

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

VENÂNCIO DE LIMA VELOSO

**BIOACESSIBILIDADE E FITOATENUAÇÃO DE Cd, Pb E Zn POR
MILHO EM SOLO POLUÍDO POR ESCÓRIA METALÚRGICA E
TRATADO COM BIOCHAR**

Recife

2020

Venâncio de Lima Veloso
Engenheiro Agrônomo

**Bioacessibilidade e fitoatenuação de Cd, Pb E Zn por milho em solo poluído
por escória metalúrgica e tratado com biochar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento

Coorientadora: Prof^a. Dra. Caroline Miranda Biondi

Coorientador: Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

Recife

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V443b Veloso, Venâncio de Lima
 Bioacessibilidade e fitoatenuação de Cd, Pb E Zn por milho em solo poluído por escória metalúrgica e tratado com biochar / Venâncio de Lima Veloso. - 2020.
 47 f. : il.

 Orientador: Clistenes Williams Araujo do Nascimento.
 Coorientadora: Caroline Miranda Biondi.
 Inclui referências.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2020.

 1. Clorofila. 2. Metais pesados. 3. Biocarvão. 4. Santo Amaro. I. Nascimento, Clistenes Williams Araujo do, orient. II. Biondi, Caroline Miranda, coorient. III. Título

CDD 631.4

VENÂNCIO DE LIMA VELOSO

**Bioacessibilidade e fitoatenuação de Cd, Pb E Zn por milho em solo poluído
por escória metalúrgica e tratado com biochar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento
Orientador
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Dra. Paula Renata Muniz Araújo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua constante presença em todos os momentos de minha vida.

À meus pais, José Oliveira e Cristina Portela, por me fazerem sentir amado a cada ligação, a cada visita, a cada conversa, a cada abraço... Obrigado por todo carinho, confiança, incentivo aos estudos e compreensão nos momentos de ausência. Obrigado pelo exemplo de dignidade e honestidade. Amo vocês.

Aos meus avós José Mariano e Beatriz (*in memorian*), Maria (*in memorian*) e Abdias (*in memorian*), por todo carinho, por sempre se orgulharem de mim e pelo estímulo aos estudos.

À minha irmã, Maria. Talvez nem saiba, mas por me fazer querer ser uma pessoa melhor. Pela alegria e amizade em (quase, rs) todos os momentos.

À minha namorada, Jordana, por todo companheirismo, carinho e amor. Por dividir as aflições e multiplicar as felicidades. Pelo apoio constante, pela paciência e por acreditar tanto em mim.

Aos demais membros de minha família, Tias Zeza, Ivete, Celiane, Rosa, aos primos Juciane, Gabriel, Rafael, Juliane, Miguel, Gilvanezza, Silmara e Sabrina. Pelo carinho, pelos bons momentos e sorrisos juntos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela qualidade no ensino, por abrir tantas portas e pela maturidade que me possibilitou adquirir nesses sete anos, entre graduação e mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Clístenes Williams, pelo respeito, paciência e pelo exemplo de profissional e comprometimento com a ciência.

Ao Dr. Fernando Bruno, por todo o apoio na realização deste trabalho. Pelos conselhos, orientações e auxílios, desde a concepção do projeto, a ajuda na elaboração da dissertação. Obrigado pela contribuição fundamental nesta conquista.

À dupla Dr. Simone Lins e Dr. Josângela Araújo, pelo apoio diário, eficiência e exemplo de profissionalismo e dedicação ao nosso grupo de pesquisa.

Aos demais integrantes do Grupo de Pesquisa em Química Ambiental de Solos, pelo aprendizado diário e pelos diversos momentos de descontração. Vocês fizeram esta caminhada ser mais leve.

Ao CNPQ e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela concessão da bolsa e oportunidade de formação. À CAPES e à FACEPE pelo incentivo à pesquisa e por contribuírem com o financiamento deste trabalho.

Aos professores, figuras tão importantes na formação de qualquer profissional e que contribuíram com minha educação. Desde os que me acompanharam na formação básica aos do nível superior. Inclusive minha mãe, professora e responsável pelos maiores puxões de orelha. Toda admiração pelo papel fundamental destes profissionais na sociedade.

Por fim, aos não citados aqui mas que contribuíram, direta ou indiretamente, com a minha formação. O meu eterno muito obrigado!

"Nós nos definimos por nossas ações. Com cada decisão, dizemos a nós mesmos e ao mundo quem nós somos."

Bill Watterson

Bioacessibilidade e fitoatenuação de Cd, Pb E Zn por milho em solo poluído por escória metalúrgica e tratado com biochar

RESUMO

A deposição de resíduos de mineração de forma indevida é um problema em todo o mundo. Escórias contendo metais pesados podem poluir solo e água e contaminar animais e seres humanos. A cidade baiana de Santo Amaro teve uma fundição de chumbo que, durante anos, poluiu seu território com a fumaça das chaminés e a escória depositada de forma indevida por toda a cidade. Com o objetivo de compreender a dinâmica de metais estabilizados em solos condicionados com biochar, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da aplicação de biochar a um solo poluído por múltiplos metais sobre a bioacessibilidade, disponibilidade e absorção de As, Cd, Pb e Zn por plantas e sobre o processo de fitoatenuação, visando indicar uma forma econômica e ambientalmente sustentável para remediação de solos contaminados. Para isto, foi realizado um experimento em casa de vegetação com doses crescentes de biochar (equivalentes a 0, 5, 10, 20 e 30 t ha⁻¹) aplicadas em solo poluído do município de Santo Amaro-Ba e cultivado com milho. Após o cultivo, foram determinados os teores de metais nas raízes e parte aérea, os nutrientes na parte aérea, o fracionamento de metais no solo e teste de bioacessibilidade. Além de avaliação de parâmetros fisiológicos (fluorescência da clorofila, trocas gasosas e teores de clorofila). Os resultados mostraram que o biochar pode ser indicado como amenizante de metais pesados em programas de fitoatenuação ou fitoestabilização no solo cocontaminado de Santo Amaro, uma vez que promoveu diminuição da mobilidade e disponibilidade de metais no solo, com melhoria na produção de matéria seca e nos atributos fotossintéticos de plantas de milho.

Palavras-chave: Clorofila. Metais pesados. Biocarvão. Santo Amaro.

Bioaccessibility and phytoattenuation of Cd, Pb and Zn by corn in soil polluted by metallurgical slag and treated with biochar

ABSTRACT

The improper disposal of mining waste is a problem worldwide. Slag containing heavy metals can pollute soil and water and contaminate animals and humans. The bahian city of Santo Amaro had a lead smelter that, for years, polluted its territory with the smoke from the chimneys and the slag improperly deposited throughout the city. In order to understand the dynamics of stabilized metals in soils conditioned with biochar, the present work aimed to evaluate the effects of applying biochar to a soil polluted by multiple metals on the bioaccessibility, availability and absorption of As, Cd, Pb and Zn by plants and on the phytoattenuation process, aiming to indicate an economically and environmentally sustainable way for remediation of contaminated soils. For this, an experiment was carried out in a greenhouse with increasing doses of vermin (equivalent to 0, 5, 10, 20 and 30 t ha⁻¹) applied to polluted soil in the municipality of Santo Amaro-Ba and cultivated with corn. After cultivation, the levels of metals in the roots and shoots, nutrients in the shoots, the fractionation of metals in the soil and bioaccessibility tests were determined. In addition to the evaluation of physiological parameters (chlorophyll fluorescence, gas exchange and chlorophyll contents). The results showed that biochar can be indicated as a ameliorating for heavy metals in phytoattenuation or phytostabilization programs in the Santo Amaro contaminated soil, since it promoted a decrease in the mobility and availability of metals in the soil, with an improvement in the production of dry matter and photosynthetic attributes of corn plants.

Keywords: Clorophyl. Heavy Metals. Biochar. Santo Amaro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipóteses	16
1.2 Objetivo geral	16
1.3 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Contaminação dos Solos por Metais Pesados	18
2.2 Métodos de remediação de metais pesados	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Coleta e caracterização do solo	22
3.2 Caracterização do biochar (PA 400°C)	24
3.3 Montagem e condução do experimento em casa vegetação	25
3.4 Avaliações fisiológicas	26
3.4.1 <i>Fluorescência da clorofila a</i>	26
3.4.2 <i>Determinação de pigmentos fotossintetizantes</i>	26
3.4.3 <i>Trocas gasosas</i>	27
3.5 Análise química nas plantas	27
3.6 Análises químicas no solo	28
3.6.1 <i>Teor total de Cd, Pb e Zn</i>	28
3.6.2 <i>Extração sequencial dos metais</i>	28
3.6.3 <i>Disponibilidade dos metais</i>	30
3.6.4 <i>Teores ambientalmente disponíveis</i>	30
3.6.5 <i>Bioacessibilidade humana</i>	30
3.7 Controle de qualidade e determinação dos teores dos metais e nutrientes na planta e no solo	31
3.8 Análises estatísticas	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Teores de Cd, Pb e Zn no solo tratado com biochar (PA 400°C)	31
4.1.1 <i>Disponibilidade e fracionamento químico</i>	31
4.1.2 <i>Bioacessibilidade humana</i>	34
4.2 Imagens de Microscopia eletrônica (MEV) e espectroscopia de raio-X por dispersão energia (EDS)	34

4.3 Produção de biomassa e resposta fisiológicas do milho cultivado em solo poluído por Cd, Pb e Zn e submetidos a doses de biochar (PA 400°C).....	35
4.3.1 <i>Produção da biomassa seca da parte aérea e raízes</i>	35
4.3.2 <i>Parâmetros fisiológicos e fluorescência da clorofila</i>	36
4.4 Teores de Cd, Pb e Zn e nutrição mineral de plantas do milho cultivado em solo poluído e submetidos a doses de biochar (PA 400°C)	38
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O contato intenso dos seres humanos com os metais pesados teve início com as atividades de extração e fundição de minérios. Nesse momento da história, as atividades antropogênicas passaram a ser importantes fontes de poluição. Teores anômalos, antes apenas gerados naturalmente, passaram a ter um grande nível de participação humana, por vezes sem intenção, outras vezes pelo desenvolvimento irresponsável de atividades agrícolas, domésticas e industriais.

O Brasil tem o maior caso de contaminação por Pb no mundo. A atividade industrial de uma fundição de chumbo no município de Santo Amaro, na Bahia provocou um enorme passivo ambiental. Surgida na década de 60, a metalúrgica contaminou milhares de pessoas no seu entorno. Inicialmente, pela fumaça tóxica das fundições. Anos mais tarde, com a distribuição da escória da forja, um mineral com elevadas concentrações de chumbo e outros metais pesados, que foi amplamente distribuído pela cidade, servindo principalmente como pavimentação e tido como sinônimo de progresso. Os problemas de ordem ambiental e saúde humana se estendem até os dias atuais, sem que as vítimas tenham a devida assistência.

Nestas situações, onde os limites de poluentes excedam o permitido pela legislação, é necessário que se desenvolvam estratégias de remediação do contaminante.

Dentre os vários modelos de remediação, a fitorremediação, método que envolve plantas e lança mão de diversas estratégias, como a extração e a amenização, destaca-se pela melhor relação custo x benefício, por permitir a associação com a aplicação de amenizantes, além de possibilitar o uso da área para produção de renda enquanto a remediação prossegue.

Uma importante técnica de fitorremediação é a fitoatenuação, que parte do princípio de que, com gestão dos riscos e observando as normas de segurança, é possível utilizar culturas que tolerem ambientes contaminados enquanto geram retorno econômico, especialmente com a produção de culturas energéticas.

