

Caracterização espectral de *Brachiaria brizantha* cultivada em solo contaminado por hidrocarbonetos como instrumento de detecção de vazamentos em dutos

Giuliana Clarice Mercuri Quitério¹

Teodoro Isnard Ribeiro de Almeida²

Carlos Roberto de Souza Filho¹

¹ Universidade Estadual de Campinas - IG/UNICAMP
Caixa Postal 6152 – 13083-970 - Campinas – SP, Brasil
{giuliana, beto} @ige.unicamp.br

² Universidade de São Paulo – IGc/USP
Rua do Lago, 562 – 05508-080 - São Paulo - SP
talmeida@usp.br

Abstract. This work aims to develop a hydrocarbon (HC) pipeline monitoring technique that is efficient, practical, economical and capable to detect small leakages precociously, which are barely discernible by current practices, and before they impact the environment evidently. The proposed method comprises the indication of a plant susceptible of being monitored through remote sensing and that responds to HCs leaks with distinguishing spectral features. The research comprised the crop growing of a type of grass namely *Brachiaria brizantha* considering an experiment that reproduces, at reduced scales, the soil-vegetation system through which pipelines bypass. This allowed the analysis of the physiologic responses of the plant and its relation to soil contamination by gasoline and diesel, besides the assessment of key spectral indicators of the presence of HCs in the environment. The work highlights the realistic possibility to determine low HC content on soils based on vegetation spectral changes, demonstrating that the cultivation of such grass species over pipelines may be a reliable approach to monitor and detect small HC leakages. *Brachiaria brizantha* submitted to both gasoline and diesel contamination yielded spectral responses on the visible that are akin to early work, including intense degradation of the chlorophyll and maintenance of the carotenoids. Such spectral patterns were verified against and matched with analytical results of redundant samples. The spectral response of the contaminated plants in the shortwave infrared region, however, proved most enlightening and yet unprecedented in modern literature. Not only was the loss of plant water due to the presence of HCs pinpointed spectrally, but also new features were revealed that are dissociated from the visible, natural plant phenological evolution.

Palavras-chave: biomarkers, reflectance spectroscopy, stress, leaks, pipeline, biomarcadores, espectroscopia de reflectância, estresse, vazamento, dutos.

1. Introdução

Os métodos adotados pela indústria do petróleo no monitoramento de vazamentos de hidrocarbonetos (HCs) nos dutos de transporte não são eficientes para detectar vazamentos precoces e de baixa vazão, pois são baseados na queda de pressão. Além disso, as faixas de dutos de transporte são mantidas de forma heterogênea, com grande diversidade de vegetação sobre as mesmas. Assim, a perda de recursos, graves contaminações de solos e aquíferos superficiais podem ocorrer ao longo de meses e anos sem serem detectados.

A cobertura vegetal é sensível à toxidez do solo por hidrocarbonetos e compostos associados. Tais alterações comumente são marcadas por uma ou mais das seguintes feições: (i) ausência de vegetação (principalmente a fotossinteticamente ativa); (ii) variações na densidade da flora; (iii) presença de plantas indicadoras, (iv) variações na arquitetura do dossel; e (v) mudanças morfológicas nas espécies. Esses efeitos, somados ou não, influenciam na resposta espectral da vegetação, principalmente no que se refere àquela relacionada ao pigmento clorofila (com manifestações na região do visível), à estrutura celular (com manifestações na região do

infravermelho próximo) e à quantidade de água na planta (com manifestações na região do infravermelho de ondas curtas) (Souza Filho *et al.*, 2008, Noomen *et al.* 2003). Essas características podem alterar localmente a morfologia de uma comunidade de plantas em relação ao *background* regional, sendo, portanto, passíveis de detecção remota.

Os numerosos estudos referentes às alterações de reflectância de vegetação submetida a estresses, de origem natural ou não, focam principalmente a área do visível, sendo as outras faixas do espectro, particularmente a região do infravermelho de ondas curtas, ainda pouco explorada quanto às alterações fisiológicas e espectrais da cobertura vegetal.

