

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

PATRÍCIA CRISTINA FERREIRA CAIXETA

**MINHOCAS DA ESPÉCIE *Eisenia fetida* COMO BIOINDICADOR DE SOLO
CONTAMINADO COM ÓLEO DE MOTOR REMEDIADO POR
BIOESTIMULAÇÃO**

UBERLÂNDIA
JUNHO 2021

PATRÍCIA CRISTINA FERREIRA CAIXETA

**MINHOCAS DA ESPÉCIE *Eisenia fetida* COMO BIOINDICADOR DE SOLO
CONTAMINADO COM ÓLEO DE MOTOR REMEDIADO POR
BIOESTIMULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentada no curso de Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

**Orientador: Prof. Dr. Lucas Carvalho
Basílio de Azevedo**

**UBERLÂNDIA - MG
JUNHO, 2021**

PATRÍCIA CRISTINA FERREIRA CAIXETA

Minhocas da espécie *Eisenia fetida* como bioindicador de solo contaminado com óleo de motor remediado por bioestimulação

Trabalho de conclusão de curso apresentada no curso de Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Uberlândia, Junho de 2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lucas Carvalho Basílio de Azevedo – Docente ICIAG UFU

Gabriel Sousa Alves – Engenheiro Ambiental e Mestre em Qualidade Ambiental UFU

Lúcio Carlos Resende – Mestrando IEE - USP

Uberlândia (MG), junho de 2021

RESUMO

A Revolução Industrial iniciada em meados do século XVIII transformou os métodos de produção e consumo no mundo, o qual trocou a força motriz humana por máquinas. O uso de lubrificantes nas máquinas tem o intuito de garantir o seu funcionamento e maior rendimento. Após a vida útil, o lubrificante é descartado, sendo chamado de óleo lubrificante queimado. No entanto, parte do óleo lubrificante queimado produzido não é adequadamente coletado e tratado, gerando riscos de contaminação ambiental. Para o tratamento de solos contaminados com derivados de petróleo, técnicas de remediações são aplicadas. A remediação biológica biorremediação é a mais utilizada para a descontaminação de derivados de petróleo, visto que a biodegradação é capaz de remediar moléculas médias e pesadas de hidrocarbonetos. Neste trabalho foi utilizado o método de biorremediação em amostras de Latossolo Amarelo Distrófico de textura arenosa contaminado com óleo lubrificante queimado derivado de petróleo por estimulação da microbiota com nutrientes, aeração e controle de umidade. O teste foi feito no laboratório em triplicatas por 4 semanas. O resultado da remediação foi analisado pelo teste de ecotoxicidade por meio do bioindicador *Eisenia fetida* pelo teste de fuga segundo norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011. Conforme descrito na norma, se a fuga ou evitamento dos bioindicadores for maior que 80% o habitat é considerado limitado ou tóxico e se houver perda ou morte maior que 10% dos indivíduos o teste não é válido. O resultado para esse teste foi inválido visto que o número de indivíduos perdidos foi maior que 10%. Apesar disso, o tratamento cujo a bioestimulação teve maior sucesso foi o solo contaminado revolvido e tratado com nutrientes pois apresentou menor letalidade aos bioindicadores apesar de ter a maior rejeição pelas minhocas em relação as outras amostras, provavelmente devido à concentração dos nutrientes adicionados como sais.

Palavras-chave: hidrocarbonetos, petróleo, biorremediação, ecotoxicidade, evitamento.

ABSTRACT

The Industrial Revolution started in the mid of the 18th century and transformed the methods of production and consumption in the world, which changed the human driving force for machines. The use of lubricants in machines is intended to guarantee their operation and greater performance. After its useful life, the lubricant is discarded, being called burnt lubricating oil. However, part of the burnt lubricating oil produced isn't properly collected and treated, generating risks of environmental contamination. For the treatment of soils contaminated with petroleum derivatives, remediation techniques are applied. Biological remediation bioremediation is the most used for the decontamination of petroleum derivatives, since biodegradation is capable of remediating medium and heavy hydrocarbon molecules. In this paper, we used the bioremediation method by biostimulation of Dystrophic Yellow Latosol contaminated with petroleum-derived burnt lubricant oil by stimulating the microbiota with nutrients, aeration and moisture control. The test was done in the lab on triplicate in four weeks. The remediation result was analyzed by the ecotoxicity test using the bioindicator *Eisenia fetida* by the leakage test according to ABNT NBR ISO 17512-1/2011. As described in ABNT NBR ISO 17512-1/2011 if the escape or avoidance of bioindicators is > 80% habitat is considered limited or toxic and if there is loss or death greater than 10% of individuals the test is not valid. The result for this test was invalid since the number of individuals lost was greater than 10%. Despite this, the treatment whose biostimulation was most successful was contaminated soil turned over and treated with nutrients, as it showed less lethality to bioindicators despite having the highest rejection by earthworms in relation to other samples, probably due to the concentration of nutrients added as salts.

Key words: hydrocarbons, petroleum, bioremediation, ecotoxicity, avoidance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração.	7
Figura 2 - Amostras de solo divididas em potes “Solo Não Contaminado”, “Solo Contaminado”, “Solo Contaminado revolvido”, “Solo Contaminado revolvido e tratado com nutrientes” e “Solo Controle” para um experimento.	14
Figura 3 - Divisão dos potes com solos amostrados e solos controles.	15
Figura 4 - Imagem do experimento de capacidade de retenção de água (béquer dentro do pote) e de umidade do solo amostrado (papel com 10g que foi a estufa).	16
Figura 5 – Solo contaminado por óleo lubrificante queimado com o contaminante apenas nos primeiros centímetros do solo.	17
Figura 6 – Potes da amostra “Contaminado revolvido com nutrientes” recebendo os nutrientes.	18
Figura 7 - Recipiente teste circular para o ensaio ecotoxicológico com a divisória entre as amostras de solo.	20
Figura 8 - Organograma da montagem dos potes para o teste de evitamento ou fuga.	21
Figura 9 - Teste de fuga montado em recipientes, com 5cm de altura de solo, 10 minhocas por pote e lacrado por tampa levemente furada para facilitar trocas gasosas.	21

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e limitações da biorremediação de solos.	10
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de nutrientes necessários por kg de solo.	18
Tabela 2 - Quantidade de reagentes utilizados para o tratamento de 400g solo contaminado por pote.	18
Tabela 3 - Resumo dos requisitos para o ensaio de fuga com minhocas.....	19
Tabela 4 - Resultado experimental do teste de fuga com a média de 3 repetições cada (n=3) e concentração de 10.000 ppm (4 ml de contaminante).....	23
Tabela 5 - Resultado experimental do teste de fuga com a média de 3 repetições cada (n=3) e concentração de 20.000 ppm (8 ml de contaminante).....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
3.1 Desenvolvimento das sociedades e a geração de poluentes	2
3.2 Derivados de petróleo	4
3.3 Contaminação por óleos lubrificantes.....	4
3.4 Biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo	5
3.5 Minhocas <i>Eisenia fetida</i> como bioindicadores de contaminação do solo.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Coleta de amostras	13
4.2 Disposição das amostras	14
4.3 Análise de Capacidade de Retenção de Água.....	15
4.4 Contaminação das amostras	16
4.5 Aplicação de nutrientes nas amostras	17
4.6 Teste ecotoxicológico com <i>Eisenia fetida</i>	19
4.7 Análise dos dados	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é um composto orgânico formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Ele vem sendo utilizado desde a Revolução Industrial em meados do século XVIII, onde substituiu gradativamente o carvão mineral como matéria prima. Do petróleo se deriva mais de 6.000 produtos, dentre eles os óleos lubrificantes, sendo um dos resíduos substanciais mais produzidos pela indústria de refino de petróleo (DE QUADROS, 2016).

Os óleos lubrificantes derivados do petróleo são compostos considerados tóxicos por apresentar moléculas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) que são mutagênicos ou carcinogênicos, tornando assim, sua disposição irregular no meio ambiente um fator de grande impacto ambiental (TONINI; DE REZENDE; GRAVITOL, 2010).

Para descontaminação de áreas contaminadas com derivados de petróleo são utilizadas, no mundo todo, remediações químicas, físicas e biológicas, sendo essa última a mais utilizada por ser menos onerosa e gerar menos resíduos que as outras (ZHANG *et. al.*, 2020).

A biorremediação consiste na utilização de microrganismos e seus processos naturais para reduzir ou remover contaminantes de um local. As biorremediações mais utilizadas em contaminações por hidrocarbonetos são aquelas que apresentam o princípio de biodegradação pois esse é um meio eficaz de descontaminar os hidrocarbonetos de moléculas médias e pesadas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (JACQUES *et. al.*, 2007).

Para saber os níveis de contaminação ou eficácia do tratamento de remediação em áreas poluídas geralmente são feitas análises físicas e químicas, que necessitam de equipamentos e testes específicos para gerar resultados. Entretanto uma forma eficaz de se analisar a qualidade de um local contaminado com derivados de petróleo, geralmente os solos, que sofrem maior contaminação pelo produto por descarte irregular de indústrias, derramamentos acidentais em postos de venda de combustível, etc (LEAL, 2017), é estudando a sua fauna.