Associado a produção de culturas energéticas, tem-se muitas vezes a aplicação de um amenizante no solo, com objetivo de impedir a passagem de metais para os tecidos da planta. Nesse sentido, o biochar, um composto rico em carbono pirogênico que possui alta estabilidade química e física e potencial de permanência

no solo por muitos anos, pode ter um papel importante como coadjuvante da fitoatenuação. É amplamente relatada a capacidade do biochar adsorver metais pesados, o que pode elevar o desenvolvimento da planta e a efetividade do método de remediação.

Como parâmetros para avaliar a efetividade do processo de amenização, tem-se diversos métodos que permitem monitorar a diminuição da toxicidade dos metais no solo e parâmetros que verifiquem a eficiência fotossintética das plantas, um parâmetro que assegura o estado da cultura e o desempenho da técnica.

1.1 Hipóteses

- Tratamentos com biochar promovem a amenização da contaminação por metais pesados no solo;
- A combinação do plantio de culturas energéticas aliadas a aplicações de biochar promovem a estabilização dos metais no solo;
- A adição de biochar no solo poluído promove redução na bioacessibilidade humana dos Metais Pesados;
- Variáveis fisiológicas, tais como os teores dos pigmentos fotossintéticos, a fluorescência da clorofila e as trocas gasosas em plantas de milho são afetadas pela alta exposição a metais pesados e, por isso, podem ser utilizadas na avaliação da performance de amenizantes da contaminação.

1.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da aplicação de biochar a um solo poluído por múltiplos metais sobre a bioacessibilidade, disponibilidade e absorção de As, Cd, Pb e Zn por plantas e sobre o processo de fitoatenuação, visando indicar uma forma econômica e ambientalmente sustentável para remediação de solos contaminados.

1.3 Objetivos específicos

- Analisar o potencial de fitoatenuação do cultivo da cultura do milho no solo poluído com escória metalúrgica, como aliado na amortização dos custos da remediação;

- Estudar o nível de influência do biochar sobre a solubilidade ou retenção dos metais pesados com diferentes características de mobilidade no solo, bem como na bioacessibilidade humana;
- Definir doses adequadas de biochar para futuros experimentos de campo e para aplicação em processos de fitoatenuação de solos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação dos Solos por Metais Pesados

A poluição do solo por metais pesados decorrente das atividades antrópicas é tão antiga quanto à capacidade do ser humano de extrair e fundir minérios. Em escala de tempo, tem-se algo próximo a 2500 anos antes de Cristo – na Idade do Bronze. Esta mudança de estágio civilizatório e o manuseio de elementos químicos pouco abundantes na superfície da crosta terrestre alterou a composição e iniciou o processo de contaminação do solo por metais pesados. A concentração anômala de metais ocorre também de forma natural em diversas regiões do mundo, com variações quanto ao metal predominante em função dos teores naturais no material de origem local, mas a maior parte da contaminação ocorre devido a atividades antropogênicas, tais como a mineração, a siderurgia, a metalurgia, a deposição de resíduos urbanos – industriais, o tráfego veicular, o uso de defensivos agrícolas e fertilizantes dentre outras atividades (KABATA-PENDIAS, 2010).

Por ser um processo relativamente novo em relação à evolução e adaptação das espécies na exposição a metais pesados, a maioria dos organismos não está adaptada ao contato com altos teores destes contaminantes. Desta forma, após o solo de uma área ser contaminada por metais pesados, os processos de revegetação, estabelecimento de organismos e atividades econômicas são comprometidas, resultando na perda de sua múltipla funcionalidade e potencial risco a saúde humana pela exposição direta ao solo poluído ou por meio da cadeia alimentar (DONALDSON; LORD, 2018; LIMASSET et al., 2018; OSORIO; CORRADINI; WILLIAMS, 2013).

Um dos casos mais graves de poluição ambiental, principalmente, por Pb ocorreu na cidade de Santo Amaro, Bahia. O passivo ambiental decorrente das atividades de uma antiga metalúrgica de minério Pb, nas décadas de 60 – 80, foi responsável pela contaminação de milhares de pessoas na região ao entorno da indústria. Estudos recentes têm demonstrado que, mesmo após três décadas de inatividade industrial, os solos adjacentes a indústria encontram-se poluídos por Pb e possuem teores de Cd e Zn que representam potencial risco a saúde humana (SANTOS et al., 2015).

A metalúrgica processava minério de galena (PbS) e por meio de processo de oxidação obtia concentrado de óxido de chumbo (PbO). O PbO, por sua vez, era reduzido a Pb metálico para fabricação de lingotes do metal. O processo industrial resultou na produção de uma grande quantidade de escória, que na sua composição continha 4% de PbO, 9% de ZnO além de Sb, As, Cd e outros metais em menores quantidades (SILVA et al., 2017).

Desde o início das atividades industriais, houveram denúncias por parte dos moradores, especialmente pecuaristas, afetados pelas mortes de seus animais. No entanto, os primeiros estudos só foram realizados a partir dos anos 1970 (ANDRADE; MORAES, 2013). Na década de 1980, as residências localizadas a menos de 500 m da chaminé da usina foram removidas, as chaminés foram alongadas e foram instalados filtros nas mesmas, evitando as emissões atmosféricas de contaminantes (LIMA; BERNARDEZ, 2011; MACHADO et al., 2013).

Além da emissão atmosférica, outra importante disseminação da contaminação foi devido a escória produzida nos altos-fornos da indústria, que foi descartada incorretamente próximo à fundição e utilizada pelos residentes na pavimentação urbana e construção civil. Fato que agravou ainda mais o problema socioambiental (LIMA; BERNARDEZ, 2011; MACHADO et al., 2013).

No estudo que avaliou 250 crianças residentes no raio de 900 m da indústria, ainda em funcionamento, demonstrou que as concentrações de Pb no sangue tinha valor médio de $7,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SILVANY-NETO et al., 1989), enquanto que após o encerramento de suas atividades, a concentração média de Pb, em um novo grupo de crianças, os teor foi superior a $0,96 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, crianças que viviam próximo ao local de deposição dos rejeitos tinham concentrações do metal no sangue superior daquelas que viviam em locais desprovidos de contaminação por metais (MACHADO et al., 2013). O máximo tolerável de Pb no sangue de crianças, de acordo com o Centros de Controle de Doenças (CDC) (1979), é $0,43 \mu\text{mol/L}$. Portanto, as crianças de Santo Amaro apresentavam teores de Pb no sangue acima de 2 vezes o maior valor aceitável.

2.2 Métodos de remediação de metais pesados em solos

Os métodos de remediação de solos contaminados por metais pesados podem ser divididos em dois grupos principais: a) métodos ex situ, nos quais o solo contaminado é retirado da área contaminada e tratado em outro local; e b) métodos in situ, que remediam o solo na própria área contaminada. Os métodos de remediação ex situ geralmente envolvem obras de engenharia ou uso de equipamentos e são, geralmente, mais onerosos e perturbadores do ambiente do que os métodos in situ. Os programas de remediação in situ, por outro lado, seguem uma estratégia de contenção do contaminante (estabilização) ou de redução do contaminante (atenuação), utilizando compostos minerais e orgânicos e/ou plantas para atingir esses objetivos (COUTINHO et al., 2015; PIERZYNSKI; VANCE; SIMS, 2005).

Dentre os métodos in situ, um dos mais vantajosos economicamente é a fitorremediação. Entre suas diversas variantes, este método se baseia na utilização de plantas, algumas vezes em conjunção com o uso de microrganismos e compostos orgânicos, para redução da concentração ou dos efeitos tóxicos dos contaminantes nos solos. Além da vantagem de menores custos em relação a métodos tradicionais, a fitorremediação pode ser utilizada em grandes áreas, melhorar a paisagem, possibilitar um retorno financeiro em áreas abandonadas e valorizar esteticamente a área sem que haja danos consideráveis ao meio ambiente (ALVES et al., 2016; GABOS et al., 2011). Há vários métodos de fitorremediação: 1) Fitoextração – se dá com a utilização de plantas com capacidade de remover os metais do solo e armazená-los na biomassa acima do solo, que posteriormente será removida da área; 2) fitoestabilização – onde o uso de plantas se dá com o intuito de reduzir a mobilidade dos metais por meio do acúmulo nas raízes ou precipitação na rizosfera; 3) fitovolatilização – usada para poluentes voláteis, onde as plantas transformam os poluentes do solo em espécies voláteis, liberando-as para a atmosfera (NASCIMENTO; XING, 2006).

Outra técnica de manejo de áreas contaminadas chama-se fitoatenuação. O termo foi proposto baseado na ideia de que a extração dos poluentes não precisa ser o objetivo principal da fitorremediação, especialmente ao se observar o tempo necessário para o processo de fitoextração, enquanto a área permanece improdutiva, o que pode comprometer a viabilidade econômica da atividade. Em vez disso, com gestão dos riscos e observando as normas de segurança, é possível utilizar culturas

que tolerem ambientes contaminados enquanto geram retorno econômico (MEERS et al., 2010).

Atualmente, a tendência de uso de culturas energéticas, que apresentam a possibilidade de converter a biomassa em biodiesel ou energia térmica, é uma oportunidade para remediação da área aliada a uma produção de energia (GABOS et al., 2011). Esta técnica é importante também do ponto de vista da segurança alimentar, uma vez que deixam de ser usadas terras aráveis para geração de biocombustíveis e se aproveita áreas antes abandonadas (LIMASSET et al., 2018).

Uma cultura que se encaixa nos objetivos da fitoatenuação é o milho, especialmente as variedades de milho energético, usadas especialmente para a produção de biogás através de digestão anaeróbica. Outro ponto de destaque é que há um baixo acúmulo de metais nas partes das plantas que podem ser colhidas, reduzindo os riscos de acúmulo do metal na biomassa e de possíveis contaminações (MEERS et al., 2010).

2.3 Biochar e seus efeitos na imobilização de metais pesados no solo

Um dos compostos ricos em carbono que pode ser usado em processos de fitoatenuação de solos contaminados é o biochar. Este é um material derivado da pirólise entre 350°C e 700°C de fontes de matéria orgânica, como madeira, esterco, palha de trigo, cascas de arroz, lodo de esgoto, entre outros (LIU et al., 2015). O processo de queima resulta em um material poroso e de grãos finos. Fontes de biomassa derivados de plantas resultam em um biochar considerado condicionador do solo, enquanto biochar derivado de esterco pode liberar nutrientes e ser utilizado como fertilizante e condicionador do solo (PARK et al., 2011). Devido à sua natureza estável, o biochar tem elevado potencial de fixar carbono, podendo permanecer no solo por muitos anos, proporcionando uma manutenção das melhorias alcançadas nos atributos químicos do solo (MIRANDA et al., 2017; XU et al., 2014). Outro ponto positivo que este composto possui é seu potencial em adsorver metais pesados. Xu et al., (2014) mostraram redução na biodisponibilidade de metais em solos tratados com biochar. Sendo assim, o biochar pode ser usado em associação às técnicas tradicionais de fitorremediação ou fitoatenuação, já que é capaz de elevar o crescimento das plantas e a produção de biomassa (PARK et al., 2011).