Em estudos relacionados especificamente com hidrocarbonetos não é diferente. A reflectância no SWIR é pouco abordada, em que pese ser a reflectância de coberturas vegetais extremamente dependentes da quantidade de água foliar na região de 1.600 a 1.700nm. Já eventuais alterações de reflectância na região de 2.100 a 2.500nm, onde se localizam as feições espectrais relacionadas com os compostos bioquímicos, tais como celulose, lignina, proteínas, carboidratos, amidos, e outros, simplesmente não parecem ter sido abordadas, salvo em Rosso *et al.* (2005).

A proposta metodológica aqui apresentada baseou-se em biomarcadores monitorados por sensores remotos. Neste contexto, e com o objetivo final de estabelecer modelos de detecção de vazamentos reais a partir de métodos de sensoriamento remoto, um experimento em lisímetros de pequena escala foi desenvolvido em ambiente semi-controlado, visando a caracterização *in situ* das alterações no sistema solo-vegetação, controladamente contaminados por gasolina e diesel. Em seu desenvolvimento, procurou-se eliminar diversas variáveis ambientais de forma a permitir o reconhecimento das alterações significativas na vegetação relacionadas à presença de hidrocarbonetos.

Medições espectrais foram realizadas periodicamente no intervalo de 350 a 2500nm (VIS-NIR-SWIR), além das medidas de altura, massa da matéria seca da parte aérea e análise bioquímica das folhas quanto aos compostos: clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides, amido e celulose. Com base nos dados obtidos no experimento, são sugeridos parâmetros passíveis de serem utilizados no monitoramento de polídutos em larga escala, permitindo a identificação precoce de vazamentos de HCs, evitando perda de recursos e, sobretudo, minimizando eventuais riscos de impactos ambientais, conjugando praticidade, economia e rapidez nas análises.

2. Material e métodos

2.1 O experimento

O experimento foi instalado em condições semi-controladas dentro de viveiro telado com cobertura plástica no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, localizado em Paulínia, Estado de São Paulo. A semeadura foi feita no dia 03 de Outubro de 2006 e a colheita final no dia 21 de Maio de 2007.

Como planta indicadora, foi escolhida a gramínea *Brachiaria brizantha* (braquiária), uma planta robusta, de fácil manejo, rápido desenvolvimento e boa tolerância à seca. O substrato empregado é um latossolo vermelho eutroférico, bem representativo dos solos do Estado de São Paulo, coletado no próprio campo experimental.

O delineamento experimental inteiramente casualizado (Figuras 1a e 1b) é formado por 30 lisímetros construídos em vidro, nas dimensões de 30 x 40 x 15 cm, sendo três de suas faces revestidas com Contact® preto a fim de não prejudicar o desenvolvimento radicular da planta. A face frontal foi totalmente recoberta por um retângulo de etileno-acetato de vinila (E.V.A.) fixado de forma que possa ser removido periodicamente para visualização do crescimento radicular e da

percolação do hidrocarboneto no solo. Os lisímetros foram fixados sobre uma base de madeira com 15° de inclinação, para que as raízes crescessem em direção ao vidro.

Como tubo de alimentação de HCs foram inseridas três mangueiras próprias para gasolina a cada 10 cm de altura, com 20 furos alternados para o escape do HC empregado. A bomba injetora é própria para combustíveis, tem capacidade de injetar 50 mL a cada bombeada e se adapta perfeitamente à mangueira de vazamento.

