

**THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS**

**EFEITO FITOTÓXICO E POTENCIAL REMEDIADOR DE  
TRÊS ESPÉCIES VEGETAIS CONTAMINADAS COM  
BENZENO**

Sorocaba  
2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências  
ambientais*



unesp  
Sorocaba

**THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS**

**EFEITO FITOTÓXICO E POTENCIAL REMEDIADOR DE  
TRÊS ESPÉCIES VEGETAIS CONTAMINADAS COM  
BENZENO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valquíria de Campos

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leticia Silva Souto

Sorocaba

2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências  
ambientais*



unesp  
Sorocaba

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da F.C.L. – Assis – UNESP

M488e Medeiros, Thales Augusto de Miranda  
Efeito fitotóxico e potencial remediador de três espécies  
vegetais contaminadas com benzeno / Thales Augusto de  
Miranda Medeiros. Sorocaba, 2015  
152 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Campus Experimental de  
Sorocaba – Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Valquíria de Campos

Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Letícia Silva Souto

1. Benzeno. 2. Fitorremediação. 3. Plantas. 4. Stress  
oxidativo. 5. Meio ambiente – Contaminação. I. Título.

CDD 628.5

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquíria de Campos** (Orientador)

Departamento de Engenharia Ambiental  
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
*Campus* Experimental de Sorocaba

**Prof. Dr. Leandro Cardoso de Moraes**

Departamento de Engenharia Ambiental  
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
*Campus* Experimental de Sorocaba

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ingrid Koch**

Departamento de Biologia  
UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos  
*Campus* Sorocaba

Sorocaba, 23 de fevereiro de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais Ana Maria e Clementino Júnior, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, **UNESP**, *Campus* de Sorocaba, através do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Valquíria de Campos**, pela orientação e dedicação para realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pela concessão do Auxílio à Pesquisa (processo 470012/2012-9), que possibilitou a execução deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Letícia Silva Souto**, da Universidade Federal de São Carlos, **UFSCar**, *Campus* de Sorocaba, minha coorientadora, pela importante colaboração e dedicação.

Ao Dr. **Isaac Jamil Sayeg**, da Universidade de São Paulo, **USP**, Instituto de Geociências, pelos ensinamentos e colaboração em microscopia eletrônica de varredura.

À Universidade Aberta do Brasil de Itapetininga, **UAB**, na pessoa do coordenador de polo **Miguel Arcanjo Dias da Silva** pela autorização de uso do laboratório de Biologia.

À banca examinadora de qualificação, na pessoa do Prof. Dr. **Leandro Cardoso de Moraes**, da UNESP *Campus* de Sorocaba, e da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ingrid Koch**, da UFSCar *Campus* de Sorocaba, pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento e finalização do documento de dissertação.

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pela convivência e cooperação.

Aos meus pais, **Ana Maria Alves de Miranda Leonel de Medeiros** e **Clementino Leonel de Medeiros Júnior**, por sempre acreditarem em meus objetivos.

Ao meu irmão, **Thiago Henrique de Miranda Medeiros**, pela amizade.

À minha namorada, **Laura Tie Vieira de Paula Oguchi**, pelo apoio e companheirismo.

## **EPIGRAFE**

“Não é o homem, enquanto espécie, que altera processos ecológicos que acabam por ameaçar outras espécies. Somente alguns indivíduos de nossa espécie fazem isto. Assim como não é a espécie humana, como um todo, que sofre as consequências destas extinções. Alguns indivíduos sofrem mais com a degradação dos recursos naturais e extinção de espécies do que outros.”

(PRIMACK & RODRIGUES)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1 FITOTECNOLOGIA.....	17
3.2 COMPORTAMENTO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SUBSUPERFÍCIE... 29	
3.3 ESPÉCIES VEGETAIS .....	37
3.3.1 <i>Brachiaria brizantha</i> (A. Rich.) Stapf.....	37
3.3.2 <i>Impatiens walleriana</i> Hook. f.....	40
3.3.3 <i>Pteris vittata</i> L.....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 INJEÇÃO DE BENZENO NO SOLO .....	46
4.1.1 <i>Índice de translocação e fator de bioacumulação</i> .....	47
4.1.2 <i>Curva dose-resposta</i> .....	49
4.2 ASPERSÃO DE BENZENO NAS ESPÉCIES VEGETAIS .....	50
4.3 COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS APÓS OS TRATAMENTOS .....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
5.1 INJEÇÃO DE BENZENO NO SOLO .....	56
5.1.1 <i>Curva dose-resposta</i> .....	82
5.2 ASPERSÃO DE BENZENO NAS ESPÉCIES VEGETAIS .....	84
5.2.1 <i>Densidade estomática e mensuração dos estômatos</i> .....	93
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>125</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APx	= Ascorbato peroxidase
BTEX	= Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CAT	= Catalase
CG	= Cromatografia gasosa
COH	= Contaminante orgânico hidrofílico
COV	= Composto orgânico volátil
CREA-PR	= Conselho Regional de Engenharia e Agronomia do Paraná
DAB	= Diaminobenzidina
DNAPL	= <i>Dense non-aqueous phase liquid</i>
EPA	= <i>Environmental Protection Agency</i>
EROs	= Espécies reativas de oxigênio
FA	= Fator de bioacumulação
FAA <sub>50</sub>	= Formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%
GC/MS	= <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i>
GPx	= Glutathiona peroxidase
HPA	= Hidrocarboneto policíclico aromático
IARC	= <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IT	= Índice de translocação
K <sub>oc</sub>	= Coeficiente de partição carbono-água
K <sub>ow</sub>	= Coeficiente de partição octanol-água

LNAPL	= <i>Light non-aqueous phase liquid</i>
LVd	= Latossolo vermelho distrófico
NAPL	= <i>Non-aqueous phase liquid</i>
NIOSH	= <i>National Institute for Occupation Safety and Health</i>
OIT	= Organização Internacional do Trabalho
PVC	= <i>Polyvinyl chloride</i>
REPAR	= Refinaria Presidente Getúlio Vargas
SOD	= Superóxido dismutase
SVE	= <i>Soil Vapor Extraction</i>
TCE	= Tricloroetileno
TNT	= Trinitrotolueno

Medeiros TAM. Efeito fitotóxico e potencial remediador de três espécies vegetais contaminadas com benzeno [dissertação]. Sorocaba (SP): UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2015.