A alta capacidade de sorção do biochar, e a sua consequente eficiência para adsorção de poluentes orgânicos e inorgânicos, é atribuída a sua alta aromaticidade (BIAN et al., 2013). Por isso, vários trabalhos lançam mão do potencial estabilizador de contaminantes deste material. Xu et al. (2014) encontraram uma diminuição na biodisponibilidade de Cd, Pb e Zn em escórias de minas tratadas com biochar. Hernández-Soriano, Peña e Mingorance (2011) conseguiram reduzir os teores de metais na solução do solo. Fellet, Marmiroli e Marchiol (2014) utilizaram biochar para promover a revegetação de áreas de rejeitos de minas, reduzindo a toxicidade de metais nestes solos. Puga et al. (2015), por sua vez, comprovaram a redução dos teores de metais disponíveis em solução pela aplicação de biochar, diminuindo os riscos de lixiviação destes poluentes. Devido a elevada estabilidade do biochar, os metais adsorvidos serão liberados muito mais lentamente que aqueles adsorvidos por outras formas de matéria orgânica, mais facilmente decomponíveis (TANG et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e caracterização do solo

O solo utilizado no experimento foi coletado na cidade de Santo Amaro, Bahia, na camada superficial de 0,0 – 0,2 m, na área da antiga fundição de chumbo onde foram depositadas grandes quantidades da escória metalúrgica.

O solo foi homogeneizado, seco ao ar, e peneirado em malha de 4,0 mm. Uma amostra foi selecionada, passada, destorroada e passada em peneira de 2mm para caracterização química e física do solo. O pH foi determinado em água na relação solo:solução (1:2,5); Na⁺ e K⁺ determinados por fotometria de emissão de chama; Ca²⁺ e Mg²⁺ foram extraídos com a solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ e determinados por complexometria com EDTA (0,0125 mol L⁻¹); Al³⁺ foi extraído com KCl 1,0 mol L⁻¹ e determinado por meio da titulação com hidróxido de sódio; a acidez potencial (H+Al) foi extraída com a solução de acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ e determinada por meio de titulação alcalimétrica; o P disponível foi extraído com solução de Mehlich-1 e determinado por colorimetria. Todo o procedimento analítico foi realizado de acordo

com os protocolos estabelecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2017). O teor do carbono orgânico do solo foi obtido pelo método de oxidação do C via dicromato de potássio (SILVA; TORRADO; ABREU JUNIOR, 1999). A fração granulométrica foi obtida pelo método do densímetro (ALMEIDA, 2008).

Com relação aos metais pesados no solo, a disponibilidade de Cd, Pb e Zn no solo foram extraídos com DTPA ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3) (LINDSAY; NORVELL, 1978) e os teores ambientalmente disponíveis foram obtidos pelo método 3051A (USEPA, 2007). Utilizou-se 0,500 g de solo macerado em almofariz de ágata e passado em peneira de aço inox de 0,3 mm de abertura. O solo foi colocado em tubos de teflon e adicionou-se 9 mL de HNO_3 + 3 mL de HCl. As amostras foram digeridas em forno micro-ondas a 175°C por 4' 30". Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel de filtro faixa azul (filtragem lenta) e os volumes foram aferidos para 25 mL em balões volumétricos certificados com água ultrapura (Tabela 1).

Tabela 1. Características química e física do solo utilizado no experimento e valores orientadores de qualidade para metais pesados no solo

Variáveis	Unidades	Resultados
pH	água (1:2,5)	7,2
Ca ²⁺	cmol _c dm ⁻³	27,0
Mg ²⁺	cmol _c dm ⁻³	6,7
K ⁺	cmol _c dm ⁻³	0,4
Al ³⁺	cmol _c dm ⁻³	0,0
H + Al	cmol _c dm ⁻³	2,8
CTC	cmol _c dm ⁻³	37,5
P _{disp}	mg kg ⁻¹	43,9
COS	g kg ⁻¹	20,3
MOS	g kg ⁻¹	35,0
Areia	g kg ⁻¹	90,5
Silte	g kg ⁻¹	318,5
Argila	g kg ⁻¹	591,0
Ds	g cm ⁻³	1,5
Cd _(DTPA)	mg kg ⁻¹	19,2
Pb _(DTPA)	mg kg ⁻¹	855,6
Zn _(DTPA)	mg kg ⁻¹	65,1
Cd _(3051A)	mg kg ⁻¹	19,3
Pb _(3051A)	mg kg ⁻¹	1392,8
Zn _(3051A)	mg kg ⁻¹	366,3
Cd _(VI)	mg kg ⁻¹	20,0
Pb _(VI)	mg kg ⁻¹	900,0
Zn _(VI)	mg kg ⁻¹	2000,0

SB soma de bases; CTC capacidade de troca de cátions; P_{disp} fósforo disponível do solo; COS carbono orgânico de solo; MOS matéria orgânica do solo; Ds densidade do solo; Cd, Pb, Zn_(DTPA) teores disponíveis dos metais pesados no solo extraído com DTPA (0,005 mol L⁻¹ pH 7,3) (Lindsay & Norvell 1978); Cd, Pb, Zn_(3051A) teores ambientalmente disponíveis dos metais no solo extraídos de acordo com o protocolo 3051A da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (US EPA 2007); Cd, Pb, Zn_(VI) valores de investigação preconizados pela Resolução nº 420/2009 do CONAMA (CONAMA 2009).

3.2 Caracterização do biochar (PA 400°C)

O biochar utilizado no experimento é um produto comercial resultante da pirólise da palha de arroz a 400°C. Em uma amostra do biochar foram determinados os valores de pH, CE, CTC, umidade, material volátil, teor de cinzas, carbono fixado e área de superfície de acordo com a recomendação de SINGH et al. (2017) (Tabela 2). Também foram determinados os teores totais de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Cd e Pb que foram obtidos da digestão do biochar pelo método 3051A (USEPA, 2007) e determinação por espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES/Optima 7000 Perkin Elmer). Para avaliação da porosidade do biochar e semiquantificação dos elementos maiores, foram realizadas imagens deste material em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com os teores de C, H, Si, O e N determinados por espectroscopia de raio-X por dispersão energia (EDS).

Tabela 2. Características química/física e composição nutricional/elementar do biochar da palha de arroz (PA 400°C)

	Unidades	Biochar (PA 400°C)
Propriedades químicas/físicas		
pH (1:20)		5,73 ± 0,11
CE (1:10)	μS m ⁻¹	222,40 ± 41,30
Capacidade de troca de cátions (CTC)	mmolc kg ⁻¹	139,95 ± 2,42
Umidade	%	7,53 ± 0,07
Material volátil	%	8,60 ± 2,40
Teor de cinzas	%	33,14 ± 0,73
Carbono fixado	%	49,27 ± 5,91
Composição elementar/nutricional		
Carbono (C)	%	66,05 ± 3,12
Silício (Si)	%	36,40 ± 3,11
Oxigênio (O)	%	10,65 ± 1,77
Nitrogênio (N)	%	2,89 ± 0,04
Fósforo (P)	g kg ⁻¹	11,70 ± 0,15
Potássio (K)	g kg ⁻¹	6,01 ± 0,05
Cálcio (Ca)	g kg ⁻¹	2,07 ± 0,02
Magnésio (Mg)	g kg ⁻¹	0,79 ± 0,06
Ferro (Fe)	mg kg ⁻¹	747,45 ± 9,55
Manganês (Mn)	mg kg ⁻¹	917,50 ± 4,24
Cobre (Cu)	mg kg ⁻¹	20,25 ± 0,35
Zinco (Zn)	mg kg ⁻¹	37,75 ± 1,77
Cádmio (Cd)	mg kg ⁻¹	< LOQ
Chumbo (Pb)	mg kg ⁻¹	< LOQ

Os valores são uma média ± desvio padrão ($n = 3$). LOQ limite de quantificação (0,07 e 0,78 mg kg⁻¹ para Cd e Pb, respectivamente). PA palha de arroz.

3.3 Montagem e condução do experimento em casa vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE. O solo previamente coletado e seco ao ar foi destorroado e passado em peneira de malha de 4mm, para conservação dos microagregados. Cinco quilos de solo foram acondicionados em vasos plásticos. Os solos foram fertilizados com macro e micronutrientes de acordo com a recomendação de SILVA, W. R. DA et al. (2017). As doses de N, P, K e S foram 250,0; 240,0 150,0 e 160,0 mg kg⁻¹, respectivamente fornecidos por NH₄SO₂, NH₄H₂PO₄ e KNO₃. Enquanto para os micronutrientes, as doses de Fe, Mn, B e Mo foram 2,0; 4,0; 1,0 e 0,2 mg kg⁻¹, respectivamente, nas formas de FeSO₄.7H₂O, MnCl₄.4H₂O, H₃BO₃ e Na₂MoO₄.2H₂O.

No momento da adubação, aplicou-se as doses de 0, 5, 10, 20 e 30 t ha⁻¹ do biochar (PA 400°C) ao solo. Posteriormente, cinco sementes de milho (Variedade São José) foram semeadas nos vasos. Após a germinação e desenvolvimento das plântulas, realizou-se o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. O solo foi

mantido a 80% da capacidade de pote e a água perdida pela evapotranspiração, repostas por meio de regas diárias.

Os tratamentos foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo as fontes de variação, os cinco níveis de biochar aplicados e três repetições.

3.4 Avaliações fisiológicas

Os danos causados pelo excesso de metais ao aparato fotossintético foram avaliados pela investigação das trocas gasosas, quantificação dos teores das clorofilas a e b e carotenoides, por meio dos espectros de emissão da fluorescência da clorofila.

3.4.1 Fluorescência da clorofila a

A avaliação da fluorescência da *clorofila a* foi realizada nas plantas de milho aos 44 dias após o plantio (um dia antes da coleta do experimento). Para medição utilizou-se o fluorômetro manual FluorPen, modelo F100 (Photon Systems Instruments). Foram selecionadas as primeiras folhas superiores totalmente expandidas e, com o auxílio de pinças específicas, estas folhas tiveram uma seção do limbo adaptada ao escuro por 30 minutos. Os parâmetros de fluorescência transiente do teste OJIP (STRASSER; SRIVASTAVA; TSIMILLI-MICHAEL, 2000), encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos parâmetros de fluorescência de clorofila

F0	F0 = F50 μ s, intensidade da fluorescência aos 50 μ s
FM	Máxima intensidade de fluorescência
FV	FV = FM - F0 (fluorescência variável máxima)
Fv / FM	Eficiência quântica

3.4.2 Determinação de pigmentos fotossintetizantes

Nas mesmas folhas utilizadas para determinação da fluorescência, foram determinados os teores de clorofilas a, b, total e carotenoides. Utilizou-se um método

destrutivo (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001), onde 0,100 g da matéria fresca da folha foi fracionado em partes pequenas e armazenado em frascos de vidro âmbar para se evitar a passagem de luz. Adicionou-se 10 mL de acetona 80 % e acondicionou-se a amostra refrigerada durante 24h, tempo necessário para ocorrer à extração. Após a extração, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro – UV. Os valores obtidos foram aplicados nas equações 1, 2 e 3:

$$Cla_{(\mu g mL^{-1})} = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8} \quad (Eq. 1)$$

Onde *Cl_a* é o teor da *clorofila a*, $A_{663,2}$ é valor da absorvância no comprimento de onda de 663,2 nm e $A_{646,8}$ é o valor da absorvância no comprimento de onda de 646,8 nm.

$$Clb_{(\mu g mL^{-1})} = 21,5 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2} \quad (Eq. 2)$$

Onde *Cl_b* é o teor da *clorofila b*.

$$C(x+c)_{(\mu g mL^{-1})} = \frac{(1000 \times A_{470} - 1,82 \times Cl_a - 85,02 \times Cl_b)}{198} \quad (Eq. 3)$$

Onde $C(x+c)$ é o teor de carotenoides e xantofilas e A_{470} é o valor da absorvância no comprimento de onda de 470 nm.