O uso de bioindicadores para determinar toxicidade de um ambiente entra como uma forma alternativa de estudos de qualidade ambiental. Os testes ecotoxicológicos se tornam viáveis monitoramentos uma vez que são de fácil metodologia e aplicação, baixo custo e respostas rápidas (CHINI, 2014), além disso estudos já comprovaram que o uso de bioindicadores é mais eficaz na detecção de ações que afetam o solo e seu uso do que os indicadores químicos e físicos (DE CARVALHO MENDES; DE SOUSA; DOS REIS JUNIOR, 2017).

Usando espécies de minhocas, principalmente *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, os testes comportamentais de fuga tem como objetivo analisar o solo contaminado através do evitamento de um perfil de solo por esses organismos, informando a biodisponibilidade da substância e a toxicidade do contaminante. Podem ser feitos também teste de toxicidade aguda, o qual avalia a letalidade e subletalidade dos indivíduos devido à alta exposição a alguma substância, avaliando a mortalidade mudanças de biomassa, taxas de reprodução e mudanças comportamentais dos indivíduos (MACHADO, 2016).

As minhocas ganham destaque como bioindicadores em testes ecotoxicológicos por possuírem quimiorreceptores sensíveis a diferentes substâncias (EDWARDS; BOHLEN, 1996), entrar em contato com diversos compostos através do seu deslocamento em grandes perfis de solo além de serem de fácil criação e disponibilidade (ANDREA, 2010).

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo usar minhocas *Eisenia fetida* para avaliar a eficácia da biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante queimado derivado de petróleo pela técnica de bioestimulação por revolvimento e adição de nutrientes ao solo. A eficiência da técnica foi verificada através do teste ecotoxicológico por meio do bioindicador *Eisenia fetida* pelo teste de fuga segundo a norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Desenvolvimento das sociedades e a geração de poluentes

A transformação nos métodos de produção e consumo decorrentes da Revolução Industrial que despontou na Europa em meados do século XVIII e seguiu pelo século XIX abandonou a manufatura e substituiu a força motriz humana. As mãos foram trocadas por máquinas e o êxodo rural povoou os grandes centros urbanos europeus, resultando em

investimentos destinados a inovações tecnológicas que causaram não só impactos sociais e econômicos, mas sobretudo ambientais (DATHEIN, 2003). As novas tecnologias industriais e a superpopulação nas cidades exigiram uma exploração mais intensa dos recursos naturais disponíveis para produzir os bens de consumo em maiores quantidades (COGGIOLA, 2016).

Naquela época, a matéria prima utilizada inicialmente era o carvão mineral. A sua queima em grande escala, por sua vez, trouxe uma série de consequências negativas à população e ao meio ambiente (CECHIN, 2010). Enquanto as condições de trabalho se tornavam cada vez piores, o combustível fóssil gerava danos na atmosfera como o consequente aumento da poluição do ar, da degradação do solo e contaminação das águas. A queima dessa matéria prima gera um grande número de emissão de material particulado e gases poluentes, como por exemplo o dióxido de enxofre (SO₂) e os óxidos de nitrogênio (NOX), que além de serem prejudiciais à saúde humana (por serem capazes de influenciar e agravar doenças respiratórias e estimular formação de células cancerígenas), esses gases provocam no meio ambiente a formação de chuva ácida, causando a acidificação do solo e de águas, consequentes alterações na biodiversidade, corrosões de estruturas de metais, entre outros (RIGOTTO, 2009). No entanto, alguns pesquisadores afirmam que esses tipos de impactos negativos gerados pelo crescimento exacerbado no meio ambiente e na vida da população eram justificados e tidos como mal necessário para o progresso (POTT; ESTRELA, 2017).

As bases para refinação de petróleo foram desenvolvidas em meados de 1850, culminando, por volta de 1860, principalmente por causa da patente do motor a gasolina, a gradativa substituição do carvão mineral pelos derivados de petróleo (CIPOLLA, 1977; DATHEIN, 2003; DUNHAM; BOMTEMPO; ALMEIDA, 2006).

Paralelamente, com o avanço da industrialização pela Revolução Industrial, as pessoas se viram obrigadas a encontrar um meio de lubrificar suas máquinas de uma maneira eficaz e que garantisse maior rendimento. Desde antes, já eram utilizadas técnicas para lubrificação de objetos, fossem para auxiliar abertura de portões de castelo ou evitar desgastes nas rodas das carruagens, embora nessa época os lubrificantes mais utilizados fossem óleos vegetais, sebo de carneiro e óleo de baleia. Com a conquista de extração de petróleo do subsolo e a maior produção do mesmo, tornou-se viável a substituição dos óleos naturais, utilizados até então em lubrificações, por derivados de petróleo que são mais baratos e mais resistentes a altas temperaturas (SILVA, 2011).

3.2 Derivados de petróleo

O petróleo é formado por uma mistura de hidrocarbonetos com diferentes tamanhos, desde moléculas de cadeia de frações leves (gases) até frações pesadas (óleo cru) (CORRÊA, 2003). O petróleo é o componente base de mais de 6.000 produtos, podendo ser utilizado para fabricação de gasolina, gás de cozinha, borrachas, tecidos sintéticos e óleos lubrificantes (RIZZO *et. al.*, 2007; SPEIGHT, 2015).

Utilizados em equipamentos mecânicos, os óleos lubrificantes são responsáveis por diminuir o atrito, ajudando nos movimentos repetidos e contínuos de maquinários. Dessa forma, os lubrificantes aumentam a vida útil da máquina por diminuir o atrito do contato direto das superfícies, reduzindo o desgaste, o aumento da temperatura e a sobrecarga dos equipamentos (AZEVEDO; CARVALHO; FONSECA, 2005).

Os óleos lubrificantes estão presentes principalmente em motores automotivos. O óleo queimado de motor é formado por metais (das peças do motor), aditivos, materiais oxidados e óleo recuperável que são tratados em refinarias, permitindo com isso, a reutilização do mesmo (TEIXEIRA; 2002). Esses óleos lubrificantes apresentam, em sua composição, uma grande quantidade de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos que variam entre C15 e C50 (ROSADO; PICHTEL, 2003; AMEH *et. al.*, 2013).

3.3 Contaminação por óleos lubrificantes

Segundo Tristão; Tristão; Frederico, (2017) aproximadamente 40% de mais de 400 milhões de litros de óleos lubrificantes usados produzidos por ano no Brasil não são recolhidos e tratados adequadamente, o que se torna uma obrigatoriedade segundo a Lei nº12.305, de 2 de Agosto de 2010, Art. 33, Inciso IV que coloca os óleos lubrificantes, seus resíduos e embalagens como passíveis de logística reversa, o qual os fabricantes, importadores, distribuidores e comerciantes são obrigados a estruturar e implementar sistemas de logística reversa, mediante retorno dos produtos após o uso pelo consumidor, de forma independente do serviço público de limpeza urbana e de manejo dos resíduos sólidos. Além disso o Art. 3º da Resolução Conama nº362, de 23 de junho de 2005, que diz que todo o óleo lubrificante usado ou contaminado coletado deverá ser destinado à reciclagem por meio do processo de rerrefino. Ao se considerar a reutilização do óleo refinado, além de economias, o tratamento do lubrificante pode resultar

em menor impacto ambiental, visto que o descarte inadequado do mesmo pode contaminar solos, rios, mares, o ar e tudo a nossa volta (TRISTÃO; TRISTÃO; FREDERICO, 2017).

Entretanto, desastres ambientais são recorrentes em todo o mundo. Como exemplo disso, Penner (2005) descreve o caso da empresa Petrochem/Ekotek, em Salt Lake City, nos Estados Unidos da América, que apresentou um quadro de contaminação de solos e águas subterrâneas por óleo usado e resíduo de re-refino de óleo lubrificante. Foram encontrados nos locais contaminados, tanto em solo como em água, altas concentrações de metais, hidrocarbonetos, organoclorados e pesticidas. O custo de investigação, limpeza e remediação dessa área foi de aproximadamente 69 milhões de dólares e exigiu manutenção por 30 anos.

Em razão desses acontecimentos com impactos no funcionamento do ambiente e na saúde humana, tratamentos eficazes e menos onerosos têm sido investigados e propostos (SANTOS; UNGARI; SANTOS, 2008)

3.4 Biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo

Para o tratamento de solos contaminados com derivados de petróleo, as descontaminações mais utilizadas pelo mundo são as técnicas de remediações químicas, físicas e biológicas (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). As remediações físicas e químicas, entretanto, são mais onerosas e, geralmente, produzem mais resíduos que as formas biológicas de descontaminação. Além disso, as estratégias de descontaminação podem ser combinadas para aumentar a eficiência da remediação (ZHANG *et. al.*, 2020).