## RESUMO

O meio mais diretamente afetado pela contaminação antrópica é o solo e, conseqüentemente, a água subterrânea. No processo de fitorremediação, a absorção direta de contaminantes no solo, através das raízes, evita a contaminação da zona freática, ou mesmo, pode reduzir o tamanho da pluma de contaminação de benzeno, protegendo os pontos receptores. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial remediador e as respostas indicadoras de distúrbios de três espécies vegetais, quando expostas ao benzeno. Entre as espécies estudadas tem-se uma monocotiledônea (*Brachiaria brizantha*), uma eudicotiledônea (*Impatiens walleriana*) e uma samambaia (*Pteris vittata*). Para avaliar o potencial remediador foram efetuados ensaios de injeção direta e nebulização de benzeno sobre as espécies. *Pteris vittata* apresentou baixa absorção (5,88%) e acumulou principalmente na raiz, o que também foi observado através da ausência de sintomas visuais de fitotoxicidade. *Impatiens walleriana* apresentou altas taxas de remoção de benzeno e após a suspensão da contaminação, a espécie reagiu ao processo de desintoxicação, recuperando a rigidez do caule e coloração das folhas. *Brachiaria brizantha* não reagiu ao processo de desintoxicação e morreu ao final do tratamento. Para compreender as respostas indicadoras de distúrbios, as folhas foram retiradas, processadas e fixadas segundo técnicas usuais, para análise em microscopia eletrônica de varredura, para identificar injúrias microscópicas na superfície foliar. As três espécies vegetais apresentaram aumento na densidade estomática, posteriormente ao tratamento com injeção de benzeno. O acúmulo de peróxido de hidrogênio e a indicação de morte celular foram respostas à presença do benzeno nos tecidos foliares. Na nebulização com o contaminante, as três espécies apresentaram efeitos fitotóxicos, como alteração na densidade estomática e tamanho dos estômatos. Ao final, tem-se a *Impatiens walleriana* como espécie, que mais agrega características desejáveis a fitotecnologia. *Pteris vittata* e *B. brizantha* não apresentaram potencial fitorremediador.

Palavras-chave: Fitorremediação. Análise foliar. Stress oxidativo. *Impatiens walleriana*. *Brachiaria brizantha*. *Pteris vittata*.

Medeiros TAM. *Phytotoxic effect and potential remediation of three plant species contaminated with benzene [dissertation]*. Sorocaba (SP): UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2015.

### **ABSTRACT**

*The environment most directly affected by human contamination is the soil and consequently groundwater. In phytoremediation process, the direct absorption of contaminants in the soil by the roots, prevents contamination of groundwater or to reduce the size of the plume, protecting receptor sites. The aim of this study was to evaluate the remedial potential and the indicator responses disorders of three plant species when exposed to benzene. The species used were a monocotyledon (*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf), a eudicotyledon (*Impatiens walleriana* Hook. F.) and a fern (*Pteris vittata* L.). To assess the potential remedial were made direct injection testes and benzene mist on the species. *Pteris vittata* showed low absorption (5.88%) and accumulated mainly in the root, which was also observed by the absence of visual symptoms of phytotoxicity. *Impatiens walleriana* showed high removal rates of benzene and after suspension of the contamination, the species reacted to the detoxification process and regained stem stiffness and color of the leaves. *Brachiaria brizantha* did not react to the detoxification process and the end of treatment died. To understand the indicator responses disorders the leaves were removed, processed and fixed according to standard techniques for analysis in a scanning electron microscope to identify changes in the surface of the leaves. The three species showed an increase in stomatal density, after the treatment with benzene injection. The hydrogen peroxide accumulation and cell death indication are responses to the presence of benzene in the leaves. In benzene contamination by mist, the three species showed phytotoxic effects, such as changes in stomatal density and stomatal size. At the end, we have the *Impatiens walleriana* as a species, which adds more features desirable to phytotechnology. *Pteris vittata* and *B. brizantha* don't showed phytoremediation potential.*

*Keywords: Phytoremediation. Leaf analysis. Oxidative stress. Impatiens walleriana. Brachiaria brizantha. Pteris vittata.*

## 1 INTRODUÇÃO

Em um derramamento de gasolina as atenções para a contaminação do aquífero freático voltam-se para a presença de hidrocarbonetos monoaromáticos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). No Brasil, a migração de BTEX para zona saturada tem sido potencializada em razão da interação do etanol com os hidrocarbonetos presentes na gasolina. Isso porque a gasolina comercializada no Brasil é bastante diferenciada dos outros países, em virtude da adição de 20 a 25% de etanol. Esse teor de álcool é bem superior ao máximo permitido nos Estados Unidos (10%) e Europa (5%) (Courseuil et al., 1998). Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam elevada mobilidade em sistemas solo-água, característica que pode ser representada, significativamente, pelo menor coeficiente de partição entre octanol-água ( $K_{ow}$ ). Um menor coeficiente de partição implica em lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial pela água, migrando rapidamente para o aquífero livre ( $\text{Log}K_{ow}$  para o benzeno 2,13 e  $\text{Log}K_{ow}$  para etanol -0,31) (Courseuil et al., 1998). Outra preocupação das empresas do ramo de petróleo são as perdas de combustíveis e derivados de petróleo por evaporação, que representam não só prejuízo econômico, mas também impacto negativo sobre o ambiente, uma vez que toneladas de produtos são lançadas na atmosfera (Courseuil et al., 1998).

O benzeno é reconhecidamente o composto mais tóxico dentre os BTEX e, por isso, pode ser apontado como o agente mais preocupante no tocante à saúde pública. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), órgão da Organização Mundial da Saúde, o benzeno se classifica no Grupo I, ou seja, é uma substância comprovadamente cancerígena e que também pode causar leucemia em seres humanos (IARC, 2006). Assim como a IARC, nos Estados Unidos, a Agência de Saúde e Segurança Ocupacional (*National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH*), bem como a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency - EPA*) também incluem o benzeno em suas listas de produtos cancerígenos (EPA, 1998; NIOSH, 2006). Daí, a importância considerável em monitorar esses contaminantes em episódios de contaminações.

Uma das estratégias de gerenciamento muito empregada na recuperação de locais contaminados por derivados de petróleo é a remediação *in situ*. O uso de plantas como agentes despoluidores tem despertado interesse crescente. Sua utilização tem sido avaliada principalmente em solos contaminados com metais traço (Campos, Pires, 2004; Bose, Bhattacharyya, 2008; Campos, 2009), petróleo e seus derivados (Anderson, Walton, 1995; Moreno, Courseuil, 2001), além de outros compostos orgânicos (Newman et al., 1988; Cunningham et al., 1996; Burken, Schnoor, 1996). A utilização de plantas com capacidade de tolerar e, concomitantemente, extrair substâncias tóxicas,

pode representar uma alternativa interessante de descontaminação *in situ*.