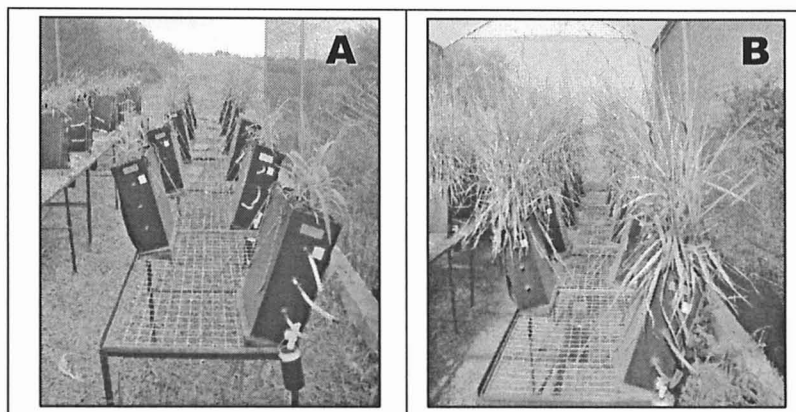


Figura 1 – (A) experimento em fase inicial; (B) experimento em fase final.

Os HCs empregados foram gasolina e diesel, totalizando 3 tratamentos: plantas que receberam gasolina (GSL), plantas que receberam diesel (DSL) e as de controle, que não receberam hidrocarboneto (CTR), permitindo acompanhar o desenvolvimento natural das plantas.

Os vazamentos tiveram início simultâneo à semeadura podendo-se observar sua influência desde a germinação. No total foram 11 vazamentos de 50mL efetuados periodicamente e 11 leituras espectrais, sendo sete delas utilizadas para traçar um diagnóstico do que ocorre fisiologicamente e espectralmente em plantas que se desenvolvem sob esse tipo de estresse.

Como o objetivo é reconhecer pequenos vazamentos de HCs, a quantidade que foi injetada baseou-se na capacidade de campo (CC) dos lisímetros (quantidade de água retida pelo solo após a drenagem ter ocorrido ou cessado), calculada em aproximadamente 2 litros. Cada injeção corresponde a 2,5% da CC, obtendo-se ao final do experimento 27,5% da CC. Aproximadamente a mesma concentração é obtida se calcularmos o volume injetado com relação ao volume de solo dos lisímetros – 30,5%.

A relação de leituras, idade das plantas, volume total de hidrocarboneto injetado e CC estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Número da leitura espectral, tempo decorrido desde a semeadura, volume de HC injetado até a data e a capacidade de campo (CC) correspondente ao volume injetado.

Leitura	Tempo (dias)	Volume de HC (mL)	CC (%)
L 1	45	200	12,5
L 2	58	250	15
L 3	73	300	17,5
L 4	93	350	20
L 5	113	400	22,5
L 6	125	450	25
L 7	145	500	27,5

2.2 Espectrometria

As medidas radiométricas foram realizadas com o espectrorradiômetro ultraespectral portátil *FieldSpec Full Resolution* da *Analytical Spectral Devices*, operante na faixa do espectro eletromagnético refletido, entre 350nm e 2500nm, com 2150 canais. Foram feitas 11 medições no total, das quais sete foram utilizadas para se traçar um diagnóstico com relação às respostas fisiológicas e espectrais das plantas à presença de HCs.

Na vegetação, as medições foram realizadas *in situ* com o auxílio do *leaf clip*, um acessório que pode ser acoplado ao equipamento e que equivale a uma esfera integradora. Trata-se de um método totalmente controlado, em que se tem sempre uma iluminação com incidência ortogonal e mesma intensidade para todas as amostras, eliminando interferências do ambiente, permitindo resultados mais precisos.

A técnica de remoção do contínuo (Clark *et al.*, 1990) foi empregada com o auxílio do software *The Spectral Geologist* (www.thespectralgeologist.com), a fim de acentuar as feições espectrais, reduzir os efeitos externos e identificar elementos. A remoção do contínuo se relaciona à determinação das características das feições de absorção e normaliza o espectro, permitindo melhor detalhamento das feições das bandas de absorção. Após a remoção do contínuo, os resultados foram dispostos de forma gráfica, de modo a permitir a análise, apresentada em 2 intervalos:

- i) 400 a 700nm – área do visível (VIS) – pigmentos fotossintetizantes.
- ii) 2100 a 2500nm – área do infravermelho de ondas curtas (SWIR) – compostos bioquímicos.

