucintos; nomes de pessoas e Instituições devem ser por extenso, explicitando o porquê dos agradecimentos.

- Referências bibliográficas

- Ao longo do texto: seguir esquema autor, data. Ex.:

Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva et al. (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) ou (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).

- Ao final do artigo: em caixa alta e baixa, deslocado para a esquerda; seguir ordem alfabética e cronológica de autor(es); nomes dos periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito. Exemplos:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica. Aracaju 1992. São Paulo, HUCITEC Ed. v.l.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. Hoehnea 33(2): 38-45.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F.C. Hoehne (ed.). Flora Brasilica. São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Para maiores detalhes consulte os últimos fascículos recentes da Revista, ou os links da mesma na internet: www.botanica.org.br. ou ainda artigos on line por intermédio de www.scielo.br/abb.

Não serão aceitas Referências bibliográficas de monografias de conclusão de curso de graduação, de citações resumos simples de Congressos, Simpósios, Workshops e assemelhados. Citações de Dissertações e Teses devem ser evitadas ao máximo; se necessário, citar no corpo do texto. Ex.: J. Santos, dados não publicados ou J. Santos, comunicação pessoal.

ANEXO III – Análise estatística dos dados

Tabela AIII. 1: Número de sementes germinadas por dia e o total de sementes germinadas por repetição de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo.

	Solo não contaminado					Solo biorremediado					Solo contaminado				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	5	0	10	7	6	3	0	10	5	0	5	2	9	5	5
11	7	6	5	7	7	6	5	7	5	5	5	5	4	6	3
12	7	7	6	5	7	9	10	9	8	7	6	11	9	6	7
13	7	6	7	9	6	9	5	5	4	8	7	9	4	5	5
14	5	0	2	1	3	0	1	4	0	0	1	0	0	1	0
15	0	0	1	2	1	0	0	1	2	4	0	1	1	5	2
16	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	1	0	1	1
17	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	31	21	31	32	31	27	28	36	24	27	26	30	28	29	24

Tabela AIII. 2: Porcentagem de germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo.

Repetição	Solo não contaminado		Solo biorremediado		Solo contaminado	
	%	IVG	%	IVG	%	IVG
1	62	2,61	54	2,29	52	2,19
2	42	1,70	56	2,15	60	2,45
3	62	2,70	72	3,12	56	2,45
4	64	2,71	48	2,06	58	2,40
5	62	2,62	54	2,09	48	1,99
Média	58,4	2,47	52,8	2,34	54,8	2,29
DP	9,21	0,43	9,01	0,45	4,82	0,20
EP	3,55	0,17	3,55	0,17	3,55	0,17

Tabela AIII. 3: Análise de variância dos dados referentes às variáveis porcentagem de germinação (%) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Allophylus edulis*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		%	IVG
Tratamento	2	16,267	0,041
Erro	12	63,067	0,141
Total	14	-----	-----
Coefficiente de variação (%)		14,01	15,87
Qui-quadrado (χ^2)		1,624	2,345

Tabela AIII. 4: Biomassa da raiz, da parte aérea e total de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura.

	SOLO NÃO CONTAMINADO						SOLO BIORREMEDIADO						SOLO CONTAMINADO					
	Biomassa raiz (mg)		Biomassa parte aérea (mg)		Biomassa total (mg)		Biomassa raiz (mg)		Biomassa parte aérea (mg)		Biomassa total (mg)		Biomassa raiz (mg)		Biomassa parte aérea (mg)		Biomassa total (mg)	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
1	1,7	11,5	11,8	40,5	13,5	52,0	5,1	29,3	24,3	66,8	29,4	96,1	8,2	34,8	32,5	55,7	40,7	90,5
2	2,5	10,7	14,7	45,5	17,2	56,2	5,6	37,3	28,3	79,3	33,9	116,6	5,8	27,6	23,4	58,6	29,2	86,2
3	3,2	5,5	30,6	47,0	33,8	52,5	7,1	34,8	29,2	68,2	36,3	103,0	5,1	27,9	24,7	58,6	29,8	86,5
4	3,7	13,0	33,9	37,9	37,6	50,9	5,6	31,0	22,6	65,8	28,2	96,8	5,7	13,4	23,9	37,6	29,6	51,0
5	2,8	9,5	25,6	38,1	28,4	47,6	5,3	22,1	22,1	49,0	27,4	71,1	6,6	20,8	31,7	47,8	38,3	68,6
6	3,1	10,4	26,0	46,5	29,1	56,9	5,3	18,2	24,2	38,9	29,5	57,1	7,4	19,1	32,0	57,8	39,4	76,9
7	3,8	7,7	21,7	45,2	25,5	52,9	6,5	33,7	25,3	65,4	31,8	99,1	7,4	14,2	23,3	30,3	30,7	44,5
8	3,9	9,5	26,7	34,8	30,6	44,3	7,6	28,7	30,9	58,1	38,5	86,8	7,3	17,9	26,3	42,3	33,6	60,2
9	3,9	6,9	30,7	48,2	34,6	55,1	7,7	29,9	29,0	49,7	36,7	79,6	5,0	18,6	21,2	48,4	26,2	67,0
10	4,5	8,2	26,1	23,5	30,6	31,7	5,0	24,3	22,3	43,3	27,3	67,6	5,4	26,8	22,0	58,7	27,4	85,5
11	3,4	13,7	27,8	43,5	31,2	57,2	4,9	19,4	19,7	48,2	24,6	67,6	8,6	30,5	31,1	61,9	39,7	92,4
12	5,7	12,2	27,6	57,1	33,3	69,3	9,1	30,5	39,1	80,6	48,2	111,1	6,3	19,3	25,6	64,1	31,9	83,4
13	5,2	12,7	30,8	57,9	36,0	70,6	9,0	26,7	37,0	73,6	46,0	100,3	6,5	22,7	24,3	40,0	30,8	62,7
14	5,0	9,9	34,3	56,8	39,3	66,7	5,6	25,5	26,9	51,0	32,5	76,5	5,7	17,8	21,4	61,8	27,1	79,6
15	3,3	8,6	26,1	39,4	29,4	48,0	3,3	28,4	17,0	70,4	20,3	98,8	2,8	25,5	22,9	62,4	25,7	87,9
Média	3,71	10,0	26,3	44,1	30,0	54,1	6,18	28,0	26,5	60,5	32,7	88,5	6,25	22,5	25,7	52,4	32,0	74,9
DP	1,06	2,37	6,27	9,16	7,02	9,93	1,62	2,51	6,01	13,19	7,56	17,69	1,45	3,78	4,04	10,60	5,16	15,01
EP	0,36	0,76	1,43	2,87	1,72	3,76	0,36	0,76	1,43	2,87	1,72	3,76	0,36	0,76	1,43	2,87	1,72	3,76