Com relação ao local da realização, os tratamentos podem ser feitos de duas maneiras, *ex-situ* que é realizado fora do local de contaminação, e *in situ*, realizado na área contaminada. O tratamento *ex-situ* permite a escavação e remoção do solo contaminado para um outro local de tratamento, sendo necessário um cuidado redobrado para a contaminação não se espalhar. Por ser necessário mover e escavar o solo, geralmente o custo para os tratamentos *ex-situ* são maiores. Já o tratamento *in-situ* é aquele feito no próprio local contaminado. Por não necessitar de ações de remoção esse processo se torna economicamente mais barato em relação ao anterior sem falar que os impactos ambientais são menores (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

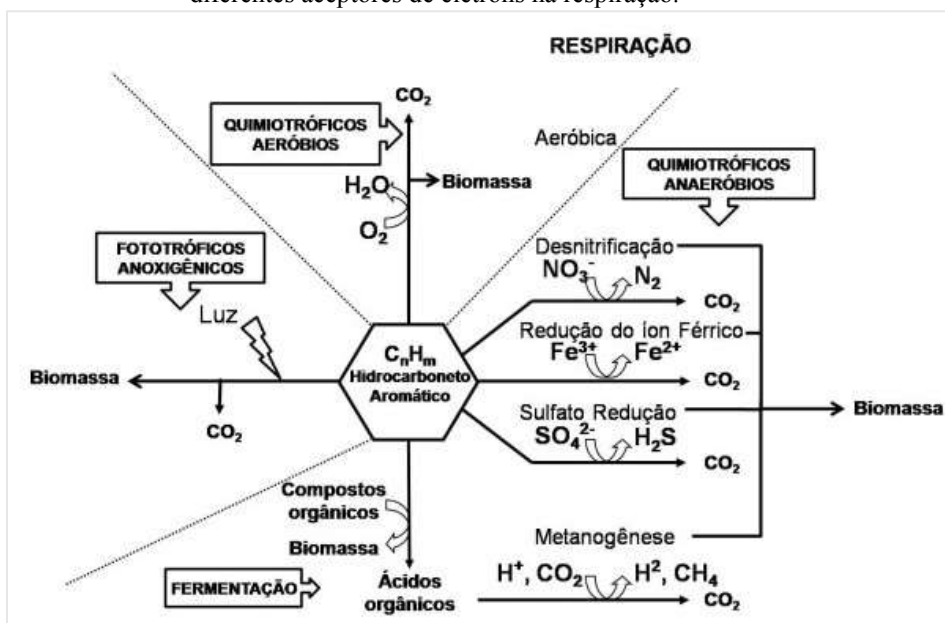
Por isso, a biorremediação é aquela em que se utiliza organismos vivos ou seus processos para redução ou remoção de contaminantes do ambiente tornando-os substâncias inertes. A microbiota do solo é um compartimento que pode contribuir para a biorremediação. Os solos apresentam uma vasta diversidade e gama de atividades microbianas, as quais contribuem tanto para o funcionamento do solo, como para a decomposição de resíduos

orgânicos, ciclagem de nutrientes e formação da matéria orgânica (MENDES et al, 2015). Os microrganismos que agem para a biodegradação podem ser fungos, leveduras ou bactérias. Para remediação de hidrocarbonetos, utiliza-se predominantemente de fungos filamentosos e bactérias específicas (OLIVEIRA, 2008; BABU, et.al, 2014). Os fungos conseguem se desenvolver em locais com elevados compostos recalcitrantes, que são usados por eles como fonte de energia. Segundo Santaella *et al.* (2009), eles produzem enzimas extracelulares oxidativas, cujas funções são quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa de compostos captados pelo seu metabolismo. Essa ação pode ser acentuada com o acréscimo de um substrato primário, como a glicose. Os fungos mais eficientes nessa produção extracelular são os filamentosos, citando o principal deles: o *Aspergillus niger*.

Tonini; De Rezende; Gravitol, (2010) afirma que por se tratarem de um composto constituído por diferentes tipos de hidrocarbonetos, os petróleos não são biodegradados por apenas uma espécie de bactérias, visto que pela variedade em sua composição os processos metabólicos leva a formação de grupos de microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada qual com uma função de degradação diferente. Os principais gêneros são *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* entre outros.

Ainda segundo Tonini; De Rezende; Gravitol, (2010) as bactérias utilizam o contaminante como fonte de substrato, degradando-o e utilizando-os como fonte de carbono e energia. Para isso é preciso quebrar pelo menos uma parte da molécula em um composto mais simples e essa quebra pode ser feita aerobicamente ou anaerobicamente, conforme Figura 1.

Figura 1 - Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração.



Fonte: Figura de DIAZ (2004), adaptada por TONINI; DE REZENDE; GRAVITOL (2010).

Na biorremediação, a biodegradação possibilita descontaminação de moléculas médias e pesadas de hidrocarbonetos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), que são compostos químicos formados por átomos de carbono e hidrogênio, na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Os HAP são formados naturalmente por processos de combustão incompleta de substâncias orgânicas ou pelo ser humano na produção industrial, produção de carvão vegetal, nos processos de extração, transporte, refino do petróleo e seus derivados, entre outros. Apesar disso, a degradação dessas moléculas pesadas no solo pode ser limitada pela dificuldade dos microrganismos em metabolizar tais compostos, principalmente pela falta de nutrientes e pela baixa biodisponibilidade dos HAPs. Como solução para esse problema é indicado técnicas de biorremediação eficientes na remoção desses poluentes como a atenuação natural, bioventilação, landfarming, biopilhas/compostagem, biorreatores, fitorremediação (JACQUES et. al, 2007). Geralmente, a degradação é mais eficiente quando o metabolismo é predominantemente aeróbio. O oxigênio além de ser utilizado pelos microrganismos como receptor de elétrons, é utilizado também como substrato em reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase, rompendo anéis, fazendo a hidroxilação dos compostos aromáticos e também a oxidação de compostos alifáticos (RIZZO *et. al*, 2007; PROVIDENTI; LEE; TREVORS, 1993). Sendo assim, é de suma importância a aeração do solo no momento da biorremediação.

Dentre as estratégias de biorremediação, a atenuação natural envolve processos naturais de degradação de poluentes ou de diminuição de toxicidade, como biodegradação, volatilização, dispersão, diluição, adsorção e decaimento radioativo, mas não há insumos para estímulo da descontaminação (COLOMBO *et. al*, 2010). Para os hidrocarbonetos derivados de petróleo, os organismos usam as moléculas poluentes como substrato para fonte de carbono e energia via biodegradação. A concentração do contaminante é reduzida ao longo do processo biológico, mas pode contar também com fatores físicos, químicos e intempéricos, como a volatilização e a lixiviação. A desvantagem de se utilizar esse meio como tratamento para o solo é que o processo de atenuação natural pode demorar de meses a anos, sendo necessário um estudo prévio para evitar a contaminação dos seres vivos enquanto a técnica ocorre visto que nem sempre há redução da concentração de substâncias tóxicas e recalcitrantes. Devido ao processo ser lento e imprevisível, é necessária uma monitoração rigorosa da descontaminação, o que é chamado de atenuação natural monitorada (AMN), e por esses motivos é considerada um tratamento caro devido ao longo prazo (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A bioventilação combina ventilação com técnicas de biorremediação para remoção de hidrocarbonetos, adicionando oxigênio, geralmente via ar atmosférico, aos espaços vazios do solo. O ar é bastante eficaz na penetração e aeração de solos saturados e compactados. Dessa forma a ventilação atua na remoção dos compostos voláteis contaminantes do solo e promove a biodegradação aeróbia do hidrocarboneto residual e diminuição de concentração de vapores. Essa técnica é considerada eficaz e de baixo custo para tratamento de solos contaminados com derivados de petróleo (HOEPEL; HINCHEE; ARTHUR, 1991).

O método *landfarming* pode ser usado *in-situ* (no próprio local da contaminação) ou *ex-situ* (em outro local diferente do de origem) e é bastante eficaz na biorremediação de hidrocarbonetos por possibilitar a biodegradação ou volatilização dos compostos. Nesse tratamento, o solo é revolvido por meio de aração, ou outras técnicas semelhantes de revolvimento do solo para permitir melhor aeração e conseqüentemente maior biodegradação por microrganismos aeróbicos. No *landfarming*, pode haver adição de nutrientes e irrigação para aumentar o estímulo aos microrganismos, os quais utilizam os contaminantes como fonte de carbono e energia, transformando-os em substâncias inertes como material orgânico estabilizado, água e CO₂ (PAUDYN; *et. al*, 2008; JACQUES *et. al*, 2007).

A compostagem de solo contaminado em biopilhas é o processo de escavação do solo, que será disposto em pilhas onde terá a sua atividade microbiana estimulada com aeração, adição de nutrientes e aumento da umidade. É uma tecnologia feita *ex-situ* e de ação aeróbica.

As vantagens dessa técnica é o maior controle sobre condições químicas, físicas e biológicas da biopilha em tratamento e sua maior desvantagem é a exposição dos materiais tóxicos do contaminante a outro ambiente, com risco de contaminações e impactos secundários (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; JORGENSEN; PUUSTINEN; SUORTTI, 2000).

Outro método para tratar solos contaminados com hidrocarbonetos derivados de petróleo são os biorreatores. Existem vários tipos diferentes de biorreatores, mas, de forma geral, o solo com o contaminante é misturado com água, nutrientes e aerado com rotações, possibilitando assim a formação de materiais suspensos com certa porcentagem de sólidos. Essa suspensão de sólidos aumenta a biodisponibilidade dos compostos contaminantes aos microrganismos degradadores. A eficácia pode ser aumentada pois os biorreatores permitem a manutenção do ambiente para o maior crescimento microbiano com ajuste de pH, nutrientes, aeração e temperatura (JACQUES *et. al.*, 2007; MACLEOD & DAUGULIS, 2005).