Os testes de fitotoxicidade de espécies a contaminantes são importantes antes da implantação do processo de fitorremediação (Ribeiro, 2009). Para Pita-Barbosa et al. (2009) a avaliação sintomatológica é um método importante para o estudo da sensibilidade de espécies vegetais expostas a fatores estressantes, porém é necessário, geralmente, a validação adicional através de interpretação microscópica. Uma das ferramentas muito utilizadas para avaliação de poluentes em plantas é a anatomia vegetal e a análise da superfície foliar.

Dentre os órgãos vegetativos, as folhas são aqueles mais usados em trabalhos de fitotoxicidade (Chaves et al., 2002; Sant'Anna-Santos et al., 2007; Alves et al., 2008;). Isso ocorre porque as folhas são órgãos vegetativos com maior variedade de características morfológicas e anatômicas e, de forma geral, expressam as condições ambientais (Esau, 1976; Fahn, 1982; Hickey, King, 2000). Além disso, apresentam grande plasticidade fenotípica, mostrando variações morfológicas e anatômicas em relação a diferentes condições como, intensidades luminosas (Strauss-Debenedetti, Berlyn, 1994; Lindorf, 1997; Baruch et al., 2000; Jaakola et al., 2004; Justo et al., 2005; Rossatto, Kolb, 2010), disponibilidade de nutrientes no solo, regime hídrico (Rôças et al., 1997; Wang et al., 2007), herbivoria (Turner, 1994; Karban, Baldwin, 1997; Ribeiro et al., 2010) e respostas à presença de compostos tóxicos (Maranho et al., 2006; Sant'Anna-Santos et al., 2007; Alves et al., 2008; Pita-Barbosa et al., 2009).



A exposição das plantas a contaminantes pode perturbar a homeostase celular e aumentar a produção de diversas espécies reativas de oxigênio, que são produzidas continuamente pelo metabolismo vegetal (Foyer, Noctor, 2005) e podem causar desequilíbrio no sistema de defesa, resultando em injúrias ou sintomas visíveis (Dias et al., 2007).

Assim, este estudo tem por finalidade avaliar três espécies vegetais, mediante a capacidade de tolerar e, concomitantemente, extrair o benzeno do ambiente, quando expostas a este contaminante seja por contaminação no solo ou por contaminação no ar. Espera-se que as espécies possam acumular o benzeno em seus tecidos, respondendo através injurias microscópicas nos tecidos sem danos externos ou ainda apresentando sintomas macroscópicos. Também espera-se que elas possam absorver o contaminante orgânico através da raiz, translocar, acumular e/ou volatilizá-lo através das folhas.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo central da pesquisa é a obtenção de respostas indicadoras de distúrbios, de processos adaptativos ou de mortalidade de três espécies vegetais (*B. brizantha*, *I. walleriana* e *P. vittata*), quando expostas ao benzeno.

Além disso, os objetivos específicos do estudo compreendem:

- 1) Analisar curva dose resposta, a partir do tratamento com concentrações crescentes do poluente;
- 2) Obter respostas indicadoras de perturbação, mediante a caracterização de mudanças micromorfológicas da superfície foliar.
- 3) Identificar a presença de peróxido de hidrogênio e morte celular, através da avaliação histoquímica;
- 4) Estabelecer o potencial das três espécies vegetais em absorver substâncias químicas como o benzeno.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Fitotecnologia

Técnicas de fitorremediação incluem diferentes modalidades, depende da natureza química, das propriedades do contaminante (se é inerte, volátil ou sujeitos a degradação na planta ou no solo) e das características da planta (Figura 1). Assim, a fitorremediação compreende essencialmente seis etapas diferentes, sendo que as etapas podem ser realizadas simultaneamente pela planta (Favas et al., 2014).

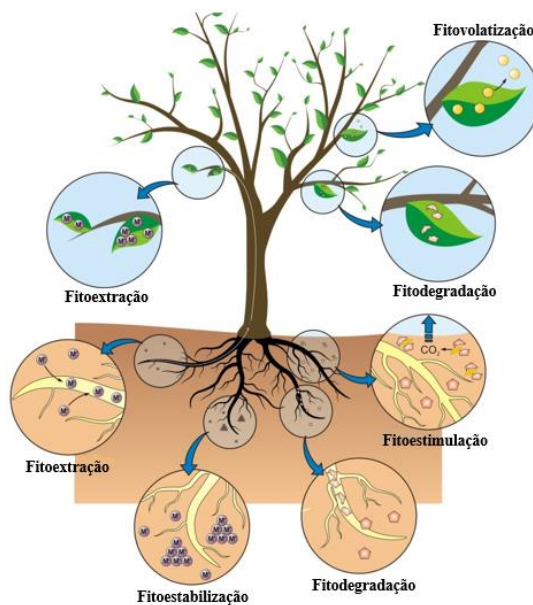


Figura 1 – Representação esquemática das etapas da fitorremediação (Favas et al., 2014, tradução nossa).

**Fitodegradação (Fitotransformação):** Mecanismo biodegradativo, onde os contaminantes orgânicos são degradados (metabolizados), mineralizados, assimilados ou lignificados dentro das células das plantas. A degradação e mineralização ocorrem através da ação de enzimas específicas como nitrorredutase (degradação de compostos nitroaromáticos), dehalogenase (degradação de solventes clorados e pesticidas) e lacase (degradação de anilinas) (Favas et., 2014). Alguns exemplos de plantas que possuem esses sistemas enzimáticos são as espécies *Populus* spp. e *Myriophyllum spicatum* Linnaeus (Schnoor et al., 1995; Rylott, Bruce, 2008).

**Fitoestabilização (Fitomobilização):** Técnica que evita a mobilização de contaminantes e limita sua difusão no solo. É utilizado tanto para contaminantes orgânicos como inorgânicos. Os poluentes são incorporados à lignina da parede celular de células radiculares ou em húmus no solo (Favas et., 2014). Exsudatos das raízes agem diretamente nos metais, precipitando-os nas formas insolúveis, permanecendo presos na matriz do solo (Berti, Cunningham, 2000; Prasad, 2004; Domínguez et al., 2009; Ali et al., 2013). Espécies dos gêneros *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis* e *Alyssum* são exemplos de plantas cultivadas para este fim.