Tabela AIII. 5: Comprimento da raiz, altura da parte aérea e área foliar de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo após 30 e 60 dias da semeadura.

	SOLO NÃO CONTAMINADO						SOLO BIORREMEDIADO						SOLO CONTAMINADO					
	Comprimento raiz (cm)		Altura parte aérea (cm)		Área foliar (cm ²)		Comprimento raiz (cm)		Altura parte aérea (cm)		Área foliar (cm ²)		Comprimento raiz (cm)		Altura parte aérea (cm)		Área foliar (cm ²)	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
1	2,9	6,5	3,4	4,5	0,37	1,50	4,2	6,2	3,8	5,6	0,37	3,30	7,5	9,0	4,2	4,7	1,95	1,85
2	4,6	4,6	2,8	4,6	0,38	1,25	4,6	8,3	4,3	5,7	1,36	3,12	6,5	6,9	4,9	5,1	1,62	2,12
3	5,4	5,3	3,5	4,4	1,38	1,92	6,2	5,9	3,9	6,0	1,53	3,22	6,2	9,0	4,0	5,2	1,99	2,77
4	5,8	5,3	3,0	4,3	1,76	1,85	5,0	8,2	6,2	4,9	1,31	3,22	5,3	6,5	5,5	4,1	1,13	1,41
5	5,6	5,8	3,4	4,5	1,40	1,52	6,6	6,7	5,5	5,4	1,13	2,80	6,8	6,7	3,7	6,0	1,48	2,49
6	4,4	5,3	4,1	4,1	1,25	1,82	5,0	5,2	6,0	4,2	1,24	2,47	6,5	7,0	5,0	5,2	2,28	2,02
7	5,5	5,7	3,6	4,8	1,06	1,34	5,5	10,0	4,0	5,8	1,48	2,90	8,2	8,0	4,0	4,0	1,83	1,37
8	5,2	6,0	4,1	4,0	1,58	1,69	5,0	7,5	4,8	5,0	1,68	2,31	5,9	7,0	4,2	4,3	1,74	2,08
9	6,1	5,5	3,7	4,5	1,04	1,95	6,5	9,0	4,0	4,1	2,51	2,98	6,3	8,7	4,5	4,8	1,19	1,85
10	4,8	6,2	4,0	3,2	1,35	2,12	6,3	10,0	4,6	4,0	1,69	2,50	5,3	7,4	4,3	5,6	1,44	2,39
11	5,2	5,7	3,9	4,3	1,51	2,84	5,6	7,5	4,3	5,3	1,11	2,36	6,6	6,5	5,1	5,2	1,99	3,49
12	6,4	5,8	3,9	4,2	1,33	0,65	5,9	7,0	5,0	6,4	2,80	4,39	7,0	6,4	4,3	5,7	1,39	3,15
13	5,2	4,6	3,7	4,7	1,21	2,26	6,3	7,1	6,3	5,8	2,28	2,83	5,5	7,0	3,7	4,7	1,65	2,40
14	6,0	5,8	4,1	6,0	1,06	1,33	5,1	7,0	6,0	5,3	1,20	2,30	9,0	5,8	5,0	5,6	0,97	2,44
15	4,8	5,9	4,1	5,3	1,33	2,03	5,2	6,5	5,1	6,6	1,19	2,77	6,9	8,4	5,0	5,1	0,47	3,31
Média	5,19	5,60	3,69	4,49	1,20	1,74	5,53	7,47	4,92	5,34	1,53	2,90	6,63	7,35	4,49	5,02	1,54	2,34
DP	0,85	0,25	0,18	0,62	0,39	0,51	0,74	0,32	0,38	0,79	0,61	0,53	1,03	0,45	0,40	0,59	0,47	0,63
EP	0,23	0,09	0,15	0,17	0,13	0,15	0,23	0,09	0,15	0,17	0,13	0,15	0,23	0,09	0,15	0,17	0,13	0,15