A fitorremediação, técnica que pode ser *ex-situ* ou *in-situ*, permite a remediação tanto do solo como da água e tem como agente descontaminante a planta. O contaminante pode ser de fonte orgânica ou inorgânica e o custo da técnica não é alto comparado a outras biorremediações. A espécie da planta precisa ser compatível com o tratamento desejado: adaptada às condições climáticas, ao solo, ser eficiente em degradar, retirar ou estabilizar o contaminante. Para a fitorremediação de moléculas orgânicas tem-se três princípios: o de fitodegradação, que é a metabolização do contaminante a um composto não ou menos tóxico; o de fitoestimulação que estimula a atividade microbiana na rizosfera, por meio de exsudatos radiculares, que agem na degradação do contaminante no solo; e o de fitovolatilização, que estimula a volatilização do contaminante (PIRES *et. al.*, 2003).

Uma das técnicas *in-situ* de bioestimulação, conhecida como atenuação natural acelerada (ANA), visa estimular a atividade microbiana existente no local contaminado com a correção nutricional, aeração, umidade e adequação de pH do solo (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Por ser um meio aeróbico, os microrganismos utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons e o carbono dos contaminantes como fonte de carbono. Em solos poluídos por hidrocarbonetos derivados de petróleo há um aumento de carbono por causa desse tipo de contaminante, o que resulta em um déficit de nutrientes necessários para uma boa atividade microbiana, pois para sobreviverem, os microrganismos em geral, necessitam de nutrientes e de um aceptor final de elétrons. Nesses casos é preciso fazer a correção das concentrações de nitrogênio e fósforo, comumente feitas através da adição de sais inorgânicos no meio contaminado (REIS; ROCHA-LEÃO; LEITE, 2013). Para essa correção geralmente

utiliza-se a relação C:N:P:K de 100:10:1:1, citada por Lally e Russel (1996), embora, Deuel e Holliday (1997) propõem uma relação C:N:P:K de 150:1:0,25:0,25 argumentando ser suficiente durante o processo de degradação (RIZZO *et. al*, 2007).

No Brasil a técnica de biorremediação ainda é pouco estudada apesar de, em outros países, ela ser uma das principais formas de descontaminação de solos contaminados por derivados de petróleo. Baseando-se nisso, Andrade; Augusto; Jardim (2010) trouxe uma relação das principais vantagens e limitações para o uso dessa técnica no Quadro 1.

Quadro 1 - Vantagens e limitações da biorremediação de solos.

VANTAGENS	LIMITAÇÕES
A aplicação envolve o uso de equipamentos de fácil obtenção, instalação e operação.	Podem ser requeridos monitoramento contínuo por tempos longos e/ou manutenção do sítio submetido à biorremediação.
Em atividades in-situ, a biorremediação gera distúrbios mínimos ao meio ambiente.	A técnica é ineficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, tornando-os indisponíveis à biodegradação.
Em condições ótimas de operação, apresenta custos menores em comparação às técnicas alternativas de remediação.	É menos eficiente em períodos menores de tempo em comparação às outras técnicas de remediação, como os POA.
Pode ser combinada com outras técnicas, como a SVE, para acelerar o processo de descontaminação.	Contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas, como os HTP, podem ser tóxicos aos microrganismos e/ou não biodegradáveis, inviabilizando a utilização da técnica.
Na maioria dos casos, essa técnica não produz compostos tóxicos, que devem ser dispostos e tratados em outro local.	As propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação.
É muito eficiente na biodegradação de petróleo e seus derivados em solos permeáveis.	Dificuldade de utilização em solos argilosos ou com baixa permeabilidade.
POA (Processos Oxidativos Avançados) SVE (<i>Soil Vapor Extraction</i> - Extração de vapores do solo) HTP (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo)	

Fonte: (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

3.5 Minhocas *Eisenia fetida* como bioindicadores de contaminação do solo

A fauna do solo compreende animais invertebrados, os quais são importantes indicadores de funções e, portanto, da qualidade edáfica. A fauna é dividida em micro, meso e macrofauna. A microfauna representa os organismos com tamanho <0,2 mm, incluindo nematoides e protozoários. A mesofauna é caracterizada, geralmente, por animais que medem 0,2 a 2,0 mm, como os Pretura, Acari e Collembola. A macrofauna corresponde aos organismos visíveis a olho nu, >2,0 mm, e é composta por mais de 20 grupos taxonômicos (formigas, grilos, caracóis, minhocas). A principal função da meso e macrofauna é detritívora e predatória na teia trófica do solo, sendo associada a processos como controle biológico de pragas, ciclagem de nutrientes, incorporação de matéria orgânica, revolvimento do solo, formação de agregados e estruturação do solo. Por isso, são conhecidos também como engenheiros-do-solo (DE MELO *et. al*, 2009).

A meso e macrofauna edáfica podem indicar a qualidade do solo, uma vez que podem ser afetada por diferentes componentes, desde o tipo de solo, temperatura, pH e clima até as modificações causadas pelo homem (DE MELO *et. al*, 2009) sendo úteis para diagnóstico e monitoramento de interferências antrópicas no ambiente (DE MELO *et. al*, 2009; BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010; SOUZA *et. al*, 2015).

As minhocas são os principais e mais importantes agentes estruturantes do solo pois possuem a capacidade de alterar as características pedoambientais do solo por meio do seu deslocamento, o qual produz bioporos e agregados que interferem nas propriedades físicas do solo. Como resultado, há aumento da taxa de infiltração de água, crescimento radicular das plantas, ciclagem de nutrientes, além de estímulo à decomposição de resíduos orgânicos (SOUZA *et. al*, 2015).

No seu processo digestivo, as minhocas conseguem misturar o solo com muco, o qual auxilia na agregação de partículas, e forma também os bolos fecais, os quais possuem altas concentrações de nutrientes ajudando a produzir o húmus e aumentar a fertilidade do solo. Estes animais também agem no controle de patógenos, se alimentando deles ou inibindo-os através de produtos de seu metabolismo, e ainda, na deterioração de poluentes (ANDREA, 2010).

As minhocas entram em contato com compostos tóxicos por meio do seu deslocamento, no qual elas absorvem poluentes por exposição direta e pela passagem na cutícula, ou por ingestão desses componentes que ficam adsorvidos no solo. Após a interação com tais

compostos as minhocas ficam sujeitas a intoxicação, morte e até mesmo a bioacumulação, que varia grandemente entre os diferentes organismos e substâncias, pelo fato de possuírem quimiorreceptores sensíveis a uma ampla gama de produtos químicos que as diferenciam dos outros organismos presentes na fauna do solo (Edwards; Bohlen, 1996). Por estarem em uma posição trófica baixa na teia alimentar, as minhocas servem de alimento para outros animais, sendo assim um transmissor de contaminantes ao longo da cadeia alimentar, o que as torna um ótimo bioindicador de ecotoxicidade de substâncias químicas presentes no solo desse modo o conhecimento das concentrações desses compostos em seus organismos possibilita a obtenção de informações sobre a biodisponibilidade dos poluentes e o padrão de contaminação (ANDREA, 2010).

Fornece os dados da biodisponibilidade dos poluentes ou compostos tóxicos, auxiliar ligação dos efeitos adversos no ambiente com a contaminação local, avaliar exposições agudas, sub-crônicas e crônicas e medir os efeitos biológicos em itens como, mortalidade, desempenho reprodutivo, crescimento e mudanças comportamentais são alguns dos objetivos dos testes de toxicidade. Alguns órgãos regulamentadores de vários locais do mundo escolheram, por sua importância no solo e tantas outras características já citadas, as minhocas como indicadores em testes de toxicidade, principalmente as espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei* (LINFHURST; BOURDEAU; TARDIFF, 1995; ANDREA, 2010).

Segundo Andréa (2010) a *E. fetida* e *E. andrei*, por viverem na região mais superficial do solo e não caracterizar toda a fauna do local, tem recebido diversas críticas de outros pesquisadores em serem eleitas bioindicadores para testes toxicológicos. Em contrapartida, Andréa (2010) cita também que outros pesquisadores se opõem a essa ideia por serem espécies de fácil criação e de fácil acesso, garantindo assim uma uniformidade nos estudos, gerando dados que podem ser comparados, discutidos entre si e que possuem particularidades sobre poluentes, regiões contaminadas, entre outros.

Vale ressaltar que as minhocas *E. fetida* e *E. andrei* honram o termo de bioindicadores, uma vez que possibilitam amplos estudos sobre contaminação ambiental por diversos contaminantes, entre eles os derivados de petróleo, metais pesados, agrotóxicos etc (SISINNO *et. al*, 2005; LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005).

Estudos como o de Ramadass (2015) mostrou que óleo de motor usado é mais tóxico do que óleo fresco, quando utilizou critérios como sobrevivência das minhocas, desidrogenase e urease do solo e nitrificação. Além de indicar que as minhocas são capazes de avaliar a toxicidade do óleo de motor, aumentar a ciclagem de nutrientes do solo assim como a saúde do

ambiente notou-se que os óleos de motor usado continham maior número de hidrocarbonetos aromáticos e metais pesados do que os óleos frescos que pode ter sido o responsável pela significativa toxicidade para as minhocas.

Ramos et al. (2007) analisou a presença de mercúrio no solo com o teste de ecotoxicidade utilizando *E. fetida*, o qual não apresentou mortalidade dos indivíduos mas mostrou uma mudança de coloração das minhocas, indicando um efeito sub-letal causado pela presença desse metal pesado no ambiente. Os resultados dos teores de mercúrio encontrados nos organismos dos bioindicadores indicam a sua capacidade de bioconcentrar metais, efetivando seu potencial de bioindicar a qualidade do solo.