3.4.3 Trocas gasosas

O monitoramento das trocas gasosas foi realizado nas plantas aos 44 dias após o plantio, com o uso do analisador de gás a infravermelho (IRGA). As medidas foram tomadas nas primeiras folhas superiores totalmente expandidas e saudáveis, entre as 9:00 – 11:00 h da manhã. Os parâmetros foram obtidos sob condições ambientais, portanto, sem o uso da câmara de luz. Sendo assim, considerou-se apenas leituras tomadas com PAR acima de $1500 \mu mol m^2 s^{-1}$

Foram determinadas a taxa fotossintética, a taxa de transpiração e a condutância estomática.

3.5 Análise química nas plantas

Após 45 dias do plantio, o experimento foi coletado. As plantas foram separadas em raízes e parte aérea; lavadas com água destilada; secas em estufa a 60°C; pesadas para a obtenção da produção de biomassa; e trituradas em moinho de

facas, tipo Wiley. Para determinação dos teores dos metais (Cd, Pb e Zn) e para avaliação nutricional do milho, 0,500 g das amostras das raízes e da parte aérea foram pesadas e transferidas para tubos de teflon com 8 mL de HNO₃ + 2 mL de H₂O₂; e digeridas em forno de micro-ondas a 180°C por 10'. Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel de filtro quantitativo faixa azul e o volume aferido para 25 mL em balões certificados com água ultrapura.

Os teores de N, Ca, Cd, Pb, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn e Zn foram analisados. O N foi extraído pela digestão de 0,200 g do material vegetal em ácido sulfúrico concentrado a 350°C, de acordo com o método de Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995). As determinações de P foram realizadas por colorimetria; K por espectrometria de chama; enquanto Ca, Cd, Pb, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES/Optima 7000 Perkin Elmer).

3.6 Análises químicas no solo

Ao término do experimento, amostras de solo foram coletadas para investigação dos teores de Cd, Pb e Zn. Os solos foram secos, destorroados; peneirados em malha de 2,0 mm; e armazenados para posterior análise.

3.6.1 Teor total de Cd, Pb e Zn

A digestão total seguiu o protocolo estabelecido por (ESTÉVEZ ALVAREZ et al., 2001). 0,500 g de solo macerada e peneirado em malha de 0,150 mm foi acondicionado em béquerde teflon e dissolvido em solução ácida com 5 mL HF + 5 mL HNO₃ + 3 mL HClO₄ + 5 mL HCl a 180°C. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel de filtro de faixa azul e o volume aferido para 25 mL em balões volumétricos certificados com água ultrapura.

3.6.2 Extração sequencial dos metais

A extração das frações de Cd, Pb e Zn no solo foi baseada na metodologia de SHUMAN (1985) e CHAO; ZHOU, L. (1983) adaptado por NASCIMENTO, C. W. A. et al. (2002). Foram acessados os metais ligados às frações trocável, matéria orgânica,

óxido de ferro amorfo e óxido de ferro cristalino. A extração sequencial foi realizada da seguinte forma:

- ✓ **Fração trocável (Tr):** Foram colocados 5,00 g de TFSA e agitadas por 2h com 20 mL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em um tubo de centrífuga de 50 mL. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada e filtrada. Posteriormente, 20 mL de água destilada foram adicionados ao tubo e agitados por 3 minutos, seguido de centrifugação e filtragem. Este segundo sobrenadante foi combinado ao primeiro e armazenado a 4°C .
- ✓ **Fração matéria orgânica (MO):** No mesmo tubo, ainda com a amostra de solo da extração anterior, foram adicionados 10 mL de NaClO $5\text{-}6 \text{ dag L}^{-1}$, com pH ajustado para 8,5. Os tubos foram colocados semiabertos em aquecimento em banho-maria a 100°C durante 30 minutos. A cada 10 minutos agitou-se a amostra, com a tampa devidamente fechada. Após o aquecimento, a amostra foi centrifugada e filtrada. O procedimento foi repetido duas vezes e os três filtrados foram combinados. Posteriormente, 10 mL de água destilada foram adicionados ao tubo e agitado por 3 minutos, centrifugado e filtrado; e novamente combinado aos demais.
- ✓ **Fração óxido de ferro amorfo (OxFeA):** 30 mL de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ + HCl $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 3,0 foram adicionados à amostra e agitados por 30 minutos, centrifugadas e filtradas. Posteriormente, 10 mL de água destilada foram adicionados ao tubo e agitado por 3 minutos, centrifugado e filtrado. O sobrenadante da lavagem foi descartado.
- ✓ **Fração óxido de ferro cristalino (OxFeC):** 30 mL da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido ascórbico $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 3,0 foram adicionados à amostra. Estas foram aquecidas em banho-maria por 30 minutos a 100°C , sendo agitadas eventualmente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e filtradas.
- ✓ **Fração residual:** Os teores dos metais presentes nesta fração foram obtidos pela diferença entre a soma das frações anteriores e os teores obtidos da digestão total das amostras.

3.6.3 Disponibilidade dos metais

A extração dos teores disponíveis de metais foi realizada com DTPA 0,005 mol L⁻¹ + 0,1 M de trietanolamina + 0,01 M de CaCl₂ (pH 7,3) (LINDSAY; NORVELL, 1978). A extração ocorreu com a agitação de 10,0 g de solo (TFSA) com 20 mL da solução extratora por 2h, posteriormente centrifugado, o sobrenadante filtrado em papel de filtro faixa azul e armazenado a 4°C para posterior análise.

3.6.4 Teores ambientalmente disponíveis

Este método de digestão foi baseado no protocolo 3051A (USEPA, 2007). Foi utilizado 0,500 g de solo previamente macerado em almofariz de ágata e passado em peneira de 0,3 mm e digerido com 9 mL de HNO₃ + 3 mL de HCl em forno micro-ondas a 175°C por 4' 30". Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel filtro de faixa azul e o volume foi aferido para 25 mL em balões volumétricos certificados com água ultrapura.

3.6.5 Bioacessibilidade humana

A determinação dos teores bioacessíveis dos metais foi feita a partir do método PBET (RUBY et al., 1996) que simula a fase gástrica humana. Para isto, usou-se uma solução que simula o conteúdo estomacal, que contém pepsina, malato de sódio, citrato de sódio, ácido láctico, ácido acético e ácido clorídrico (pH 1,5). 0,500 g de solo foi misturado com 50 mL da solução gástrica e agitados por 1h a 32 rpm na temperatura de 37°C. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas 3000 rpm por 10', o sobrenadante filtrado em papel de filtro faixa azul e armazenado a 4°C.

A bioacessibilidade gástrica de Cd, Pb e Zn foi calculada de acordo com a equação 5:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \left(\frac{\text{Teor bioacessível (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{Teor total do metal (mg kg}^{-1}\text{)}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Os teores de Cd, Pb e Zn em todos os extratos dos solos foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP-OES/Optima 7000 Perkin Elmer).

3.7 Controle de qualidade e determinação dos teores dos metais e nutrientes na planta e no solo

Como controle de qualidade das análises químicas utilizou-se amostras em branco e amostras de solo SRM 2711a (*Montana Soil*) e planta 1570a (*Spinach leaves*) com valores dos elementos certificados pelo NIST (*National Institute Standard and Technology*). A recuperação dos teores dos elementos na amostra certificada SRM 2711a variou de 85 – 105%, enquanto na amostra 1570a as recuperações estiveram entre 90 – 110%. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.8 Análises estatísticas

Os valores da média e do desvio padrão foram calculados para todas as variáveis analisadas. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro – Wilk, e quando necessário transformações do tipo logarítmica e raiz quadrada foram empregadas no conjunto dos dados. Cada variável analisada foi submetida a ANOVA ($p < 0,05$). Modelos de regressões foram ajustados as variáveis dependentes em função das doses de biochar aplicadas aos solos. O critério de escolha de melhor ajuste foi baseado no valor do coeficiente de regressão (r^2) e no valor da significância do ajuste (p – *valor*). Os valores médios dos tratamentos das variáveis fisiológicas e dos teores nutrientes na planta foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todo procedimento estatístico foi realizado utilizando os softwares STATISTICA (v 10.0) e OriginPro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teores de Cd, Pb e Zn no solo tratado com biochar (PA 400°C)

4.1.1 Disponibilidade e fracionamento químico

Para os três metais do estudo o comportamento da disponibilidade foi muito semelhante. Houve decréscimo de forma linear com a elevação das doses de biochar. A maior redução após o uso de maior dose de biochar foi no teor de Cd, com cerca de 48%. Já os teores de Pb e Zn reduziram cerca de 37%, sob as mesmas condições.

Bashir et al. (2018) e Yin et al. (2016) também encontram resultados semelhantes, onde tratamentos com biochar reduziram a disponibilidade de metais pesados, sugerindo interações destes com os grupos funcionais do biochar (Figura 1).

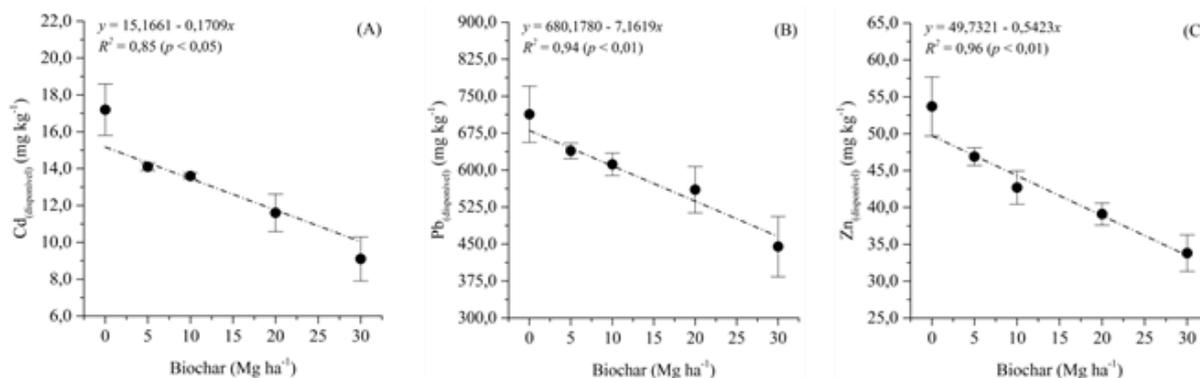


Fig 1. Teores médios (\pm desvio padrão) de Cd, Pb e Zn disponíveis no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgica de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados com milho por 45 dias. $p < 0,05$ significativo a 5% de probabilidade pela ANOVA; $p < 0,01$ significativo de 1% de probabilidade pela ANOVA

A diminuição dos teores de Cd, Pb e Zn extraíveis por DTPA também foi observada por Cheng et al. (2018) e Lu et al. (2014). Estes estudos sugerem que esta diminuição pode ocorrer por dois motivos: aumento da adsorção dos metais pela matéria orgânica e aumento na formação de complexos estáveis entre material orgânico e os metais.

Os resultados da extração sequencial mostram Pb e Zn com comportamento semelhante, ainda que o Zn esteja com maiores valores ligados a OFeA do que o Pb. Os óxidos tem um papel importante na disponibilidade de Pb e Zn, uma vez que pode haver reações de ligação de esfera interna, o que impediria o acesso a estes contaminantes (RODRÍGUEZ et al., 2009). O maior percentual do teor de metais está associado à fração residual (Figura 2), associada à silicatos ou a minerais primários, como a galena (mineral utilizado na fundição de Pb sob estudo). Sendo assim, estes metais só estariam acessíveis pelo processo de intemperismo, que, por ser de liberação mais lenta, minimizaria os efeitos a curto prazo (FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2002; LOPES et al., 2015).