**Fitovolatilização:** Esta técnica baseia-se na capacidade de algumas plantas de absorver e volatilizar certos metais/metalóides. Alguns íons de elementos dos grupos IIB, VA e VIA da tabela periódica (especificamente Hg, Se e As) são absorvidos pelas raízes, convertidos em formas não-tóxicas, e em seguida liberados para a atmosfera (Favas et., 2014). São exemplos *Astragalus bisulcatus* (Hook) A. Gray e

*Stanleya pinnata* (Pursh) Briton, além de plantas transgênicas (com genes de bactérias) de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Nicotiana tabacum* L., *Liriodendron tulipifera* L. e *Brassica napus* L. (Brooks, 1998; Pilon-Smits, Pilon, 2000; Poschenrieder, Barceló, 2004; Ruiz, Daniell, 2009; Pilon-Smits, LeDuc, 2009; Ali et al., 2013). Esta técnica também pode ser usada para os compostos orgânicos (Favas et., 2014).

#### **Fitoextração (Fitoacumulação ou Fitoabsorção):**

Esta técnica utiliza preferencialmente plantas hiperacumuladoras, que absorvem contaminantes pelas raízes, translocando e acumulando-os nas folhas. Têm a capacidade de armazenar grandes concentrações de metais em suas folhas (0,01% a 1% de peso seco, dependendo do metal) e é aplicado principalmente para Cd, Ni, Cu, Zn e Pb, mas também pode ser utilizado para outros elementos (Se, As) e compostos orgânicos (Favas et., 2014). São exemplos conhecidos de plantas hiperacumuladoras para Cu, Ni, Zn/Cd e As, respectivamente, *Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maekawa, *Alyssum bertolonii* Desv., *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl e *Pteris vittata* L. (McGrath, 1998; Blaylock, Huang, 2000; Ma et al., 2001; McGrath, Zhao, 2003; Prasad, 2004; Hernández-Allica et al., 2008; Pedron et al., 2009; Xie et al., 2009; Van der Ent et al., 2013).

**Fitofiltração:** Técnica que utiliza o sistema radicular ou outros órgãos submersos, em meio aquoso, para absorver, concentrar e/ou precipitar principalmente metais traço. As plantas são mantidas num sistema de hidroponia, em que os efluentes passam e são "filtrados" pelas raízes (rizofiltração), ou são absorvidos e concentrados em outros órgãos (Frers, 2009; Dhote, Dixit, 2009; Ali et al., 2013).

Características como alta biomassa de raiz ou alta superfície de absorção, fazem com que plantas com maior capacidade de acumulação e tolerância a contaminantes consigam alcançar os melhores resultados (Favas et., 2014). Exemplos promissores incluem *Helianthus annuus* L., *Brassica juncea* (L.) Czern., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. e várias espécies do gênero *Salix*, *Populus*, *Lemna* e *Callitriche* (Dushenkov, Kapulnik, 2000; Prasad, 2004; Poschenrieder, Barceló, 2004; Pratas et al., 2012; Favas et al., 2012).

**Rizodegradação (fitoestimulação):** O crescimento das raízes pode promover a proliferação de microrganismos degradantes na rizosfera, que utilizam os exsudados e metabolitos de plantas como uma fonte de carbono e energia (Favas et., 2014). A aplicação da fitoestimulação está limitada a contaminantes orgânicos (Prasad, 2004; Frers, 2009). A comunidade microbiana na rizosfera é heterogênea, devido à distribuição espacial dos nutrientes, no entanto, as espécies do gênero *Pseudomonas* são os organismos predominantes associados às raízes (Crowley et al., 1997; Khan et al., 2009; Ali et al., 2013).

Fitoextração e fitoestabilização são as duas técnicas mais utilizadas na fitorremediação de solos contaminados com metais e metaloides (Favas et al., 2014). A fitoextração tem sido amplamente estudada, principalmente devido a sua alta eficiência e possível valor econômico (em recuperação de metais e produção de energia) (Glass, 2000; Prasad, 2004; Nascimento, Xing, 2006; Zhuang et al., 2007; Hernández-Allica et al., 2008; Pedron et al., 2009). De preferência, as plantas utilizadas na fitoextração devem apresentar, entre outras, as

seguintes características (Hernández-Allica et al., 2008; Sakakibara et al., 2011; Shabani, Sayadi, 2012 Ali et al., 2013):

1. Tolerância a altas concentrações de metais;
2. Acumular concentrações elevadas nos seus tecidos aéreos;
3. Rápido crescimento;
4. Alta produção de biomassa;
5. Sistema radicular abundante;
6. Fácil de cultivar e colher.

Segundo Favas et al. (2014) a fitoextração só pode ser considerada eficaz se o contaminante acumulado é removido através de colheita (Figura 2). Se a maioria dos metais traço capturados são deslocados para as folhas, os métodos agrícolas tradicionais podem ser utilizados para a colheita. É importante colher as plantas antes da queda das folhas, morte ou decomposição para assegurar que os contaminantes não se dispersem ou retornem para o solo (Blaylock, Huang, 2000).

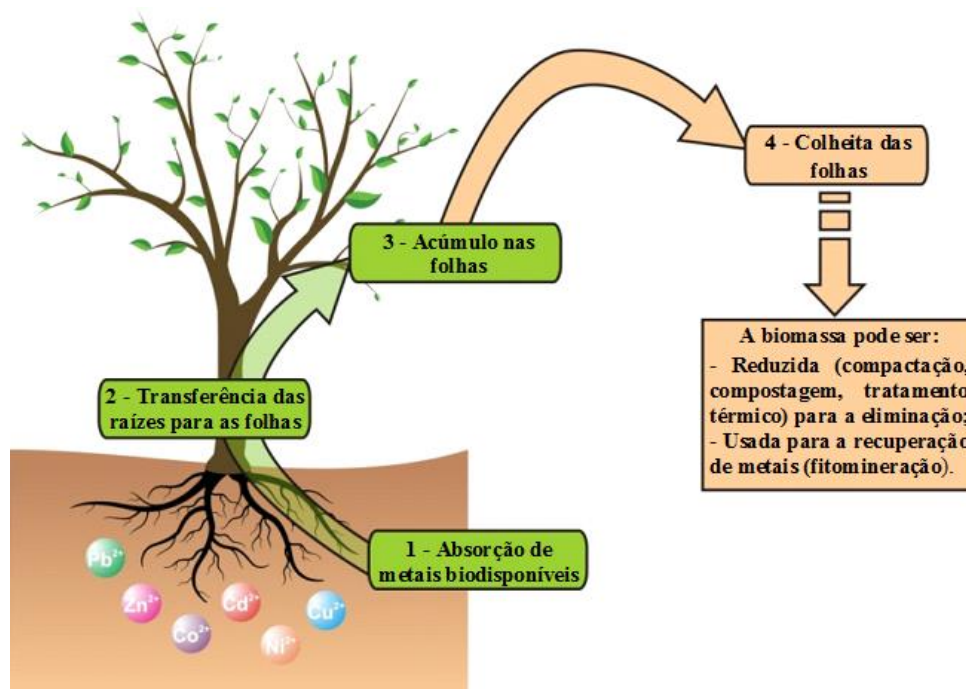


Figura 2 – Representação esquemática da fitoextração de metais do solo (Favas et al., 2014, tradução nossa).