Os testes feitos utilizando as minhocas como indicador de toxicidade por agrotóxicos, mostrou que esses indivíduos são sensíveis as diversas substâncias tóxicas. Chini (2014) mostrou que o teste de fuga para o agrotóxico *Ridomil* teve um evitamento alto para algumas concentrações, caracterizando um habitat tóxico e limitado. Para o agrotóxico *Roundup*, o evitamento não atingiu os níveis de fuga que caracterizassem toxicidade e causam prejuízos para as minhocas. Entretanto, Machado (2016) mostrou em sua pesquisa que as minhocas da espécie *E. andrei* mostraram sensibilidade ao agrotóxico Glifosato a diferentes concentrações, chegando a 92% de fuga na concentração mais alta aplicada.

Demonstrando a versatilidade na utilização das minhocas como indicadores de toxicidade Paniago et al. (2016) mostrou em seu trabalho o uso da espécie *E. andrei* como bioindicador de ecotoxicidade de água residual de suinocultura, o qual demonstrou que a água residual da suinocultura, de esterqueira ou de biodigestor não causam impactos negativos sobre os bioindicadores em doses até 300 m³ha⁻¹.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

A amostra de solo foi coletada na Fazenda do Glória, pertencente a Universidade Federal de Uberlândia, nas coordenadas 18°58'16,62''S e 48°12'30,47''O, às 14:30 do dia 29/08/2019 na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. O solo coletado é caracterizado como Latossolo Amarelo distrófico de textura arenosa. O experimento que foi realizado duas vezes, para duas concentrações diferentes de contaminante, foi dividido em duas partes, sendo a primeira a

contaminação e aplicação dos tratamentos em amostras contaminadas e a segunda parte de avaliação ecotoxicológica. Baseando-se na segunda parte do experimento, que utiliza potes plásticos de diâmetro igual a 12,5 cm e *Eisenia fetida* para a avaliação de ecotoxicidade, a quantidade de solo coletado foi determinado de acordo com os 5 cm de altura de solo no pote especificado na norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011. O experimento foi distribuído em 24 amostras para cada uma das concentrações, sendo necessário então, 400 gramas de solo em cada pote, o que resulta em 19.200 gramas de solo ao todo. Trabalhando com a hipótese de perda de solo quando o mesmo for passado na peneira, foram coletados, ao todo, aproximadamente 20 kg de solo que foram secos ao ar, peneirados em malhas de 2mm, seguindo orientações da norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011 e homogêneos no local.

4.2 Disposição das amostras

O experimento foi montado em laboratório, sendo padronizado a quantidade de 400g de solo para cada um dos 24 potes usados para as duas diferentes concentrações de contaminante. Foram utilizados potes de vidros, sendo divididos em tratamentos da seguinte forma: 3 potes com solo não contaminado, 3 potes com solo contaminado, 3 potes com solo contaminado revolvido, 3 potes com solo contaminado revolvido e tratado com nutrientes e 12 potes com solo controle a serem utilizados na segunda fase do experimento (Figura 2).

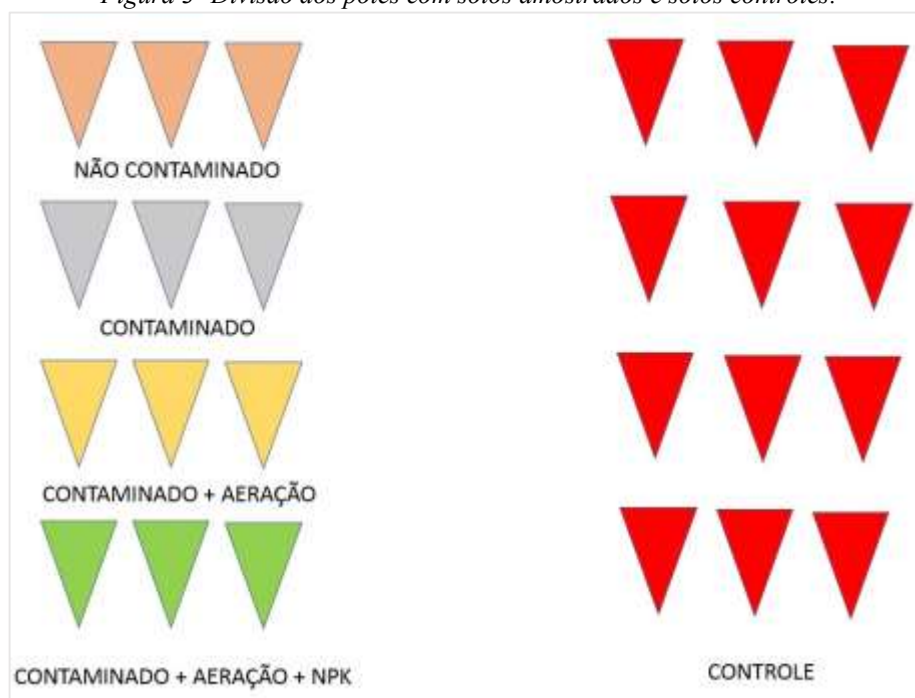
Figura 2 - Amostras de solo divididas em potes “Solo Não Contaminado”, “Solo Contaminado”, “Solo Contaminado revolvido”, “Solo Contaminado revolvido e tratado com nutrientes” e “Solo Controle” para um experimento.



Fonte: Autor, 2021.

Para melhor visualização, a divisão dos tratamentos está representada no organograma abaixo conforme mostra a Figura 3.

Figura 3- Divisão dos potes com solos amostrados e solos controles.



Fonte: Figura adaptada do autor Gabriel Sousa Alves.

4.3 Análise de Capacidade de Retenção de Água

Em função da coleta ter sido realizada no período de estiagem (meados de agosto) o solo apresentou-se muito seco, o que resultaria uma baixa degradação do contaminante por causa da sua pouca umidade. Para um melhor resultado foi necessário ajustar a umidade do solo para 40% da sua capacidade de retenção.

Para determinar a capacidade de retenção do solo, foram pesados aproximadamente 10 g de solo em um papel filtro dobrado em forma de funil sobre um béquer e que, logo após, foi encharcado com água destilada até o momento em que ficasse totalmente umedecido e pudesse observar um gotejamento dentro do béquer. Esse béquer foi colocado em um pote de vidro hermeticamente fechado com um papel molhado ao fundo, por 24 horas, como mostra a Figura 4 abaixo.

Após as 24 horas, foi pesado um papel rascunho e anotado sua massa. Em seguida, nesse mesmo papel, foi pesado 10g do solo encharcado e também anotado sua massa. Esse papel foi levado a estufa a 105° C por 24 horas e após esse tempo, o papel com o solo foi pesado novamente e, descontando a massa do papel em que estava o solo, foi possível calcular a massa de água que o solo saturado perdeu.

Figura 4 - Imagem do experimento de capacidade de retenção de água (béquer dentro do pote) e de umidade do solo amostrado (papel com 10g que foi a estufa).



Fonte: Autor, 2021.

Simultaneamente foi realizado o experimento para identificar a quantidade de água que o solo amostrado possuía, então foi pesado um papel rascunho e anotado sua massa, em seguida nesse papel foi pesado aproximadamente 10g de solo e levado a estufa a 105° C por 24 horas. Após esse período de tempo, o papel retirado da estufa foi novamente pesado, e descontando a massa do papel, foi possível saber a quantidade de água que o solo possuía.

Conforme os resultados dos métodos explicados acima, pode-se obter a quantidade de água necessária em cada pote com 400g de solo, em 40% de sua capacidade de retenção. O volume de água para cada pote foi de aproximadamente 54,4 mL de água.

Adicionado a quantidade de água determinada em cada pote, aguardou-se um período de 20 minutos ou mais, até que a água tomasse a camada de solo por capilaridade, e misturou-se o conteúdo dos potes simulando um maquinário agrícola, definido como padrão para mistura três viradas leves do pote.

4.4 Contaminação das amostras

Após a correção de umidade, foi adicionado o contaminante, óleo lubrificante queimado de motor, a uma concentração de 20.000 ppm em um experimento e 10.000 ppm no outro. Esse óleo foi obtido em um ponto de coleta de revenda e serviço de troca de óleo lubrificante

automotor na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Estando ciente da obrigatoriedade da logística reversa de acordo com a Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010 - Art. 33, Inciso IV, esse óleo foi cedido pela empresa, e somente utilizado, para fins de estudos acadêmicos. Calculando a proporção de contaminante para os 400 g de solo, definiu-se então 4 mL de lubrificante por pote. Após a contaminação do solo, os potes ficaram em descanso por aproximadamente 24 horas para que os compostos voláteis evaporassem. Com isso, foi possível notar que o óleo queimado constituía apenas os primeiros centímetros da camada do solo, conforme Figura 5. Dessa forma, foi necessário o revolvimento do solo dos potes, utilizando o método padrão de três viradas leves do pote, para que ficassem com aspecto homogêneo em relação ao contaminante. Os solos das amostras solo não contaminado e solo controle também foram agitados.

Figura 5 – Solo contaminado por óleo lubrificante queimado com o contaminante apenas nos primeiros centímetros do solo.



Fonte: Autor, 2021.