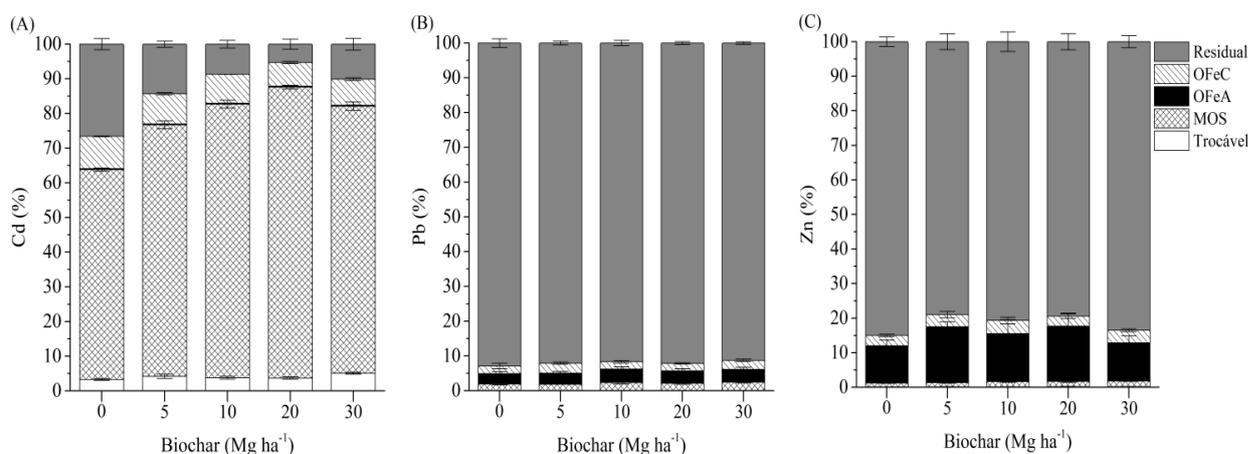


Figura 2. Percentuais médios (\pm desvio padrão) do fracionamento químico de Cd, Pb e Zn no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados com milho por 45 dias. MOS fração ligada a matéria orgânica do solo, OFeA fração ligada aos óxidos de ferro amorfo, OFeC fração ligada aos óxidos de ferro cristalino

Os valores de Zn corroboram os resultados encontrados por Silva et al. (2017), onde há a predominância deste elemento ligado às frações de óxidos amorfos e residual. Uma explicação é a presença de oxissulfatos de Zn nos resíduos da fundição, que é um comportamento já relatado na literatura (LI; THORNTON, 2001)

Referente ao Pb, também há uma maior associação deste metal à fração residual, chegando a valores de 90%. Este comportamento também foi observado por Lopes et al. (2015) e Silva et al. (2017). Além da ligação com silicatos, Filgueiras; Lavilla; Bendicho (2002) também sugeriram que o Pb pudesse estar ligado à sulfetos, uma vez que o reagente utilizado nesta etapa de extração também remove metais ligados à esta fração, além de haver a presença de sulfato de chumbo ($PbSO_4$) nas emissões deste tipo de fundição (LI; THORNTON, 2001).

Percebe-se que o biochar não alterou significativamente a distribuição de Zn e Pb nas frações do solo. Quanto ao Cd, o comportamento foi diferente. Há uma predominância de ligação à matéria orgânica (fração lábil), que é aumentada conforme se elevou as doses de biochar. Os teores distribuídos entre óxidos e trocável mantiveram sua proporção, apenas a fração residual teve diminuição, com transferência do Cd para a fração matéria orgânica. Apesar de este comportamento sugerir um risco maior de transferência do elemento aos recursos hídricos, não é isso que se evidencia na disponibilidade. Uma vez que a aplicação de biochar aliada a alta afinidade de Cd pela matéria orgânica, torna este elemento mais estável no solo,

especialmente porque o biochar apresenta alta capacidade de troca catiônica e grupos funcionais, já relatados como importantes da fixação deste metal no solo (LI et al., 2017).

4.1.2 Bioacessibilidade humana

A adição de biochar resultou em aumentos crescentes muito significativos nos teores bioacessíveis (Figura 3). O comportamento de Cd e Pb foi muito semelhante, ambos apresentaram um acréscimo de aproximadamente 89%. Para o Zn, a bioacessibilidade foi ainda mais evidente. O pico foi obtido nas doses de 10 e 20 t ha⁻¹, onde obteve-se 100% de acréscimo. Na dose mais elevada de biochar, 30 t ha⁻¹, houve um aumento mais discreto mas ainda muito evidente, cerca de 50%.

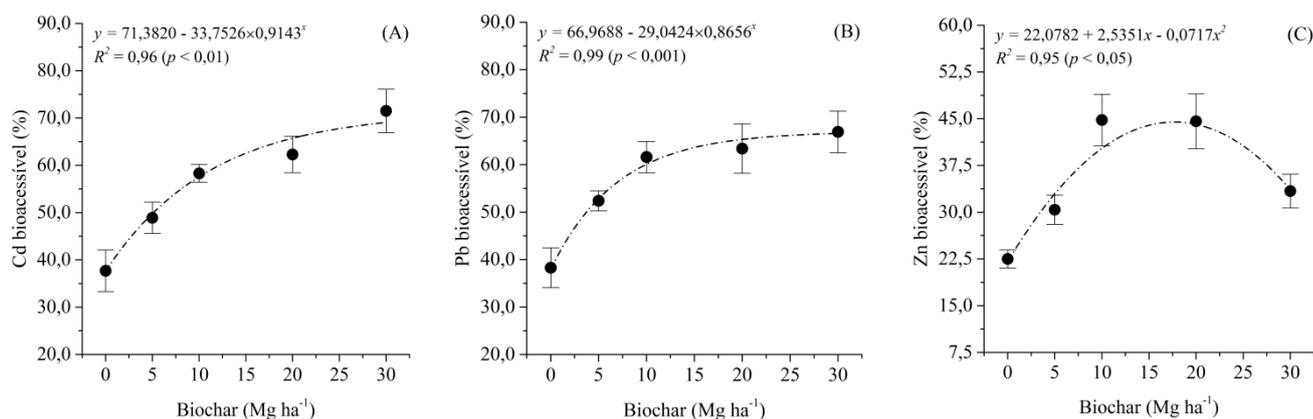


Figura 3. Percentuais médios (\pm desvio padrão) das frações bioacessíveis de Cd, Pb e Zn no solo submetido a doses de biochar e cultivados com milho por 45 dias. $p < 0,05$ significativo a 5 % de probabilidade pela ANOVA; $p < 0,01$ significativo a 1% de probabilidade pela ANOVA; $p < 0,001$ significativo a 0,1% de probabilidade pela ANOVA.

4.2 Imagens de Microscopia eletrônica (MEV) e espectroscopia de raio-X por dispersão energia (EDS)

O uso de MEV em amostras de biochar pode esclarecer algumas dúvidas sobre as propriedades deste composto. Questões como distribuição e quantidade de poros podem ser facilmente visualizados (Figura 1). Com o aumento da temperatura, há uma profunda alteração nas estruturas do biochar. Estruturas lisas e cristalinas, ao passarem por aquecimento, perdem compostos orgânicos e há volatilização de outros compostos. Este processo permite o surgimento dos poros no biochar (AHMAD et al., 2018). Com o auxílio do EDS, também pode-se observar a predominância de certos

elementos (Figura 4), especialmente C, O e Si. Estes teores são bem característicos de biochar de arroz, estas proporções também foram relatadas por Houben, Sonnet e Cornelis (2014).

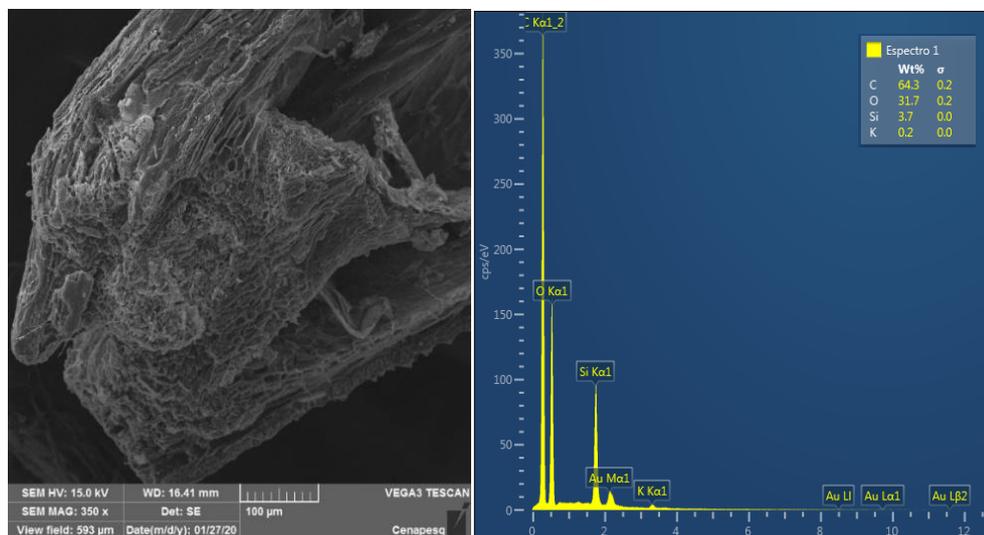


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da área visualizada. Amostra de biochar de palha de arroz, obtido por pirólise a 400°C.

4.3 Produção de biomassa e resposta fisiológicas do milho cultivado em solo poluído por Cd, Pb e Zn e submetidos a doses de biochar (PA 400°C)

4.3.1 Produção da biomassa seca da parte aérea e raízes

A matéria seca das plantas de milho, tanto da raiz quanto da parte aérea, foi incrementada pela adição de doses de biochar ao solo contaminado, sendo o maior ganho de massa na maior dose de biochar aplicada, ou seja, 30 t ha⁻¹. Observou-se, portanto, um aumento aproximado de 17% na matéria seca da parte aérea em relação ao tratamento controle e de 23% da matéria seca das raízes. Os resultados estão de acordo com a literatura (AHMAD et al., 2018; RAJKOVICH et al., 2012; UZOMA et al., 2011) onde outros autores também observaram acréscimo na produção de biomassa de plantas de milho conforme cresciam as doses de biochar (Figura 5).

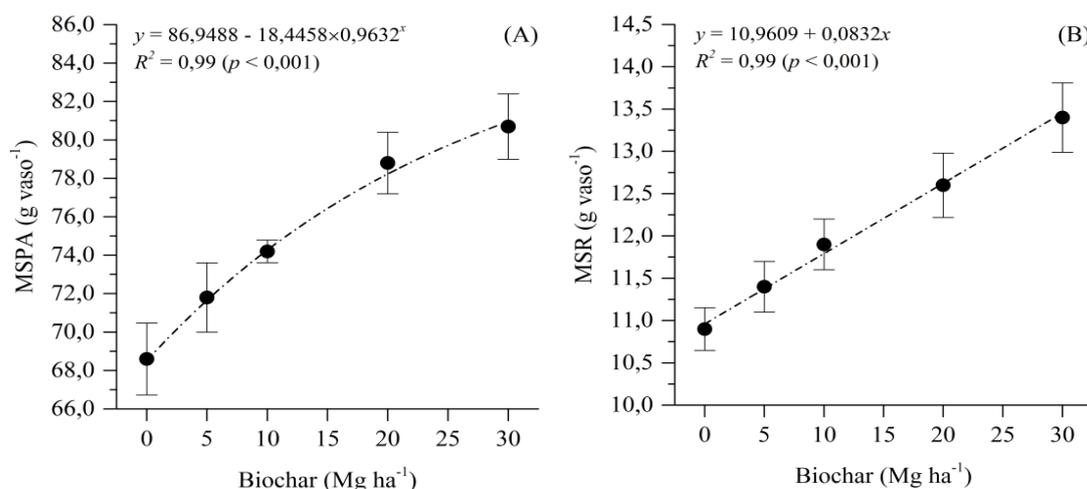


Figura 5. Produção média (\pm desvio padrão) da matéria seca da parte aérea (A) e da raiz (B) de plantas de milho cultivadas no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados por 45 dias. $p < 0,001$ significativo a 0,1% de probabilidade pela ANOVA. MSPA matéria seca da parte aérea, MSR matéria seca das raízes

Esse resultado positivo na produção de biomassa deve-se, em parte, a redução na acumulação e consequente efeito tóxico dos metais, especialmente Cd e Pb, na parte aérea e raízes das plantas de milho.