2.3 Pigmentos foliares

A análise dos pigmentos fotossintéticos foi feita pós-colheita, segundo método descrito por Holm (1954), que utiliza acetona 80% como extrator e leitura do extrato em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda: Clorofila *a* e Clorofila *b*: A644 e A662; e Carotenóides: A440,5. Esses resultados são empregados em equações específicas para cada pigmento, resultando no teor dos mesmos.

2.4 Amido e Celulose

A celulose foi investigada por se tratar de um importante componente estrutural das plantas. Estresses e deficiência nutricional podem acarretar em menor produção do composto, comprometer o desenvolvimento foliar de plantas e torná-las mais suscetíveis à intempéries ambientais. O método utilizado na sua quantificação foi descrito por Updegraff (1969).

O amido é um importante componente funcional e no caso da espécie de planta estudada, serve como reserva nutricional e pode ser um indicador chave do vigor da planta. Foi quantificado através do método descrito por Amaral *et al.* (2007). Acrescente-se que estes compostos bioquímicos têm feições de absorção mais diagnósticas que os demais, o que aumenta a sua importância na detecção de possíveis variações.

2.5 Altura e Massa da Matéria Seca da Parte Aérea

Ao fim do experimento, antecedendo a coleta, a parte aérea das plantas foi medida em centímetros. Para a obtenção da massa da matéria seca da parte aérea, as plantas foram secas em estufa de ar forçado a 50°C até peso constante.

3. Resultados

3.1 Espectrometria

As diversas amostragens de reflectância ao longo do tempo permitiram avaliar mudanças na composição e teores relativos dos diversos compostos foliares.

3.1.2 Visível (VIS)

Na região do Visível, onde se encontram as feições indicadoras da presença de compostos fotossintéticos, tais como clorofila *a* (CIA), clorofila *b* (CIB), xantofilas, antocianinas e carotenóides (CAR), a perda de pigmentos se caracteriza pelo aumento no nível de reflectância.

Como pode ser observado na Figura 1, a partir de 415nm há uma diferenciação entre os espectros e os tratamentos GSL e DSL passam a apresentar maior reflectância ao longo do VIS. Na região do azul (400 a 500nm) a alteração foi menos sensível e possivelmente devido à degradação das clorofilas *a* e *b*, que dominam a absorção da radiação nesta região espectral juntamente com os carotenóides e xantofilas. Estes últimos apresentam menores teores que as clorofilas e na planta madura e saudável têm suas presenças mascaradas pelas mesmas (Gates *et al.* 1965) que, entretanto, são mais facilmente degradáveis sob estresse. Já na região do verde, a 550nm, há considerável absorção pelas clorofilas e por antocianina e ao final do experimento, a avançada degradação da clorofila (e provavelmente da antocianina) permitiu que a resposta dos carotenóides se sobressaísse progressivamente até o extremo da última leitura (Figura 1).

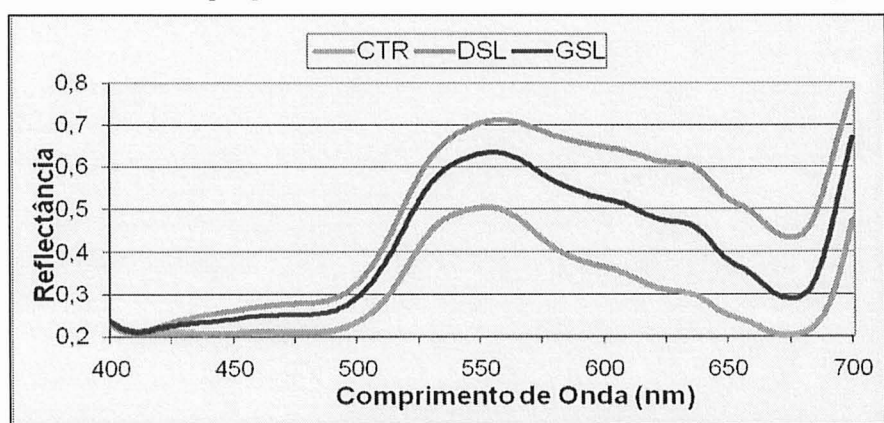


Figura 1 - Reflectância das folhas de braquiária cultivada sobre solo contaminado por gasolina (GSL), diesel (DSL) ou sem contaminação (CTR) - Leitura 7.