Após a colheita pode-se realizar a fitominação da biomassa, que consiste na extração e recuperação dos metais. Esta técnica é uma maneira de incentivar a fitorremediação, levando em consideração o valor comercial de metais como Ni, Zn, Cu ou Co (Favas et., 2014).

Contudo, o volume/peso da biomassa também deve ser reduzido através de processos térmicos, físicos, químicos ou microbiológicos. A incineração de plantas, representa uma oportunidade econômica através da produção de energia e as cinzas podem ser processadas para fitominação de metais. Entretanto, deve-se ter muita cautela neste processo para evitar quaisquer mecanismos de dispersão dos elementos químicos acumulados (Favas et al., 2014).



De acordo com McGrath e Zhao (2003), a eficiência da fitoextração é determinada por dois fatores principais: a capacidade do hiperacúmulo de metais e a produção de biomassa. Portanto, se esses fatores influenciarem na fitoextração, eles podem ser otimizados para melhorar o processo de fitorremediação. Uma possibilidade é a adição de agentes químicos no solo, a fim de aumentar a biodisponibilidade dos metais e sua absorção radicular (Pierzynski et al., 2002; Saifullah et al., 2009). Esta forma de fitorremediação assistida (ou fitorremediação induzida) tem mostrado grande potencial e tem sido amplamente estudada (Figura 3) (Favas et al., 2014).

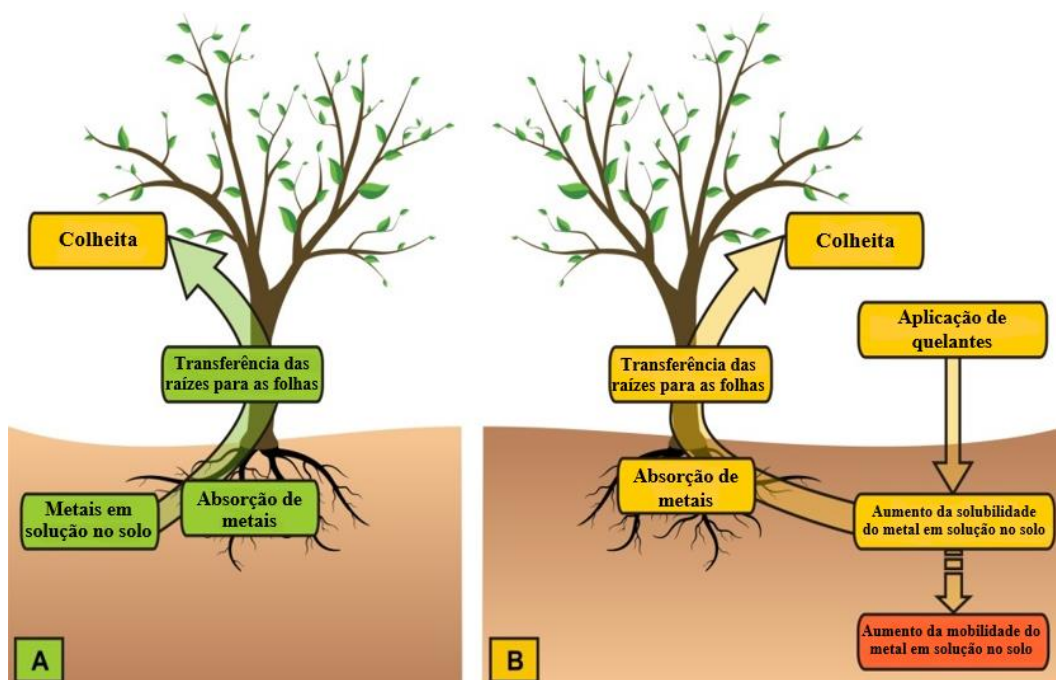


Figura 3 – Representação esquemática do processo de fitoextração natural (A) e assistida (B) (Favas et al., 2014, tradução nossa).

Embora plantas hiperacumuladoras sejam fitoextratoras por excelência, elas, geralmente, produzem baixa biomassa. Assim, é aceito que as plantas com alta capacidade de produção de biomassa

possam compensar a sua baixa capacidade de acumulação do metal, de maneira que a quantidade de metal removido possa ser superior (Zhuang et al., 2007). A fitorremediação oferece várias vantagens, mas também algumas desvantagens, que devem ser consideradas quando se pretende aplicar esta tecnologia (Quadro 1). O seu baixo custo é uma vantagem, porém o tempo necessário para observar os resultados é longo, a concentração dos poluentes e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta, e a seleção de plantas com a eficiência para remediar contaminantes variados ao mesmo tempo não é fácil (Favas et al., 2014). Estas limitações e a possibilidade das plantas entrarem nas cadeias alimentares devem ser levadas em consideração na aplicação desta tecnologia.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens da fitorremediação (*continua*)

<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
Técnica passiva <i>in situ</i> .	Limitada a solos rasos ou onde a contaminação está localizada (<5 m).
Utilização de energia solar que é de baixo custo.	Ainda em fase de desenvolvimento e, portanto, não aceite por muitas agências reguladoras.
Redução do impacto ambiental e contribuição para a melhoria da paisagem.	Há pouco conhecimento sobre a agricultura, genética, reprodução e doenças de plantas fitorremediadoras.
Grande aceitação por parte do público.	Concentração do metal no solo pode ser tóxico e letal para a planta.
Fornecer <i>habitat</i> para a vida animal.	Geralmente, as plantas são seletivas na remediação do metal.
Redução na dispersão da poeira e de contaminantes pelo vento.	Tratamento mais lento do que as técnicas físico-químicas tradicionais.
Redução do escoamento superficial.	Contaminação pode se espalhar através da cadeia alimentar se as plantas acumuladoras forem ingeridas pelos animais.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens da fitorremediação (*conclusão*)

Redução da lixiviação e da mobilização de contaminantes no solo.	Plantas fitorremediadoras podem não adaptar-se às condições climáticas e ambientais dos locais contaminados.
A colheita das plantas que tenham acumulado metais é de fácil realização com as tecnologias já existentes.	Se as plantas liberam compostos para aumentar a mobilidade dos metais, estes podem ser lixiviados para as águas subterrâneas.
A biomassa coletada pode ser economicamente valiosa.	A área a ser descontaminada deve ser grande o suficiente para permitir a aplicação de técnicas de cultivo.
As plantas do processo são mais facilmente controladas do que os microrganismos.	Toxicidade e biodisponibilidade de produtos da degradação são ainda desconhecidas.