4.3.2 Parâmetros fisiológicos e fluorescência da clorofila

Os teores de clorofila foram influenciados positivamente pela aplicação de biochar, apresentando diferença significativa entre as doses aplicadas. Entre o tratamento controle e a maior dose de biochar (30 t ha⁻¹), percebeu-se um aumento de 81% no teor de clorofila *a*, de 57 % para a clorofila *b* e 43% em relação aos teores de carotenoides (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do biochar na fisiologia de plantas de milho cultivadas no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb

Biochar (Mg ha ⁻¹)	Clorofila A mg g ⁻¹ PF	Clorofila B mg g ⁻¹ PF	Carotenoide total mg g ⁻¹ PF	Taxa fotossintética $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Taxa transpiração $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Condutância estomática $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
0,0	0,68 \pm 0,06 ^a	0,49 \pm 0,06 ^a	0,71 \pm 0,06 ^a	26,0 \pm 1,0 ^a	6,7 \pm 0,4 ^a	245,2 \pm 7,7 ^a
5,0	1,00 \pm 0,05 ^b	0,62 \pm 0,05 ^b	0,90 \pm 0,03 ^b	34,8 \pm 1,4 ^b	8,1 \pm 0,5 ^b	272,6 \pm 15,2 ^b
10,0	1,12 \pm 0,04 ^c	0,72 \pm 0,04 ^c	0,94 \pm 0,08 ^b	36,5 \pm 2,3 ^b	8,9 \pm 0,4 ^{bc}	296,5 \pm 8,1 ^{bc}
20,0	1,16 \pm 0,05 ^{cd}	0,73 \pm 0,02 ^c	1,00 \pm 0,02 ^b	40,8 \pm 0,6 ^c	9,9 \pm 0,5 ^c	317,5 \pm 6,3 ^c
30,0	1,22 \pm 0,01 ^d	0,77 \pm 0,01 ^c	1,02 \pm 0,06 ^b	46,2 \pm 1,4 ^d	11,7 \pm 0,6 ^d	404,3 \pm 10,9 ^d

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); os valores são a média \pm desvio padrão ($n = 4$); PF = peso fresco.

Estudos relatam o papel negativo da presença do Cd nas membranas dos tilacoides (KRANTEV et al., 2008; PÁL et al., 2006). Sendo assim, com a diminuição dos teores de Cd presentes nas células, há menores danos às membranas dos tilacoides, resultando em maiores teores de clorofila e melhores performances do aparato fotossintético. (VACULÍK; PAVLOVIČ; LUX, 2015)

No caso do Pb, ainda não há um pleno esclarecimento sobre como sua presença afeta o processo fotossintético a nível molecular, mas sabe-se da alta suscetibilidade do aparato fotossintético à presença deste metal. Outros resultados semelhantes (YOUNIS et al., 2015) sugerem que o aumento dos níveis de pigmentos fotossintéticos se deu por uma maior quantidade de N na parte aérea de espinafre. Por sua vez, Bertoli et al. (2012) indicaram que existem redução de K, Ca e Mn na parte aérea e K nos frutos das plantas submetidas ao estresse por cádmio. O fato é que plantas bem nutridas apresentam teores normais de pigmentos fotossintéticos (ZHAO et al., 2018). Além disso, devido à grande similaridade com outros cátions divalentes, como Mn, Fe e Mg, o Zn compete com sítios de reação, causando um desequilíbrio inclusive na molécula de clorofila, implicando diretamente na capacidade fitossintética das plantas (MARQUES; NASCIMENTO, 2014).

A aplicação de biochar resultou em efeito positivo sobre os parâmetros de taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática. Todas estas variáveis tiveram acréscimo em suas taxas, indicando uma melhor performance do aparato fotossintético. Resultados semelhantes (ABBAS et al., 2017; REHMAN et al., 2017, 2016; RIZWAN et al., 2016) também sugerem que, com a adição de biochar, há uma diminuição dos teores de metais nas plantas, diminuindo os danos causados por estes às membranas dos tilacoides. Com os danos menores, há maior eficiência nos parâmetros de fotossíntese.

Por sua vez, os parâmetros de fluorescência, se comportam de forma inversa dos demais atributos fotossintéticos analisados neste trabalho (Figura 6). Quanto maior a fluorescência, mais energia está sendo perdida no fotossistema II, uma vez que a fluorescência é uma estratégia da planta de impedir mais danos ao fotossistema, geralmente causados por espécies reativas de oxigênio, já danificado por algum tipo de estresse. No caso da presença de metais pesados, um efeito conhecido é a substituição de nutrientes por metais, como ocorre com a substituição de Fe e Mn por Cd ou Zn (MARQUES et al., 2017; WANG et al., 2009).

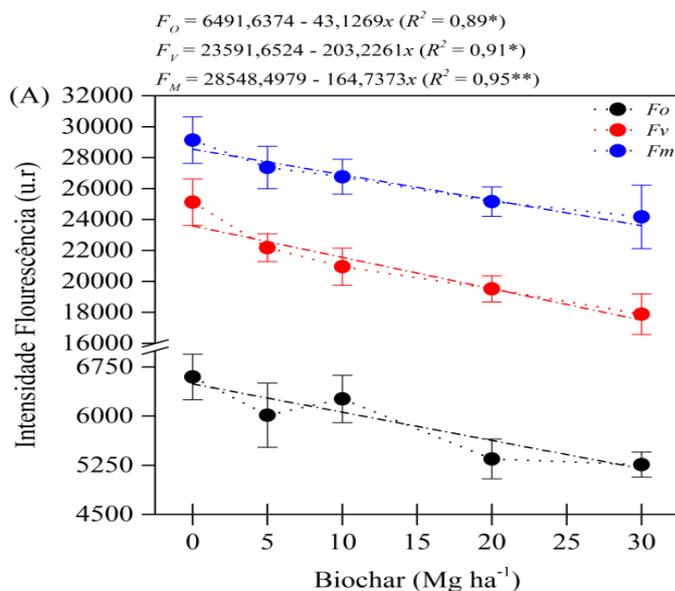


Figura 6. Curvas de indução da fluorescência da em plantas de milho cultivadas no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados por 45 dias. *significativo a 5% de probabilidade pela ANOVA; **significativo a 1% de probabilidade pela ANOVA; F_o fluorescência inicial, F_v fluorescência variável e F_M fluorescência máxima.

4.4 Teores de Cd, Pb e Zn e nutrição mineral de plantas do milho cultivado em solo poluído e submetidos a doses de biochar (PA 400°C)

Os teores médios de Cd, Pb e Zn na parte aérea e raiz também se correlacionaram com a disponibilidade dos metais no solo (Figura 7 A – F). Com a diminuição da disponibilidade causada pelo biochar, as plantas tiveram melhor desempenho em seus processos fisiológicos, como produção de matéria seca e eficiência fotossintética (MU et al., 2019). A remoção (Figura 7 G - I) corrobora os resultados encontrados por (HOUBEN; EVRARD; SONNET, 2013a, 2013b), onde também houve menor remoção dos metais estudados.

Houve resultados positivos na avaliação da nutrição mineral das plantas, conforme observa-se nas figuras da normalização (Figura 8 A – E), e teores médios de macro e micronutrientes (Figura 8 F – N). Nos gráficos de normalização, observou-se teores deficientes apenas de N. Este comportamento se justifica pela alta exigência deste elemento – a maior dentre os macronutrientes – e seus baixos teores no biochar, já que ocorre intensa volatilização deste elemento durante o processo de pirólise (RAJKOVICH et al., 2012). Em relação aos demais macronutrientes, os teores já estavam ideais para a cultura, no entanto, também houve um aumento, sendo o ponto

mais importante o crescimento mais homogêneo dos raios do fertigrama, o que indica uma nutrição mais balanceada e desenvolvimento mais adequado da planta; deve-se observar que o desbalanço nutricional também é indicativo de toxidez por metais pesados (NASCIMENTO; FONTES; NEVES, 1998). Este fato pode ser comprovado pela melhoria da performance do aparato fotossintético (Tabela 3) e aumento na produção de matéria seca (Figura 2).

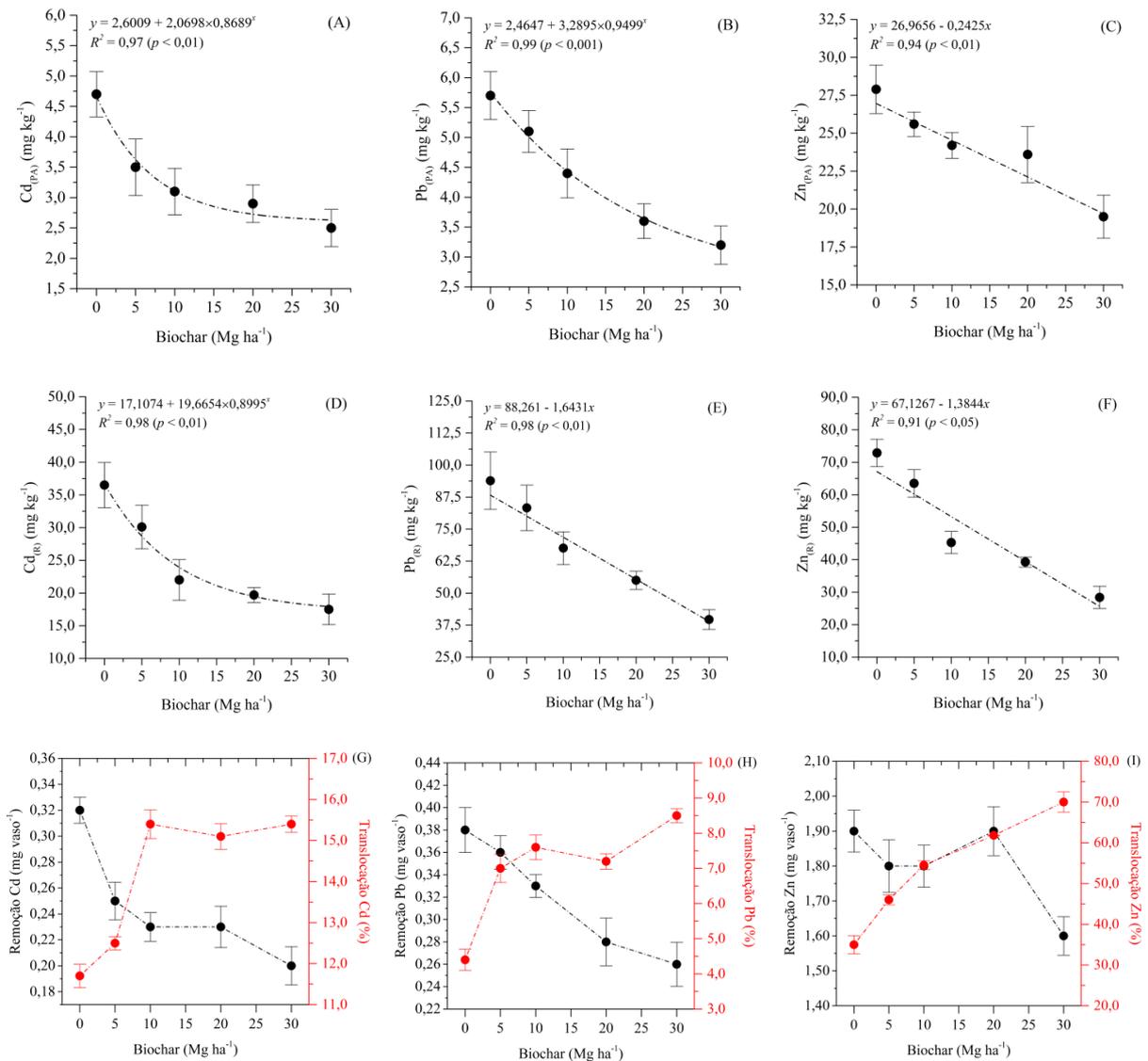


Figura 7. Teores médios (\pm desvio padrão) de Cd, Pb e Zn na parte aérea e raízes (A – F); remoção líquida e percentual de translocação de Cd, Pb e Zn para a parte aérea (G – I) de plantas de milho cultivadas no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados por 45 dias. $p < 0,05$ significativo a 5% de probabilidade pela ANOVA; $p < 0,01$ significativo a 1% de probabilidade pela ANOVA; $p < 0,001$ significativo a 0,1% de probabilidade pela ANOVA. PA parte aérea e R raiz