3.1.3 Infravermelho de ondas curtas (SWIR)

A reflectância nessa região foi focada especialmente no intervalo entre 2100 e 2500nm por ser menos influenciada pelo teor de água nas folhas (Kokaly e Clark, 1999) e também por ser onde as feições diagnósticas de diversos compostos bioquímicos estão presentes. As representações gráficas comparativas entre as reflectâncias dos tratamentos CTR/L1, CTRL/7, GSL/L7 e DSL/L7 podem ser observadas na Figura 2.

Na região de 2.477nm, referente a carboidratos na forma de polissacarídeos ou oligossacarídeos (Narra *et al.*, 2005), parece não haver perda de assimilados, ao contrário do que ocorre naturalmente em função da senescência, como observado no CTR/L7 (Figura 2). Esse resultado corrobora com Silva *et al.* (2001) em estudo com gramíneas, onde observaram um acúmulo significativo de amido nas plantas sob estresse hídrico. Embora não comparável o tipo de estresse, o padrão de acúmulo de carboidratos, como o amido, é uma das estratégias que,

atuando em conjunto com outros fatores, permitem à espécie sobreviver em condições adversas que ocorrem em seu ambiente natural. Esse acúmulo pode ter ocorrido em virtude de uma queda na demanda de assimilados ou, então, estar também relacionado à dificuldade de exportação de carbono das folhas para outras partes da planta. Esse armazenamento na forma de amido, açúcares redutores e açúcares solúveis, pode possibilitar às espécies um maior arranque de crescimento após o estresse (Lima, 1996).

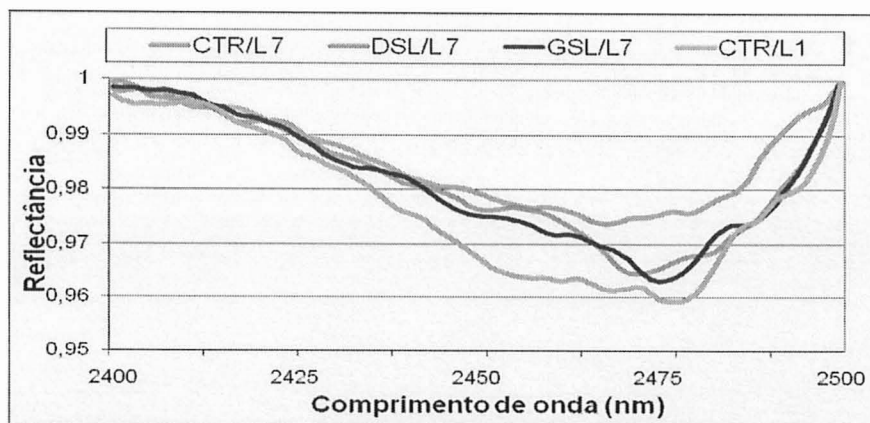


Figura 2 - Reflectância das folhas de braquiária cultivada sobre solo contaminado por gasolina (GSL), diesel (DSL) ou sem contaminação (CTR) - Leituras 7, comparadas à Leitura 1 do controle (CTR/L1)

Na região entre 2.485 e 2.495nm a reflectância da GSL/L7 e do DSL/L7 permaneceram inalteradas quando comparadas às plantas CTR/L1. Nem a presença dos HCs e nem a senescência natural das plantas acarretaram em mudanças espectrais nessa região. Essa assinatura espectral é extremamente relevante, pois ao ser totalmente independente das mudanças fisiológicas naturais que ocorrem na planta com o passar do tempo, torna-se específica de plantas que sofrem esse tipo de estresse. Este comportamento não parece ter sido descrito na literatura até o momento e reveste-se de grande importância por sua especificidade: embora a detecção de alterações espectrais no visível seja mais evidente, esta seria a evidência adicional, a ser testada, posto que é independente das alterações fenológicas.