Tabela AIII. 6: Análise de variância dos dados referentes às variáveis biomassa da raiz, biomassa da parte aérea e biomassa total de *Allophylus edulis*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio					
		Biomassa raiz		Biomassa parte aérea		Biomassa total	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Tratamento	2	31,354	1273,2	2,360	1011,9	29,450	4503,2
Erro	42	1,956	8,716	30,598	123,44	44,311	212,33
Total	44	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	25,99	14,65	21,12	21,22	21,08	20,10
	Qui-quadrado (χ^2)	2,428	3,749	2,847	1,849	2,062	4,332

Tabela AIII. 7: Análise de variância dos dados referentes às variáveis comprimento da raiz, altura da parte aérea e área foliar de *Allophylus edulis*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio					
		Comprimento raiz		Altura parte aérea		Área foliar	
		30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Tratamento	2	8,498	16,495	1,989	2,742	0,551	5,034
Erro	42	0,775	0,120	0,113	0,450	0,248	0,317
Total	44	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	15,21	5,09	7,70	13,55	34,97	24,19
	Qui-quadrado (χ^2)	1,490	4,585	2,343	1,404	2,849	0,719

Tabela AIII. 8: Diâmetro da raiz e do hipocótilo de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo após 30 dias da semeadura.

	Solo não contaminado		Solo biorremediado		Solo contaminado	
	Diâmetro raiz (μm)	Diâmetro hipocótilo (μm)	Diâmetro raiz (μm)	Diâmetro hipocótilo (μm)	Diâmetro raiz (μm)	Diâmetro hipocótilo (μm)
1	726,7	1240,0	700,0	1260,0	726,7	1153,3
2	706,7	1240,0	713,3	1246,7	740,0	1133,3
3	720,0	1220,0	706,7	1253,3	746,7	1166,7
4	740,0	1246,7	720,0	1253,3	720,0	1166,7
5	746,7	1233,3	693,3	1280,0	726,7	1180,0
Média	728,0	1236,0	706,7	1258,7	732,0	1160,0
DP	101,43	120,47	68,16	132,02	115,31	104,41
EP	56,01	68,99	56,01	68,99	56,01	68,99

Tabela AIII. 9: Espessura do cotilédone, do eofilo e índice estomático de *Allophylus edulis* em solo não contaminado, solo biorremediado e solo contaminado com petróleo após 30 dias da semeadura.

	SOLO NÃO CONTAMINADO			SOLO BIORREMEDIADO			SOLO CONTAMINADO		
	Espessura cotilédone (μm)	Espessura eofilo (μm)	Índice estomático (mm^2)	Espessura cotilédone (μm)	Espessura eofilo (μm)	Índice estomático (mm^2)	Espessura cotilédone (μm)	Espessura eofilo (μm)	Índice estomático (mm^2)
1	1066,7	111,5	341,7	1386,7	121,2	366,7	986,7	94,4	366,7
2	1073,3	105,6	358,3	1400,0	121,9	341,7	973,3	95,1	325,0
3	1060,0	106,3	383,3	1373,3	121,2	275,0	966,7	98,1	275,0
4	1053,3	107,0	300,0	1393,3	118,2	300,0	953,3	98,9	375,0
5	1080,0	104,8	308,3	1400,0	123,4	375,0	980,0	93,7	450,0
Média	1066,7	107,0	338,3	1390,7	121,2	331,7	972,0	96,0	358,3
DP	149,68	8,15	34,65	78,62	23,67	43,07	138,79	4,35	64,82
EP	72,92	8,47	22,0	72,92	8,47	22,0	72,92	8,47	22,0

Tabela AIII. 10: Análise de variância dos dados referentes às variáveis diâmetro da raiz e do hipocótilo, espessura do cotilédone e do eofilo e índice estomático de *Allophylus edulis*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio				
		Diâmetro raiz	Diâmetro hipocótilo	Espessura cotilédone	Espessura eofilo	Índice estomático
Tratamento	2	556,44	8485,33	144609,7	474,808	963,038
Erro	12	9409,77	14280,8	15950,22	215,162	2419,10
Total	14	-----	-----	-----	-----	-----
	Coefficiente de variação (%)	13,43	9,82	11,05	13,57	14,35
	Qui-quadrado (χ^2)	0,443	0,090	0,686	4,338	1,490