Fonte: Favas et al., 2014, p. 489.

A captura e acumulação de substâncias poluentes em plantas vasculares ocorrem através de duas vias, raiz e folha. O sistema radicular é o principal órgão em contato direto com um contaminante em solução no solo, já os poluentes atmosféricos entram em contato com a planta, principalmente, através dos estômatos e cutícula das folhas (Araújo, 2009).

A absorção de substâncias pela raiz pode ocorrer pela via apoplástica (parede celular e espaços intercelulares) e via simplástica, através dos plasmodesmos, que são canais de membrana plasmática que atravessam a parede celular das células vegetais (Concenço et al., 2007). O principal meio de condução de elementos químicos na planta é através do apoplasto, que envolve geralmente transporte passivo. Este transporte ocorre devido ao fluxo de massa, onde a água se move de um local com maior potencial para outra de menor potencial, levando consigo os elementos químicos (Taiz, Zeiger, 2004). A via simplástica permite o transporte intercelular direto de

fotoassimilados, íons, fitormônios e macromoléculas de xenobióticos com características similares (Concenço et al., 2007). Poluentes gasosos podem ser absorvidos, pelas folhas, por difusão através dos estômatos (Weiss et al., 2003). A via de entrada dos contaminantes atmosféricos é dependente do número de estômatos e resistência mesofílica. Para entrada do poluente é necessário que os estômatos estejam abertos e para isso alguns fatores devem ser considerados, como luz, umidade, água, velocidade do vento, concentração de CO<sub>2</sub> interno e dos poluentes nos estômatos (Weiss et al., 2003). Outra via de contato com poluentes aéreos são as cutículas das folhas, e dependendo da substância esta pode permear a cutícula ou ser adsorvida (Weiss et al., 2003). Compostos orgânicos voláteis podem ser depositados nas superfícies das plantas e então adsorvidos, presos ou incorporados pelas cutículas, principalmente se a superfície for cerosa (Weiss et al., 2003).

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) quando absorvidos por plantas sofrem modificações dentro do organismo. Nos tecidos ocorrem um conjunto de reações, que são catalizadas por enzimas, responsáveis pela conversão das substâncias lipossolúveis em hidrossolúveis, facilitando sua eliminação. A fitodegradação destes compostos pode resultar em produtos mais tóxicos, como intermediários da fitodegradação do benzeno, ou menos tóxicos que seu precursor (Pedrozo et al., 2002).

Os mecanismos da toxicidade do benzeno ainda não estão totalmente claros, contudo existem evidências que a ação tóxica é decorrente de sua degradação, onde há formação de metabólitos como fenol, catecol e hidroquinona (Pedrozo et al., 2002). Algumas espécies

vegetais (cereais e milho) podem metabolizar benzeno em apenas alguns dias, e o fenol é o primeiro subproduto deste contaminante nos tecidos das plantas, com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (Andrade et al., 2007).

Os metabólitos hidroquinona e catecol também podem induzir o estresse oxidativo e danificar as macromoléculas celulares, sendo que o catecol facilmente oxida-se para formar espécies reativas de oxigênio (EROs) (Benndorf et al., 2001; Atkinson, 2008). A oxidação dos catecóis na presença de oxigênio formam EROs como radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^\bullet$ ), contudo, as EROs são também são produzidas normalmente pelo metabolismo vegetal. Essas moléculas, principalmente, o radical hidroxila, são muito reativas e podem ser danosas para as células se a formação de radicais livres exceder a capacidade de proteção nos organismos, e se não forem eliminadas através de sistemas antioxidantes (Ames et al., 1994; Schweigert et al., 2001). Portanto, o estresse oxidativo pode ser caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ou pela diminuição nas defesas antioxidantes. Os sistemas de defesa antioxidantes das plantas ocorrem através mecanismos não-enzimáticos e da ação enzimática, sendo que este último atua em sincronia, com superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APx) e glutatinoxidase (GPX) (Radic et al., 2010), e quando o sistema de defesa não é capaz de neutralizar totalmente as espécies reativas de oxigênio ocorre o estresse oxidativo, que pode danificar as moléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Iriti, Faoro, 2009). Em

ambiente contaminado, a formação de espécies reativas de oxigênio é intensificada e podem causar desequilíbrio no sistema de defesa das plantas gerando sintomas visíveis, que iniciam-se em nível bioquímico, seguido pela alteração estrutural e posteriormente alteração morfológica nos órgãos das plantas (Tresmondi, 2010).

Fatores ambientais e os elétrons da cadeia respiratória reduzem o gás oxigênio a radical superóxido, que por sua vez, através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD), transforma o radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Grangeiro, 2009). Apesar de não ser um radical livre, por não possuir elétrons desemparelhados, o peróxido de hidrogênio é um oxidante estável e sem carga, menos reativo que o radical superóxido, porém é um metabólito extremamente deletério, uma vez que participa da reação que produz o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), na presença de metais de transição como ferro e cobre (Ferreira, Matsubara, 1997).

Além disso, o  $H_2O_2$  tem tempo de vida longo, quando comparado com outras EROs, e é capaz de atravessar camadas bilipídicas, podendo reagir com membranas biológicas desencadeando a peroxidação lipídica, e em altas concentrações age como um agente antifúngico e antibacteriano (Resende et al., 2003). Contudo, estudos mostram que o peróxido de hidrogênio não é somente uma molécula danosa às plantas, mas pode atuar, em determinadas concentrações, como molécula sinalizadora de defesa nas espécies vegetais, isto é definido através dos níveis da ERO, controlados através da sua produção e consumo (Soares, Machado, 2007).