3.2 Análises bioquímicas das folhas

Os resultados analíticos avaliados estatisticamente com auxílio do *software* ASSISTAT, empregando-se análise de variância e Teste de Tukey a 5% de probabilidade, são expressos na Tabela 2 e posteriormente detalhados.

Tabela 2 – Resultado das análises de Clorofila a (CIA), Clorofila b (CIB), Carotenóides (CAR), Amido, Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e altura das folhas de *Brachiaria brizantha* cultivada sobre solo contaminado por Gasolina, Diesel ou sem contaminação (Controle).

Tratamento	CIA (mg/g)	CIB (mg/g)	CAR (mg/g)	Celulose (µg/mg)	Amido (µg/mg)	MSPA (g)	Altura (cm)
Controle	0,303 a	0,096 a	0,123 a	192,00 a	13,68 a	193,94 a	108,00 a
Gasolina	0,154 b	0,055 b	0,098 ab	194,20 a	7,19 ab	101,69 b	82,00 b
Diesel	0,053 c	0,018 c	0,063 b	191,80 a	2,19 b	68,37 c	62,00 c

(As médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si - Teste de Tukey a 5% de probabilidade)

3.2.1 Pigmentos foliares – Clorofila *a*, *b* e Carotenóides

A resposta a estresses, assim como as mudanças correspondentes na reflectância da vegetação, pode ser explicada pela tendência geral do estresse em diminuir a concentração de clorofila nas folhas das plantas (Curran, 1995).

Como já preconizado na literatura por diversos autores, a degradação de clorofilas é acelerada e ocorre abruptamente em plantas que se desenvolvem sob influência de HCs. No presente estudo, os teores de CIA no CTR chegam a ser 197% e 572% maiores que em GSL e DSL, respectivamente.

Os teores de carotenóides decaíram de forma significativa apenas em DSL (49%). Em GSL a alteração foi menos expressiva.

A maior degradação de clorofilas e carotenóides em plantas contaminadas com diesel indica que há diferenças na forma como cada hidrocarboneto influencia as respostas fisiológicas das plantas e como seus componentes acarretam diferentes níveis de degradação, sendo neste caso o diesel mais agressivo que a gasolina.

3.2 Amido e Celulose

O teor em amido caiu significativamente com as contaminações, sobretudo por DSL. A resposta espectral do composto (2477nm) correlaciona-se positivamente com os teores encontrados na análise bioquímica. A quantidade de celulose não diferiu estatisticamente entre os tratamentos.

3.3 Altura e Massa da Matéria Seca da Parte Aérea

Um resultado que exprime bem o efeito da presença de hidrocarbonetos no solo é a produção foliar da vegetação. Sabe-se que o estresse acarreta em diversas medidas tomadas pelo organismo da planta na tentativa de combater os efeitos adversos e aumentar sua sobrevivência, dando início a medidas osmorregulatórias. Em condições estressantes, uma das primeiras medidas tomadas é a redução da turgescência celular, que leva à diminuição do crescimento, uma vez que a divisão, alongamento e diferenciação celular são afetados (Larcher, 2000). Paralelamente, ocorre a perda da eficiência de fotossíntese devido à degradação dos pigmentos fotossintetizantes, além das alterações que ocorrem no solo, que provocam a indisponibilidade de elementos essenciais ao desenvolvimento vegetal (Yang *et al.*, 2000).

No presente estudo, a massa da matéria seca da parte aérea seca (MSPA) do CTR foi 283% maior que a do DSL, e 190% maior que da GSL.

A altura final das plantas também foi significativamente afetada pela presença de HCs. Assim como a MSPA, a altura do CTR foi muito superior à das plantas contaminadas: 174% maior em DSL e 130% maior que GSL. Esse efeito já foi descrito na literatura e observado em plantas como milho e trigo (Nomeen, 2003).