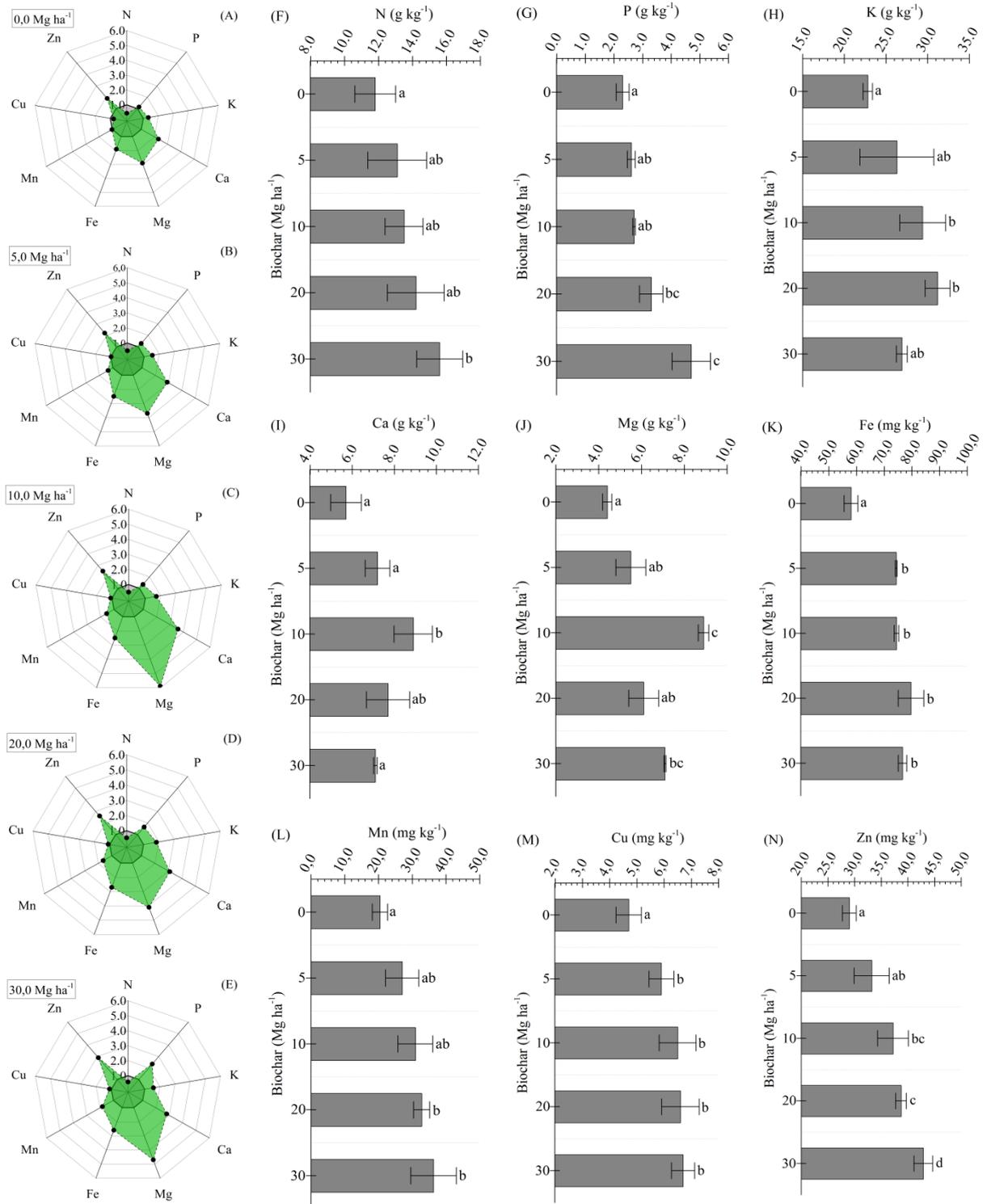


Figura 8. Fertigramas dos macro e dos micronutrientes normalizados com os teores considerados adequados (e.g. $N_{amostra}/N_{adequado}$) (A – E); e teores médios (\pm desvio padrão) dos nutrientes (F – N) da parte aérea de plantas de milho cultivadas no solo poluído por metais pesados decorrente do aporte do rejeito das atividades de uma antiga metalurgia de Pb que foi submetido a doses de biochar e cultivados por 45 dias. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Teores adequados para o milho foram 27,0; 2,0; 17,0; 2,5 e 1,5 g kg⁻¹ para N, P, K, Ca, Mg e 30,0; 20,0; 6,0 e 15,0 mg kg⁻¹ para Fe, Mn, Cu e Zn, respectivamente (Boaretto et al. 2009)

5 CONCLUSÕES

O biochar pode ser indicado como amenizante de metais pesados em programas de fitoatenuação ou fitoestabilização no solo cocontaminado de Santo Amaro, uma vez que promoveu diminuição da mobilidade e disponibilidade de metais no solo, com melhoria na produção de matéria seca e nos atributos fotossintéticos de plantas de milho. A resposta linear para produção de matéria seca, teores de metais ambientalmente disponíveis e teores disponíveis sugere que doses mais elevadas de biochar do que as testadas aqui podem aumentar a retenção de metais no solo. que não se atingiu a dose máxima de biochar.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; RIZWAN, M.; ALI, S.; ZIA-UR-REHMAN, M.; FAROOQ QAYYUM, M.; ABBAS, F.; HANNAN, F.; RINKLEBE, J.; SIK OK, Y. Effect of biochar on cadmium bioavailability and uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in a soil with aged contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 37–47, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.028.
- AHMAD, M.; USMAN, A. R. A.; AL-FARAJ, A. S.; AHMAD, M.; SALLAM, A.; AL-WABEL, M. I. Phosphorus-loaded biochar changes soil heavy metals availability and uptake potential of maize (*Zea mays* L.) plants. **Chemosphere**, v. 194, p. 327–339, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.156.
- ALMEIDA, B. G. **Métodos alternativos de determinação de parâmetros físicos do solo e uso de condicionadores químicos no estudo da qualidade do solo**. 2008. 108 p. Tese de Doutorado. Solos e Nutrição de Plantas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ALVES, J.C.; SOUZA, A. P. De; PÔRTO, M. L. A.; FONTES, R. L. F.; ARRUDA, J.; MARQUES, L. F. Potential of sunflower, castor bean, common buckwheat and vetiver as lead phytoaccumulators. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2016. DOI: doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n3p243-249.
- ANDRADE, M. F.; MORAES, L. R. S. Contaminação por chumbo em Santo Amaro desafia décadas de pesquisas e a morosidade do poder público. **Ambiente & Sociedade**, v. 16, n. 2, p. 63-80, 2013. DOI: 10.1590/s1414-753x2013000200005.
- BASHIR, S.; HUSSAIN, Q.; SHAABAN, M.; HU, H. Efficiency and surface characterization of different plant derived biochar for cadmium (Cd) mobility, bioaccessibility and bioavailability to Chinese cabbage in highly contaminated soil. **Chemosphere**, v. 211, p. 632–639, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.168.
- BERTOLI, A. C.; CANNATA, M. G.; CARVALHO, R.; BASTOS, A. R. R.; FREITAS, M. P.; AUGUSTO, A. D. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 176-181, 2012. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.011.
- BIAN, R.; CHEN, D.; LIU, X.; CUI, L.; LI, L.; PAN, G.; XIE, D.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; CHANG, A. Biochar soil amendment as a solution to prevent Cd-tainted rice from China: Results from a cross-site field experiment. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 378–383, 2013. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2013.07.031.
- CHAO, T. T.; ZHOU, L. Extraction Techniques for Selective Dissolution of Amorphous Iron Oxides from Soils and Sediments. **Soil Science Society of America Journal**, v. 47, n. 2, p. 225–232, 1983. DOI: 10.2136/sssaj1983.03615995004700020010x.
- CHENG, J.; LI, Y.; GAO, W.; CHEN, Y.; PAN, W.; LEE, X.; TANG, Y. Effects of biochar on Cd and Pb mobility and microbial community composition in a calcareous soil planted with tobacco. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, p. 373-383, 2018. DOI: 10.1007/s00374-018-1267-8.
- COUTINHO, P. W. R.; CADORIN, D. A.; NORETO, L. M.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C. Alternative soil remediation: bioremediation and phytoremediation. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 59–68, 2015. DOI: 10.3738/1982.2278.1400.
- DONALDSON, R.; LORD, R. Can brownfield land be reused for ground source heating to alleviate fuel poverty? **Renewable Energy**, 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2017.09.037.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo 3ª edição revista e ampliada**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 574 p.

ESTÉVEZ ALVAREZ, J. R.; MONTERO, A. A.; JIMÉNEZ, N. H.; MUÑIZ, U. O.; PADILLA, A. R.; MOLINA, R. J.; VERA, S. Q. Nuclear and related analytical methods applied to the determination of Cr, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in a red ferralitic soil and Sorghum samples. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 247, p. 479-486, 2001. DOI: 10.1023/A:1010640009301.

FELLET, G.; MARMIROLI, M.; MARCHIOL, L. Elements uptake by metal accumulator species grown on mine tailings amended with three types of biochar. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 598-608, 2014. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.072.

FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 6, p. 823-857, 2002. DOI: 10.1039/b207574c.

GABOS, M. B.; CASAGRANDE, G.; ABREU, C. A.; PAZ-FERREIRO, J. Uso da matéria orgânica como mitigadora de solo multicontaminado e do girassol como fitoextratora. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1298-1306, 2011. DOI: 10.1590/s1415-43662011001200012.

HERNÁNDEZ-SORIANO, M. D. C.; PEÑA, A.; MINGORANCE, M. D. Environmental hazard of cadmium, copper, lead and zinc in metal-contaminated soils remediated by sulfosuccinamate formulation. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 10, p. 2830-2837, 2011. DOI: 10.1039/c1em10223k.

HOUBEN, D.; EVRARD, L.; SONNET, P. Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar. **Chemosphere**, v. 92, n. 11, p. 1450–1457, 2013. a. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.055.

HOUBEN, D.; EVRARD, L.; SONNET, P. Beneficial effects of biochar application to contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Biomass and Bioenergy**, v. 57, p. 196–204, 2013. b. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.07.019.