4.5 Aplicação de nutrientes nas amostras

Após mais um intervalo de 7 dias, foram determinados, adicionados e misturados às 3 amostras com “solo contaminado revolvido e tratado com nutrientes” os nutrientes que serão utilizados como tratamento. Como citado no trabalho de Rizzo et. al (2007), a correção de nutrientes em uma biorremediação geralmente utiliza a relação C:N:P:K de 100:10:1:1, citada por Lally e Russel (1996), embora, Deuel e Holliday (1997) propõem uma relação C:N:P:K de 150:1:0,25:0,25 argumentando ser suficiente durante o processo de degradação. Para determinar a relação de nutrientes utilizada nesse experimento utilizou-se a relação (200*teor de carbono):10:0,8:1 por estar em um intervalo seguro entre as duas referências.

A quantidade de nutrientes desejados para tal experimento foram calculados e expressos na Tabela 1:

Tabela 1 - Quantidade de nutrientes necessários por kg de solo.

Nutrientes	Quantidade (g/kg) a uma concentração de 20.000 ppm de contaminante.	Quantidade (g/kg) a uma concentração de 10.000 ppm de contaminante.
Ca	0,4	0,2
K	0,2	0,1
P	0,16	0,08
N	0,8	0,4

Fonte: Autor, 2021.

Com essa relação e de acordo com a massa molar dos reagentes disponíveis no estoque do laboratório foram utilizados, para tratamento dos potes em questão, os compostos mencionados na Tabela 2:

Tabela 2 - Quantidade de reagentes utilizados para o tratamento de 400g solo contaminado por pote.

Reagentes	Quantidade (g) a uma concentração de 20.000 ppm de contaminante.	Quantidade (g) a uma concentração de 10.000 ppm de contaminante.
CaCl ₂	1,11	0,555
KH ₂ PO ₄	0,7	0,35
CH ₄ N ₂ O	1,74	0,87

Fonte: Autor, 2021.

Pode ser visto na Figura 6 a adição desses nutrientes aos potes:

Figura 6 – Potes da amostra “Contaminado revolvido com nutrientes” recebendo os nutrientes.



Fonte: Autor, 2021.

Após o acréscimo dos nutrientes e com o experimento devidamente montado, iniciou-se o tratamento de revolvimento padrão de 3 viradas leves por pote em determinadas amostras. Os solos com as identificações de “Contaminado revolvido” e “Contaminado revolvido e tratado com nutrientes” foram homogeneizados de 7 em 7 dias por aproximadamente 4 semanas.

4.6 Teste ecotoxicológico com *Eisenia fetida*

Para a montagem do ensaio de fuga seguiu-se os requisitos e especificações recomendados conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo dos requisitos para o ensaio de fuga com minhocas.

Requisitos	Especificação
Tipo de ensaio	Comportamental
Referências	NBR/ISSO 17512-1 (ABNT, 2011)
Duração total	48 h
Organismo-teste	Minhocas <i>E. fetida</i> ou <i>E. andrei</i> (adultos, com peso individual entre 300 mg e 600 mg). <i>A. gracilis</i> e <i>E. eugeniae</i> adultas com peso individual >1 g. <i>P. corethrurus</i> adultas com peso individual >700 mg. <i>P. excavatus</i> adultas com peso individual entre 200 e 400 mg.
Alimentação	Sem alimentação durante o ensaio.
Substrato	Solo artificial/natural ou de áreas contaminadas.
Quantidade de solo por recipiente	Preencher cada lado da caixa (1 L a 3 L de capacidade, dependendo do organismo teste) com solo até a altura de 5 cm a 6 cm.
Ambiente de ensaio	Câmara ou sala climatizada, temperatura 20 ± 2 °C, luminosidade entre 400 e 800 lx, fotoperíodo controlado em ciclos de claro/escuro entre 12 h/12 h e 16 h/8 h (ABNT, 2011).
Número recomendado de concentrações	5 e um controle.
Número mínimo de repetições/tratamento	5
Número de organismos por repetição	10
Efeito observado	Comportamento de fuga (% de fuga).

Expressão dos resultados	CENO, CEO, CE50/CE20 em 48 horas. Além de: tóxico ou não tóxico.
Critérios de validade	Ensaio controle com uma proporção média de 40% a 60% das minhocas em cada compartimento; mortalidade < 10%.
Substância de referência	Ácido bórico, resposta de fuga para 750 mg H ₃ BO ₃ kg ⁻¹ solo (massa seca).

Fonte: NIVA; BROWN, 2019.

Com o fim das 4 semanas, o primeiro passo para iniciar o teste ecotoxicológico foi ajustar a umidade para 60% da capacidade de retenção de água do solo, conforme exigido na norma a ser seguida. Para isso, repetiu-se o processo experimental utilizado para determinar a capacidade de retenção em 40%, no momento anterior a contaminação do solo, descrito no subitem 4.3.

Com isso, foi montado em um pote com diâmetro de 12,5 cm e altura de 8,5 cm, dividido ao meio com uma divisória, as amostras para o ensaio ecotoxicológico.

De um lado da divisória foi colocado o solo controle e do outro as amostras do experimento, conforme exemplificado na Figura 7:

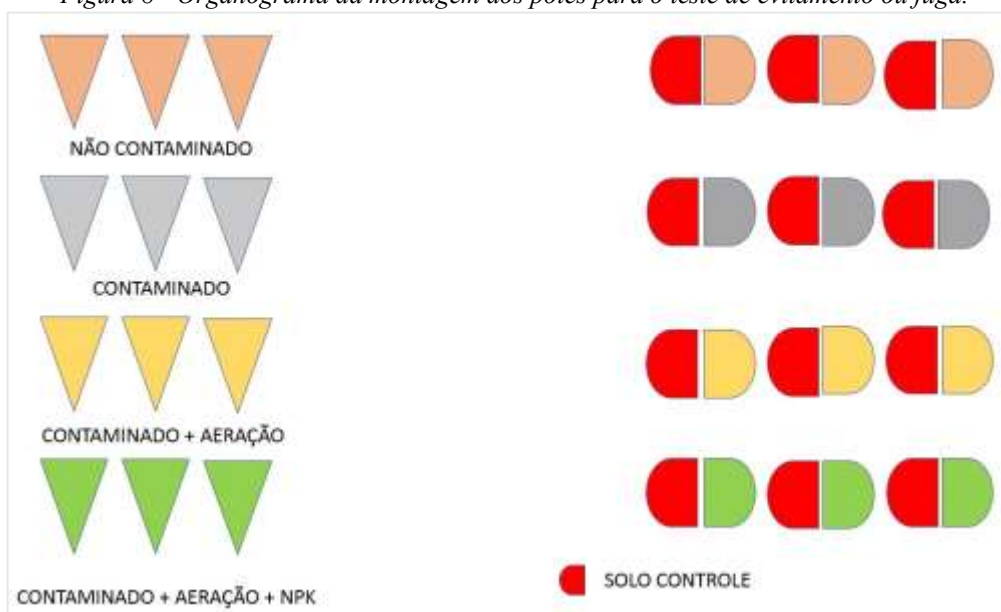
Figura 7 - Recipiente teste circular para o ensaio ecotoxicológico com a divisória entre as amostras de solo.



Fonte: Autor, 2021.

Com a montagem dos 12 potes, divididos em “Solo Controle”/”Solo Não Contaminado”, “Solo Controle”/”Contaminado”, “Solo Controle”/”Contaminado revolvido” e “Solo Controle”/”Contaminado revolvido e tratado com nutrientes” conforme Figura 8, as divisórias foram removidas e em cada recipiente colocados 10 indivíduos de *Eisenia fetida* dispostos no meio do pote sem interferência da escolha do solo pela minhoca.

Figura 8 - Organograma da montagem dos potes para o teste de evitamento ou fuga.



Fonte: Autor Gabriel Sousa Alves, 2021.

Para evitar a fuga de dentro dos recipientes, o mesmo foi lacrado com uma tampa levemente furada para facilitar a respiração e troca de gases com o ambiente conforme Figura 9.

Figura 9 - Teste de fuga montado em recipientes, com 5cm de altura de solo, 10 minhocas por pote e lacrado por tampa levemente furada para facilitar trocas gasosas. .



Fonte: Autor, 2021.

Os dois ensaios foram feitos em triplicata para cada amostra e durou 48 horas, conforme sugere ABNT NBR ISO 17512-1/2011. No fim desse período as divisórias foram recolocadas no meio do pote para evitar qualquer movimentação que influenciasse o resultado. Assim, foi realizada a contagem das minhocas em cada porção de solo, calculando-se a porcentagem de

rejeição aos diferentes tratamentos do solo contaminado com o óleo lubrificante queimado em relação a amostra controle.

4.7 Análise dos dados

Os resultados analisados no estudo de evitamento ou fuga são calculados e dados em porcentagem conforme sugere a fórmula presente na norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011:

$$E(\%) = \left(\frac{C - T}{N} \right) \times 100$$

Onde:

E = Evitamento, em porcentagem.

C = Número de minhocas no solo controle (por recipiente ou no solo controle de todas as réplicas).

T = Número de minhocas no solo teste (por recipiente ou no solo teste de todas as réplicas).

N= Número total de minhocas (usualmente 10, por recipiente ou no solo de todas as réplicas).