4. Conclusões

As alterações na região do visível são intensas desde o início da contaminação, com perda significativa de clorofilas *a* e *b*. Esta perda é indicada pelo aumento no nível de reflectância e confirmada laboratorialmente com a quantificação dos teores de pigmentos, confirmando pesquisas anteriores feitas, sobretudo, no hemisfério norte. No SWIR está a principal colaboração desta pesquisa à questão, ao detectar dois padrões: (i) a 2477nm onde as alterações devem-se à reserva de carboidratos em provável estratégia de sobrevivência da planta ao estresse, (ii) entre 2485 e 2495nm que apresentou uma resposta muito específica das plantas estressadas por HCs. Esta assinatura espectral mostrou-se independente da senescência da planta, permitindo

assegurar a sua total correlação com a presença de HCs no solo. Leituras de baixa altitude, em sobrevôos de helicóptero sobre as linhas de dutos cobertas com braquiária podem tornar operacionalmente úteis estas informações, já que, analisadas em conjunto com a perda das clorofilas, deve gerar um quadro de difícil confusão com estresses de ordem natural.

6. Referências bibliográficas

Amaral, L. I. V.; Gaspar, M.; Costa, P. M. F.; Aidar, M.P. M.; e Buckeridge, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Revista Hoehnea** v. 34, p.425-431, 2007.

Clark R.N., King T.V.V., Klejwa G.A., Swayze G.A. 1990. High Spectral Resolution Reflectance Spectroscopy of Minerals. **Journal of Geophysical Research**, 95(B8): 12.653-12.680

Curran, P. J. W., W.R., Gholz, H.L. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll concentration in slash pine leaves. **Tree physiology** 15, pp. 203-206, 1995

Gates, D.M.; Keegan, H.J.; Schafer, J.C.; Weinder, V.R. Spectral properties of plants. **Applied Optics**, p.11-20, 1965.

Holm, G. Chlorophyll mutations in barley. **Acta Agric. Scand.**, V. 4 p.457, 1954.

Kokaly, R.F. and Clark, R.N., 1999, Spectroscopic determination of leaf chemical concentrations using absorption band-depth analysis of absorption features and stepwise multiple linear regression, **Remote Sensing of Environment**, 67, 267-287.

Larcher, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima. 531 p., 2000

Lima, P.C. **Acúmulo e distribuição de matéria seca, carboidratos e macronutrientes em mudas de Eucalyptus spp em solos com diferentes potenciais hídricos**. 1996.106p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1996.

Narra, S., Fermanian, T.W., Swiader, J. M. Analysis of Mono- and Polysaccharides in Creeping Bentgrass Turf Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. **Crop Science**, Vol. 45, January–February 2005.

Noomen M.F., Skidmore A.K., Van der Meer F.D. Detecting the Influence of Gas Seepage on Vegetation using Hyperspectral Remote Sensing. **Geological Survey of Canada**, 2003.

Rosso, P., J. Pushnik, M. Lay, and S. Ustin. Reflectance properties and physiological responses of *Salicornia virginica* to heavy metal and petroleum contamination. **Environmental Pollution** 137 (2): 241-252, 2005

Silva, S., Soares, S.A., de Oliveira M.L.E., Magalhães, P.C., Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidrelétricos submetidas à deficiência hídrica. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, V.25, N.1, P. 124-133, Jan./Fev., 2001

Souza Filho, C. R. ; Augusto, V. A. ; Oliveira, W. J. ; Lammoglia, T. , 2008, Detecção de Exsudações de Hidrocarbonetos por Geobotânica e Sensoriamento Remoto Multi-Temporal: Estudo de Caso no Remanso do Fogo (MG). **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, p. 1-14, 2008 (em impressão).

Updegraff, D.M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Annals Biochemistry** 32:420-424, 1969.

Yang, H., Zhang, J., Meer, F. & Kroonenberg, S. B. Imaging spectrometry data correlated to hydrocarbon microseepage. **International Journal of Remote Sensing**, 21: 197-202, 2000.