HOUBEN, D.; SONNET, P.; CORNELIS, J. T. Biochar from *Miscanthus*: A potential silicon fertilizer. **Plant and Soil**, v. 374, n. 1-2, p. 871-882, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1885-8.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th. ed. Boca Raton. DOI: 10.1201/b10158.

KRANTEV, A.; YORDANOVA, R.; JANDA, T.; SZALAI, G.; POPOVA, L.. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 9, p. 920–931, 2008. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.11.014.

LI, H.; DONG, X.; SILVA, E. B.; OLIVEIRA, L. M.; CHEN, Y.; MA, L. Q. Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. **Chemosphere**, v. 178, p. 466-478, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.072.

LI, X.; THORNTON, I. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 15, p. 1693–1706, 2001. DOI: 10.1016/S0883-2927(01)00065-8.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01.

LIMA, L. R. P. A.; BERNARDEZ, L. A. Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, n. 3, p. 692-699, 2011. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.02.091.

LIMASSET, E.; PIZZOL, L.; MERLY, C.; GATCHETT, A. M.; LE GUERN, C.; MARTINÁT, S.; KLUSÁČEK, P.; BARTKE, S. Points of attention in designing tools for regional brownfield prioritization. **Science of the Total Environment**, v. 622, p. 997-1008, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.168.

LINDSAY, W. L.; NORVELL, W. A. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. **Soil Science Society of America Journal**, v. 42, n. 3, p. 421-428, 1978. DOI: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x.

LIU, J.; CAI, H.; MEI, C.; WANG, M. Effects of nano-silicon and common silicon on lead uptake and translocation in two rice cultivars. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 9, n. 5, p. 905–911, 2015. DOI: 10.1007/s11783-015-0786-x.

LOPES, G.; COSTA, E. T. S.; PENIDO, E. S.; SPARKS, D. L.; GUILHERME, L. R. G. Binding intensity and metal partitioning in soils affected by mining and smelting activities in Minas Gerais, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p. 13442–13452, 2015. DOI: 10.1007/s11356-015-4613-5.

LU, K.; YANG, X.; SHEN, J.; ROBINSON, B.; HUANG, H.; LIU, D.; BOLAN, N.; PEI, J.; WANG, H. Effect of bamboo and rice straw biochars on the bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn to *Sedum plumbizincicola*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 191, p. 124–132, 2014. DOI: 10.1016/j.agee.2014.04.010.

MACHADO, S.; RABELO, T. S.; PORTELLA, R. B.; CARVALHO, M. F.; MAGNA, G. A. M. A study of the routes of contamination by lead and cadmium in Santo Amaro, Brazil. **Environmental Technology**, v. 34, n. 5, p. 559-571, 2013. DOI: 10.1080/09593330.2012.692717.

MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A. Tolerância de mamona a zinco avaliada por fluorescência de clorofila e nutrição das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 3, p. 850-857, 2014. DOI: 10.1590/S0100-06832014000300016.

MARQUES, M. C.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, A. J.; DA SILVA GOUVEIA-NETO, A. Tolerance of an energy crop (*Jatropha curcas* L.) to zinc and lead assessed by chlorophyll fluorescence and enzyme activity. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 275-282, 2017. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.06.009.

MEERS, E.; VAN SLYCKEN, S.; ADRIAENSEN, K.; RUTTENS, A.; VANGRONSVELD, J.; DU LAING, G.; WITTERS, N.; THEWYS, T.; TACK, F. M. G. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment. **Chemosphere**, v. 78, n. 1, p. 35–41, 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.015.

MIRANDA, N. O.; PIMENTA, A. S.; SILVA, G. G. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; CARVALHO, M. A. B. BIOCHAR AS SOIL CONDITIONER IN THE SUCCESSION OF UPLAND RICE AND COWPEA FERTILIZED WITH NITROGEN. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 313–323, 2017. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n206rc.

MU, J.; HU, Z.; HUANG, L.; TANG, S.; HOLM, P. E. Influence of alkaline silicon-based amendment and incorporated with biochar on the growth and heavy metal translocation and accumulation of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) grown in multi-metal-contaminated soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 5, p. 2277–2289, 2019. DOI: 10.1007/s11368-018-2219-5.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R. L. F.; NEVES, J. C. L. Mineral composition of two Brazilian corn cultivars as a function of cadmium in the nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 11, p. 2369–2379, 1998. DOI: 10.1080/01904169809365570.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R. L. F.; NEVES, J. C. L.; MELÍCIO, A. C. F. D. Fracionamento, dessorção e extração química de zinco em latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 599-606, 2002. DOI: 10.1590/s0100-06832002000300004.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 299–311, 2006. DOI: 10.1590/S0103-90162006000300014.

NEEDLEMAN, H. L.; HOUK, V. N.; BILLICK, I. H.; BOUCHART, E.; CHADZYNSKI, L. Preventing lead poisoning in young children; a statement by the Center for Disease Control. **The Journal of Pediatrics**, v. 93, n. 4, p. 709-720, 1979. DOI: 10.1016/s0361-1124(79)80278-6.

OSORIO, A. E.; CORRADINI, M. G.; WILLIAMS, J. D. Remediating food deserts, food swamps, and food brownfields: helping the poor access nutritious, safe, and affordable food. **AMS Review**, v. 3, n. 4, p. 217-231, 2013. DOI: 10.1007/s13162-013-0049-6.

PÁL, M.; HORVÁTH, E.; JANDA, T.; PÁLDI, E.; SZALAI, G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, n. 2, p. 239–246, 2006. DOI: 10.1002/jpln.200520573.

PARK, J. H.; CHOPPALA, G. K.; BOLAN, N. S.; CHUNG, J. W.; CHUASAVATHI, T. Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. **Plant and Soil**, v. 348, n. 1–2, p. 439–451, 2011. DOI: 10.1007/s11104-011-0948-y.

PIERZYNSKI, G. M.; VANCE, G. F.; SIMS, J. T. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p.473. DOI: 10.1016/s0016-7061(01)00135-5.

PUGA, A. P.; ABREU, C. A.; MELO, L. C. A.; BEESLEY, L. Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. **Journal of Environmental Management**, v. 159, p. 86-93, 2015. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.05.036.

RAJKOVICH, S.; ENDERS, A.; HANLEY, K.; HYLAND, C.; ZIMMERMAN, A. R.; LEHMANN, J. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 3, p. 271–284, 2012. DOI: 10.1007/s00374-011-0624-7.

REHMAN, M. Z.; KHALID, H.; AKMAL, F.; ALI, S.; RIZWAN, M.; QAYYUM, M. F.; IQBAL, M.; KHALID, M. U.; AZHAR, M. Effect of limestone, lignite and biochar applied alone and combined on cadmium uptake in wheat and rice under rotation in an effluent irrigated field. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 560–568, 2017. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.05.003.

REHMAN, M. Z. U.; RIZWAN, M.; ALI, S.; FATIMA, N.; YOUSAF, B.; NAEEM, A.; SABIR, M.; AHMAD, H. R.; OK, Y. S. Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 133, p. 218–225, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.023.

RIZWAN, M.; ALI, S.; ADREES, M.; RIZVI, H.; ZIA-UR-REHMAN, M.; HANNAN, F.; QAYYUM, M. F.; HAFEEZ, F.; OK, Y. S. Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 17859–17879, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6436-4.

- RODRÍGUEZ, L.; RUIZ, E.; ALONSO-AZCÁRATE, J.; RINCÓN, J. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb-Zn mine in Spain. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 2, p. 1106-1116, 2009. DOI: 10.1016/j.jenvman.2008.04.007.
- RUBY, M. V.; DAVIS, A.; SCHOOF, R.; EBERLE, S.; SELLSTONE, C. M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 422-430, 1996. DOI: 10.1021/es950057z.
- SANTOS, N. M.; ACCIOLY, A. M. A.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, I. R.; SANTOS, J. A. G. Biodisponibilidade de chumbo por extratores químicos em solo tratado com ácidos húmicos e carvão ativado. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 46, n. 4, p. 663-668, 2015. DOI: 10.5935/1806-6690.20150052.
- SHUMAN, L. M. Fractionation method for soil microelements. **Soil Science**, v. 140, n. 1, p. 11-22, 1985. DOI: 10.1097/00010694-198507000-00003.
- SILVA, A. C.; TORRADO, P. V.; ABREU JUNIOR, J. S. Métodos de quantificação da matéria orgânica do solo. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, n. 1, p. 21-26, 1999.
- SILVA, W. R. ; SILVA, F. B. V.; ARAÚJO, P. R. M.; NASCIMENTO, C. W. A. Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 522-530, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.068.
- SILVANY-NETO, A. M.; CARVALHO, F. M.; CHAVES, M. E. C.; BRANDÃO, A. M.; TAVARES, T. M. Repeated surveillance of lead poisoning among children. **Science of the Total Environment**, v. 78, p. 179-186, 1989. DOI: 10.1016/0048-9697(89)90032-6.
- SINGH, B.; CAMPS-ARBESTAIN, M.; LEHMANN, J.; CSIRO (AUSTRALIA). Biochar: A Guide to Analytical Methods. New York: **Csiro publishing**, p. 9-109, 2017.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. **Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation**, p. 445-483, 2000.
- TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 653-659, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.035.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Ufrgs:Porto Alegre, 1995. v. 174
- USEPA, (United States Environmental Protection Agency). **METHOD 3051A: MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS**. 2007. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2019.
- UZOMA, K. C.; INOUE, M.; ANDRY, H.; FUJIMAKI, H.; ZAHOOR, A.; NISHIHARA, E. Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. **Soil Use and Management**, v. 27, n. 2, p. 205-212, 2011. DOI: 10.1111/j.1475-2743.2011.00340.x.
- VACULÍK, M.; PAVLOVIČ, A.; LUX, A. Silicon alleviates cadmium toxicity by enhanced photosynthetic rate and modified bundle sheath's cell chloroplasts ultrastructure in maize. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 66-73, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.05.026.

WANG, H.; ZHAO, S. C.; LIU, R. L.; ZHOU, W.; JIN, J. Y. Changes of photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress.

Photosynthetica, v. 47, n. 2, 2009. DOI: 10.1007/s11099-009-0043-2.

XU, D.; ZAO, Y.; SUN, K.; SUN, K.; GAO, B.; WANG, Z.; JIN, J.; ZHANG, Z.; WANG, S.; YAN, Y.; LIU, X.; WU, F. Cadmium adsorption on plant-and manure-derived biochar and biochar-amended sandy soils: impact of bulk and surface properties. **Chemosphere**, v. 111, p. 320–326, 2014. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.043.

YIN, D.; WANG, X.; CHEN, C.; PENG, B.; TAN, C.; LI, H. Varying effect of biochar on Cd, Pb and As mobility in a multi-metal contaminated paddy soil. **Chemosphere**, v. 152, p. 196–206, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.044.

YOUNIS, U.; QAYYUM, M. F.; SHAH, M. H. R.; DANISH, S.; SHAHZAD, A. N.; MALIK, S. A.; MAHMOOD, S. Growth, survival, and heavy metal (Cd and Ni) uptake of spinach (*Spinacia oleracea*) and fenugreek (*Trigonella corniculata*) in a biochar-amended sewage-irrigated contaminated soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, n. 2, p. 209–217, 2015. DOI: 10.1002/jpln.201400325.

ZHAO, B.; KARIM, S. T. A. U.; LIU, Z.; ZHANG, J.; XIAO, J.; LIU, Z.; QIN, A.; NING, D.; YANG, Q.; ZHANG, Y.; DUAN, A. Simple Assessment of Nitrogen Nutrition Index in Summer Maize by Using Chlorophyll Meter Readings. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 11, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.00011.