A análise se dá sobre a quantidade de organismos vivos encontrados na porção de solo controle em relação ao solo teste. Observando então tal comportamento, é possível dizer se a função de habitat é limitado ou tóxico nas amostras de solo teste quando os indivíduos demonstram sua preferência pelo lado do recipiente em que se encontra o solo controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de fuga ou evitamento, realizado com base na norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011, teve duração de 48 horas e foi feito em triplicata para cada amostra. Na Tabela 4 estão representados os dados obtidos após o fim do experimento.

Tabela 4 - Resultado experimental do teste de fuga com a média de 3 repetições cada (n=3) e concentração de 10.000 ppm (4 ml de contaminante).

Tratamentos	Disposição dos indivíduos				Evitamento (%)	Mortalidade (%)
	Solo Controle		Solo tratado			
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas		
Solo Não Contaminado	15	5	9	1	20	20
Solo Contaminado	18	5	6	1	40	20
Solo Contaminado Revolvido	16	3	8	3	26,6	20
Solo Contaminado Revolvido e Tratado com Nutrientes	27	2	1	0	86,6	6,6

Fonte: Autor, 2021.

De acordo com a ABNT NBR ISO 17512-1/2011, se houver uma fuga ou evitamento maior ou igual a 80% pelas minhocas o habitat é considerado limitado ou tóxico, ou seja, é impróprio para sobrevivência e reprodução do indivíduo. Podemos observar que essa condição se realiza na amostra de solo contaminado revolvido e tratado com nutrientes.

Entretanto, ainda seguindo parâmetros da norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011, há um critério de validação a ser seguido em que diz que se houver uma perda ou morte de indivíduos maior que 10% por tratamento, o teste não é válido. Considerando esse parâmetro, o teste de fuga ou evitamento nesse experimento foi inválido, visto que a perda de indivíduos foi considerável em todas as amostras, mesmo no solo não contaminado.

Anteriormente a esse experimento foi realizado um outro teste similar, com o dobro da quantidade de contaminante e o dobro de nutrientes. Entretanto, no teste feito com 20.000 ppm (8ml) de óleo lubrificante de motor queimado a perda de indivíduos foi ainda maior do que a observada nos ensaios com 10.000 ppm e 4ml de poluente como pode ser visto na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Resultado experimental do teste de fuga com a média de 3 repetições cada (n=3) e concentração de 20.000 ppm (8 ml de contaminante).

Tratamentos	Disposição dos indivíduos				Evitamento (%)	Mortalidade (%)
	Solo Controle		Solo tratado			
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas		
Solo Não Contaminado	6	9	5	10	3,3	63,3
Solo Contaminado	16	6	1	7	50	43,3
Solo Contaminado Revolvido	9	10	2	9	23,3	63,3
Solo Contaminado Revolvido e Tratado com Nutrientes	1	14	0	15	3,3	96,6

Fonte: Autor, 2021.

Apesar disso, pode-se dizer que o tratamento estava em progresso, visto que após a redução de contaminante e a redução dos nutrientes, para o mesmo período de tratamento, a perda foi menor. Os microrganismos presentes no solo podem desenvolver uma capacidade de degradação de poluentes após um longo período de exposição a ele, sendo adaptáveis a uma baixa concentração de contaminantes (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Sendo assim, é provável que a quantidade de contaminante foi alta demais para a degradação dos microrganismos presentes nos 400g de solo das amostras e/ou que o tempo de exposição de 4 semanas ao tratamento foi insuficiente para degradar significativamente o contaminante. Pode ser discutível também o alto teor de nutrientes nas amostras, o que pode ter aumentado consideravelmente a salinidade do solo, sendo prejudicial as minhocas no seu habitat desejável e também a área disponível para o deslocamento dos organismos, que como descrito por Niva; Brown (2019) para as minhocas da espécie *E. fetida* para o teste de fuga, os potes utilizados devem ter uma área de aproximadamente 200 cm² e capacidade para 1 L a 2 L que possibilitem cerca de 5 cm a 6 cm de camada de solo e, como os potes utilizados nesse experimento apresentam capacidade aproximada de 1 L e 5 cm de altura de solo, o movimento dos indivíduos ficou limitado, sendo então que com potes maiores o deslocamento e fuga de um ambiente letal para os bioindicadores poderia ser maior.

Vale salientar que, apesar das questões discutidas acima, o número de perda de indivíduos na amostra em que foi utilizada a técnica de bioestimulação por nutrientes foi menor do que nas outras em que não houve nenhum tratamento ou somente a aeração. O combinado de bioestimulação por nutrientes mais aeração resultou, analisando em geral, um ambiente relativamente propício a vida, visto que foi a única amostra a atingir o critério de validação do teste de fuga tendo uma perda de minhocas menor que 10%, apesar de que isso ainda não valida o teste, pois para ser válido o critério deve ser atendido por todas as amostras do experimento. Fazendo a análise entre o solo controle e o solo que recebeu a bioestimulação por nutrientes, houve aproximadamente 86% de fuga do solo contaminado biorremediado para o solo controle, verificando que embora o tratamento forneça uma baixa perda de indivíduos, os exemplares de *E. fetida* preferem o solo sem contaminante para viverem, deixando indícios de que o ambiente ainda está tóxico e inapropriado para organismos utilizados como bioindicadores no estudo. Uma possível causa para esse evitamento alto é a salinidade do solo que pode ter se elevado no tratamento com aplicação de sais de nutrientes.

Observando os resultados de fuga das minhocas nas amostras de solo contaminado e solo contaminado revolvido, o primeiro – que não recebeu tratamento nenhum – teve uma fuga

maior para o solo controle em relação ao segundo, sendo de aproximadamente 40% e 26% de fuga respectivamente. A agitação do solo facilita a distribuição dos microrganismos entre um ponto de contaminação e outro, visto que a capacidade de dispersão desses organismos é limitada (RIZZO *et. al*, 2007). Com a dispersão dos microrganismos a degradação tende a ser maior, uma vez que é em contato com o contaminante e os nutrientes que há a metabolização dos mesmos. Não se pode esquecer, entretanto, que o revolvimento do solo favorece a aeração e que, em condições aeróbicas, os microrganismos que utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons e o carbono do contaminante como fonte de carbono contribuem para a descontaminação. Por ter sido utilizado como contaminante o óleo lubrificante queimado derivado de petróleo houve um aumento significativo de carbono, o que cria um déficit de nutrientes no habitat (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). E apesar de ser conhecido que os microrganismos necessitam de nutrientes tanto quanto de um acceptor final de elétrons para sobreviverem, a aeração tem importância comprovada nos tratamentos de biorremediação visto que o oxigênio tem função de substrato em reações biodegradativas como rompimento dos anéis, a hidroxilação dos compostos aromáticos e a oxidação dos compostos alifáticos (RIZZO *et. al*, 2007; PROVIDENTI; LEE; TREVORS, 1993).

A alta fuga dos bioindicadores da amostra do solo contaminado pode ter se dado então pela alta concentração de contaminante, por causa da baixa degradação que por sua vez, pode ter sido causada tanto pela falta de agitação para dispersão dos microrganismos quanto pelo baixo teor de oxigênio proporcionado pela falta de aeração do meio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do teste de fuga com concentração de 10.000 ppm apresentam uma alta rejeição das amostras de solo contaminado revolvido e tratado com nutrientes em relação às outras. Entretanto, quando analisados os tratamentos de bioestimulação com nutrientes, essa amostra é a que apresenta maior sucesso no seu objetivo de degradação da substância tóxica, uma vez que apresenta a menor letalidade aos bioindicadores. No entanto, a concentração de sais desse tratamento pode ter aumentado a porcentagem de evitamento das minhocas.

Para um maior aproveitamento do ensaio de fuga, para essas concentrações de contaminante, a redução de nutriente e o aumento do tempo de exposição ao tratamento traria maiores resultados. Em conjunto com a técnica de biorremediação por bioestimulação seria interessante aplicar técnicas de extração de vapor, visto que ao decorrer do teste o cheiro do contaminante foi notável o que indica a presença de compostos voláteis.

O presente teste de fuga para o contaminante óleo lubrificante queimado derivado de petróleo, não foi válido por não atender ao critério de validação da norma ABNT NBR ISO 17512-1/2011 que não admite perda ou morte de indivíduos maior que 10%.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 15512-1. **Qualidade do solo Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*)**. Rio de Janeiro, 2011.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. *Eclética Química*, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANDREA, Mara Mercedes de. ***El uso de las lombrices de tierra como bioindicadoras de la contaminación de los suelos***. *Acta Zoológica Mexicana*. México, v. 26, n. 2, p 95-107. 2010. ISSN 0065-1737.

AMEH; A.O.; MAINA, N.S.; MOHAMED-DABO, I.A., and ANDE, J.M. – ***Vermi-Assisted Bioremediation of Used Engine Oil Contaminated Soil***. *ATBU Journal of Environmental Technology* 6,1, December 2013.

AZEVEDO, Joyce Batista; CARVALHO, Laura Hecker; FONSECA, Viviane Muniz. **Propriedades reológicas de óleos lubrificantes minerais e sintéticos com degradação em motor automotivo.** 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador, 2005.

BABU, A. Giridhar *et al.* ***Trichoderma virens PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil.*** *Journal of Environmental Management*, v. 132, p. 129-134, 2014.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. **Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas.** In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE ECOLOGIA E TAXONOMIA DE OLIGOQUETAS, 4., 2010, Curitiba. *Acta Zoológica Mexicana*, v. 26, número especial 2, p. 1-18, 2010.