Uma produção prolongada do peróxido de hidrogênio pode induzir expressão de genes referentes a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APx) e glutatinoxidase (GPx), e em tecidos específicos e quantidades adequadas o  $H_2O_2$  beneficia as plantas mediando aclimatação e tolerância cruzada ao estresse biótico e abiótico (Bowler, Fluhr, 2000). Através do cruzamento oxidativo o peróxido de hidrogênio juntamente com a matriz de polissacarídeos reforçam estruturalmente a parede celular e o  $H_2O_2$  atua também como um importante substrato das peroxidases e conseqüentemente desencadeia a química da lignificação (Alvarez et al., 1998).

Durante o estresse oxidativo ocorre a indução de genes de defesa, sinalizado pelo peróxido de hidrogênio, nas diversas células do tecido, o que restringe o desenvolvimento de lesões. As espécies reativas de oxigênio sozinhas não são suficientes para disparar a morte celular, é necessário a atuação sinérgica com óxido nítrico para indução da morte celular (Resende et al., 2003).

### **3.2 Comportamento de hidrocarbonetos de petróleo em subsuperfície**

No Brasil, uma importante parcela do processo de contaminação pode ser atribuída às atividades das refinarias de petróleo e seus derivados (Freire et al., 2000). No período de 1975 a 2001, a comissão instituída para analisar o acidente na Petrobrás/REPAR

(CREA-PR), relatou cerca de 30 acidentes ocorridos com derramamento de petróleo somando milhões de litros que contaminaram o ambiente (Peralta-Zamora et al., 2004). A contaminação de aquíferos por vazamentos de petróleo em tanques de armazenamento é uma preocupação em nível mundial e tem sido muito discutida também no Brasil (Courseuil et al., 1997; Courseuil, Fernandes, 1999).

As substâncias como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são frequentemente encontradas em águas subterrâneas, por causa de vazamentos em tanques de estocagem (Mohammed, Allayla, 1997; Venkatraman et al., 1998). Os compostos aromáticos (BTEX e outros alquilbenzenos) perfazem cerca de 10 a 59% da gasolina (massa/massa), enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a 62% (Watts et al., 2000). Internacionalmente, líquidos de fase não aquosa mais leve que a água, são denominados por LNAPL (*light non-aqueous phase liquid*) e sua liberação é caracterizada por duas regiões na subsuperfície: a área fonte (LNAPL puro) e uma pluma de contaminação (Figura 4). A exemplo do benzeno, contaminante orgânico hidrofóbico (COH), quando dissolvido é transportado com o fluxo da água subterrânea. Este fato traz como principal consequência indesejada, a possibilidade desses COH nocivos atingirem fontes para abastecimento de água potável, levando a sérios problemas de saúde pública (Kaipper, 2003).



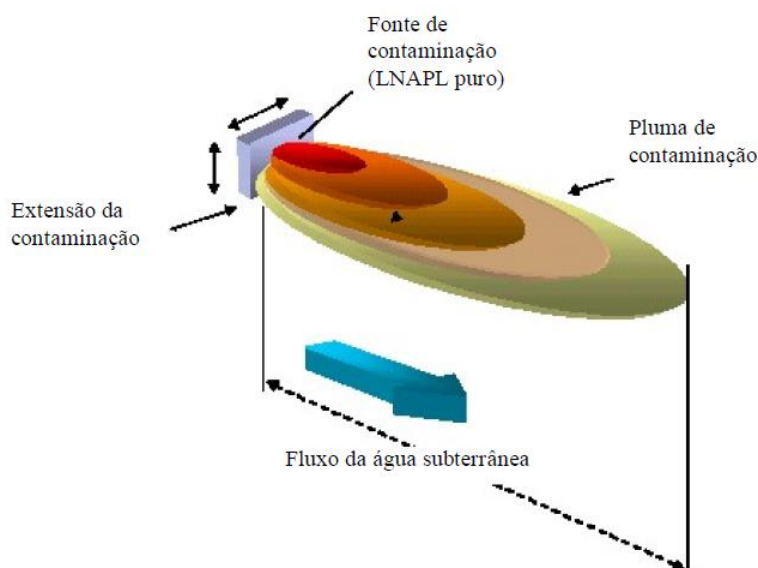


Figura 4 – Esquemática de uma contaminação por derivados de petróleo e sua distribuição do LNAPL em subsuperfície (Kaipper, 2003).

Segundo Kaipper (2003), os hidrocarbonetos do petróleo são levemente solúveis em água e, em geral, a preocupação com a saúde pública aumenta com a possível presença do etanol em subsuperfície, principalmente, quando ocorre um vazamento simultâneo de etanol e derivados de petróleo, ou de derivados de petróleo misturados com etanol (oxigenados). O etanol é um composto oxigenado totalmente solúvel na água e também em fase líquida não aquosa, desta forma, pode influenciar na magnitude e extensão da solubilidade de hidrocarbonetos tóxicos (cosolvência) em uma contaminação por petróleo.

A fração de óleo livre na zona não saturada pode continuar seu fluxo, atingindo o aquífero e devido a sua baixa solubilidade, formar uma fase líquida não aquosa (**NAPL** – *non-aqueous phase liquid*) agindo como uma fonte contínua de contaminação. A NAPL pode ser classificada como uma fase mais

densa que a água (**DNAPL** – *dense non-aqueous phase liquid*), tendendo a se depositar na base do aquífero, ou uma fase menos densa (**LNAPL** – *light non-aqueous phase liquid*) que se mantém sobre o nível d'água (Figura 5). O possível destino dos contaminantes orgânicos e seus metabólitos no ambiente inclui ainda a volatilização, biodegradação, transferência para organismos, ligações entre as partículas do solo, além da percolação para zona saturada (Cavalcanti, 2010).