CECHIN, Andrei. **A natureza como limite da economia: a contribuição de GeogescuRoegen.** São Paulo: Editora Senac, 2010.

CHINI, Pricila. **Uso de minhocas da espécie *Eisenia fetida*, como bioindicadoras em solos contaminados com agrotóxicos.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, 2014.

CIVIL, Casa. LEI Nº 12.305, DE 2 DE AGOSTO DE 2010. **Institui a política nacional de resíduos sólidos,** 2010.

CIPOLLA, Carlo M. **História Econômica da População Mundial.** Rio de Janeiro: Zahar, 1977.

CONAMA, Resolução nº 362, de 23 de junho de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA; **"Dispõe sobre o recolhimento, coleta e destinação final de óleo**

lubrificante usado ou contaminado"; Publicada no Diário Oficial da União-DOU no 121, de 27 de junho de 2005, Seção 1, páginas 128-130.

COGGIOLA, Osvaldo. **História do capitalismo: das origens até a Primeira Guerra Mundial**. O Olho da História, 2016.

COLOMBO, Rafael et al. Atenuação natural monitorada em latossolo contaminado por misturas de diesel e biodiesel. 2010.

CORRÊA, O. L. S. In: **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência (2003).

DATHEIN, Ricardo. **Inovação e Revoluções Industriais: uma apresentação das mudanças tecnológicas determinantes nos séculos XVIII e XIX**. Publicações DECON Textos Didáticos 02/2003. DECON/UFRGS, Porto Alegre, Fevereiro 2003. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/decon>>

DE CARVALHO MENDES, Iêda; DE SOUSA, Djalma Martinhão Gomes; DOS REIS JUNIOR, Fábio Bueno. **Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo**. Cadernos de Ciência & Tecnologia, v. 32, n. 1/2, p. 191-209, 2017.

DE MELO, Fernando Vaz et al. **A importância da meso e macrofauna do solo na fertilidade e como bioindicadores**. Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.

DE QUADROS, Patrícia Dörr et al. Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 115, p. 90-101, 2016.

DEUEL, L.E. e HOLLIDAY, G. H. In: **Soil Remediation for The Petroleum Extraction Industry**. PennWell, 2nd ed., Tulsa, U.S.A., 242p (1997).

DUNHAM, Fabrício Brollo; BOMTEMPO, José Vitor; ALMEIDA, Edmar Luiz Fagundes de. **Trajatórias Tecnológicas em Combustíveis Sintéticos: Análise dos Mecanismos de Seleção e Indução**. Revista Brasileira de Inovação Volume 5 Número 1 Janeiro / Junho 2006.

EDWARDS, Clive A.; BOHLEN, Patrick J. Biology and ecology of earthworms. Springer Science & Business Media, 1996. GIANNETTI, B.F.; ALMEIDA, C.M.V.B.; BONILLA, S.H. **A ecologia industrial dentro do contexto empresarial**. 2007. Disponível em: <www.banasqualidade.com.br> Acesso em: 10 Abr. 2020.

HOEPEL, Ronald E.; HINCHEE, Robert E.; ARTHUR, Mick F. **Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons**. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 141-146, 1991.

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

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.-M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles**. *Environmental pollution*, v. 107, n. 2, p. 245-254, 2000.

LALLY, C. e RUSSEL, M. ***Soil and Water Bioremediation Using Bioreactors.***
<http://www.ce.vt.edu/enviro2/gwprimer/bioreact/bior.htm> (1996).

LEAL, Aline Jaime et al. Changes in the microbial community during bioremediation of gasoline-contaminated soil. ***brazilian journal of microbiology***, v. 48, n. 2, p. 342-351, 2017.

LINFHURST, R. A., P. BOURDEAU & R. C. TARDIFF. 1995. ***Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems*** In: SCOPE 53. *Methods to study chemical effects. Scientific Committee on Problems of the Environment Report #53.* M.S. Swaminathan Research Foundation, Chennai, India. Disponível em: <<http://www.icsu-scope.org/downloadpubs/scope53/chapter03.html>> Acesso em: 4 Outubro 2020.

LOUREIRO, S., A. M. V. M. SOARES & A. J. A. NOGUEIRA. 2005. ***Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination.*** *Environmental Pollution*. 138: 121-131.

MACHADO, Bettina Rodrigues. ***Avaliação da toxicidade ambiental do agrotóxico Glifosato em solo utilizando como bioindicador minhocas da espécie Eisenia andrei.*** Trabalho de Conclusão de Curso, Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 63p, 2016.

MACLEOD, C.T.; DAUGULIS A.J. ***Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic Mycobacteriu.*** *Process Biochemistry*, Oxon, v.40, n.5, p.1799–1805, 2005.

NIVA, C. C.; BROWN, G. G. ***Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas.*** Embrapa Cerrados-Livro científico (ALICE), 2019.

OLIVEIRA, Sabrina Dias de et al. **Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da arte.** 2008.

PAUDYN, Krysta et al. *Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming.* *Cold Regions Science and Technology*, v. 53, n. 1, p. 102-114, 2008.

PANIAGO, Gustavo G. et al. **Ecotoxicidade da água residual de suinocultura usando minhocas *Eisenia andrei* como bioindicador.** *Revista de Ciências Agrárias*, v. 39, n. 3, p. 447-455, 2016.

PENNER, Giovanni Chaves. **Estudo de caso da contaminação do solo e da água subterrânea por descarte de resíduos vinculados a óleos lubrificantes.** 2005. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. doi:10.11606/T.18.2016.tde-08032016-121704. Acesso em: 2020-12-04.

PIRES, F.R. et al . **Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. Planta daninha,** Viçosa , v. 21, n. 2, p. 335-341, Aug. 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582003000200020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Abril. 2021.

POTT, Crisla Maciel; ESTRELA, Carina Costa. **Histórico ambiental: desastres ambientais e o despertar de um novo pensamento.** *Estud. av.*, São Paulo , v. 31, n. 89, p. 271-283, Apr. 2017 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142017000100271&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 Fevereiro. 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142017.31890021>.

PROVIDENTI, M. A.; LEE, H; e TREVORS, J. T. (1993). ***Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds***. *Journal of Industrial Microbiology*, 12:379-395 (1993).

RAMADASS, Kavitha *et al.* ***Ecological implications of motor oil pollution: earthworm survival and soil health***. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 85, p. 72-81, 2015.

RAMOS, A. S. et al. **Testes de ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida* para avaliação da contaminação mercurial em solos**. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA. 2007. p. 1.

REIS, E. ; ROCHA-LEÃO, M. ; LEITE, S. ***Slow-Release Nutrient Capsules for Microorganism Stimulation in Oil Remediation***. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, Vol.169(4), pp.1241-1249.

RIGOTTO, Raquel Maria. **Inserção da saúde nos estudos de impacto ambiental: o caso de uma termelétrica a carvão mineral no Ceará**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 14, p. 2049-2059, 2009.

RIZZO, Andrea C. de Lima, et. al. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. Rio de Janeiro: cetem/mct, 2007. 76p. (Série Tecnologia Ambiental, 37)

ROSADO, Elena Dominguez; PICHTEL, John. ***Chemical characterization of fresh, used and weathered motor oil via gc/ms, nmr and ftir techniques***. 2003. Proceedings of the Indiana Academy of Science 1 12(2): 109-1 16

SANTAELLA, Sandra Tédde *et al.* **Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger***. Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 14, n. 1, p. 139-148, 2009.

SANTOS, Edson; UNGARI, Helio Cesar Nascimento; SANTOS, Matilde Barga dos; **Principais técnicas de remediação e gerenciamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos no estado de São Paulo**, 2008. Monografia (Especialização de Gestão Ambiental) - Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB.

SILVA, A. E. O., **Transposição Didática: Química dos Óleos Lubrificantes**, Universidade de Brasília, 2011.

SISINNO, C., M. BULUS, A. C. I. RIZZO & J. MOREIRA. 2005. *Avoidance test using earthworms as a complement for metal contaminated site evaluation: preliminary results*. In: *XIII International Conference on Heavy Metals in the Environment – ICHMET*. Comunicação Técnica CT2005-038-00. Rio de Janeiro, RJ.

SOUZA, Mayk Henrique et al. **Macrofauna do solo**. Enciclopédia Biosfera, v. 11, n. 22, 2015.

SPEIGHT, James G. *Handbook of petroleum product analysis*. John Wiley & Sons, 2015.

TEIXEIRA, Silvio Rainho. **Caracterização de resíduos produzidos em usina de re-refino de óleo lubrificante usado visando seu aproveitamento**. XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitaria e Ambiental. Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002.

TONINI, Rita Maria Costa Wetler; DE REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. **Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão.** CEP, v. 28013, p. 602, 2010.

TRISTÃO, J. A. M.; TRISTÃO, V. T. V.; FREDERICO, E.. **O processo de reciclagem do óleo lubrificante.** Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v.8, n.2, p.224-238, 2017. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2179-6858.2017.002.0018>.

ZHANG, B. *et. al.*, (2020). ***Combining chemical oxidation and bioremediation for petroleum polluted soil remediation by BC-nZVI activated persulfate.*** *Chemical Engineering Journal*, 382, 123055.