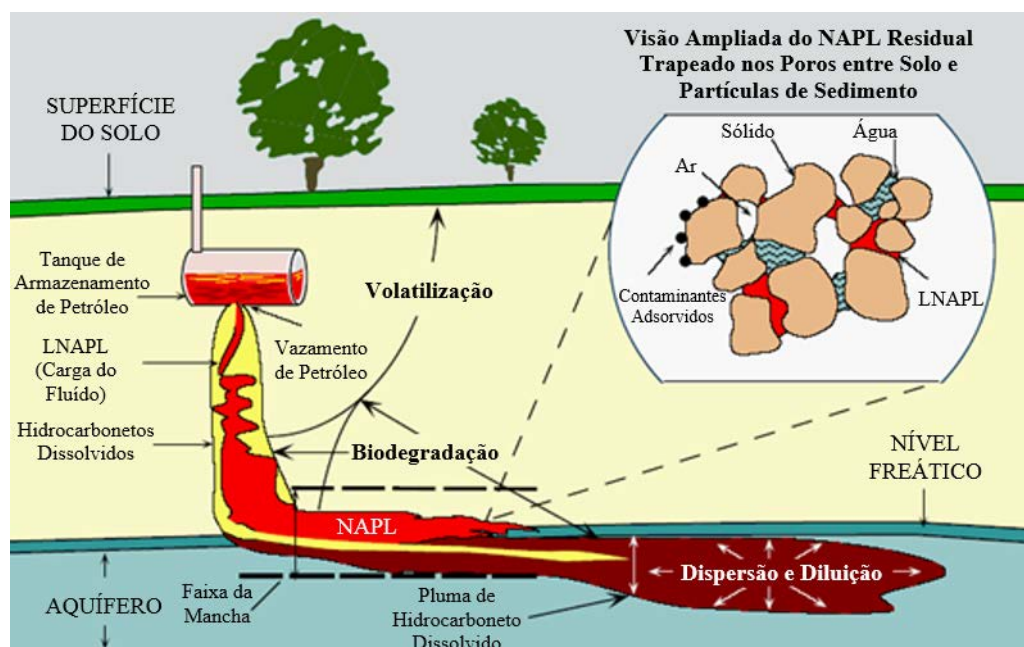


Figura 5 – Efeito da migração vertical de compostos orgânicos (LNAPL) em subsuperfície até atingir topo do aquífero. Destaque para fase residual com LNAPL trapeado, neste caso, gasolina (Stewart et al., 2009, tradução nossa).

Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam significativa mobilidade em sistemas solo-água, característica que pode ser representada significativamente pelo menor coeficiente de partição entre octanol-água. Um menor coeficiente de partição implica em uma lenta absorção no solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial

via água, migrando rapidamente para o aquífero livre (Nakhla et al., 2003). Já o  $K_{oc}$  é uma medida importante da mobilidade de um COH na matriz sólida, uma vez que é independente das propriedades do solo e justifica-se apenas, para as propriedades do composto. Dos hidrocarbonetos apresentados na Tabela 1, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) tendem a apresentar menor potencial de mobilidade na zona saturada, quando comparados ao benzeno (Kaipper, 2003).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos de importância para mobilidade de alguns hidrocarbonetos em subsuperfície

<b>Composto</b>	<b>Fórmula condensada</b>	<b>Solubilidade em água (mg/L)</b>	<b>Log<math>K_{ow}</math></b>	<b>Log<math>K_{oc}</math></b>
<b>Benzeno</b>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	1780	2,13	1,69
<b>Tolueno</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	515	2,69	2,53
<b>Etilbenzeno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	152	3,13	3,10
<b>Xileno</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	198	3,15	2,38
<b>Naftaleno</b>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	32	3,35	3,00
<b>Antraceno</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	0,05-0,07	4,63	-
<b>Fenantreno</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	1,3	4,57	4,20
<b>Etanol</b>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	∞	-0,31	-

Fonte: Kaipper, 2003, p. 19, modificado.

Notas:  $K_{ow}$ , coeficiente octanol-água;  $K_{oc}$  coeficiente carbono-água.

O entendimento do comportamento em subsuperfície dos hidrocarbonetos menos densos que a água, citado na literatura internacional, como LNAPL, ou fase líquida imiscível leve, em conjunto com as características hidrogeológicas do meio, permite estabelecer parâmetros necessários à remediação e ao monitoramento de uma área impactada por hidrocarbonetos (Sousa, 2012). Os

hidrocarbonetos presentes no petróleo compreendem classes de compostos orgânicos, como os alcanos, alcenos, alcinos, cicloalcanos e aromáticos (Kaipper, 2003).

Os hidrocarbonetos aromáticos, em particular benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX) constituem um grupo de substâncias presentes na gasolina. Os maiores problemas de contaminação pela gasolina são atribuídos a esses hidrocarbonetos monoaromáticos, que são poderosos depressores do sistema nervoso central. O benzeno é considerado carcinogênico humano por diversas organizações, tais como *International Agency of Research of the Cancer* (IARC) e a *Environmental Protection Agency* (EPA) (Silva et al., 2009).

O potencial poluente da gasolina está diretamente relacionado com os hidrocarbonetos aromáticos de maior solubilidade em água, isto é, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). Soma-se a isso, o aditivo com cerca de 20 a 25% de etanol que a gasolina comercializada em nosso país recebe fator que aumenta consideravelmente a solubilidade destes poluentes e, conseqüentemente, a sua migração para zona freática. Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado que a biodegradação do etanol consome rapidamente todos os aceptores de elétrons disponíveis no meio, o que faz com que a biodegradação dos BTEX seja drasticamente afetada. Em função destes antecedentes, a busca de novas alternativas para a remediação de águas contaminadas mostra-se absolutamente essencial (Tiburtius, Peralta-Zamora, 2005). Baseado nos critérios atuais, o benzeno é um composto aromático que à temperatura ambiente

é um líquido volátil, estável e incolor, com cheiro característico e ponto de ebulição 80,1 °C que evapora rapidamente. É altamente inflamável e pouco solúvel em água, sendo miscível com a maior parte dos solventes orgânicos. Tem a fórmula química  $C_6H_6$  com os seus átomos de carbono nos vértices de um hexágono e um átomo de hidrogênio ligado a cada carbono (Almeida, 2010).

A ocorrência de vazamentos em tanques e instalações subterrâneas faz com o LNAPL migre verticalmente na zona não saturada sob a influência da gravidade e das forças capilares. Os trabalhos de Farr et al. (1990) e Lenhard e Parker (1990) mostraram que o LNAPL não ocorre sob a forma de uma lente de óleo uniforme. O modelo conceitual proposto por esses trabalhos leva em consideração a presença, ao longo do perfil do meio poroso, de três fases: ar, LNAPL e água. Ar, LNAPL e água coexistem no meio acima do nível d'água. LNAPL e água coexistem abaixo do nível d'água e a saturação decresce com a profundidade até atingir 100 % dos poros saturados em água. Um importante fator de risco associado à presença de LNAPL no meio poroso é o potencial de migração até um receptor. No início de um vazamento, o LNAPL migra sob a influência da gravidade no meio não saturado deslocando o ar e saturando os poros vazios. O óleo é continuamente trapeado no solo enquanto migra verticalmente, diminuindo a sua mobilidade. Ao atingir a zona capilar, o LNAPL começa a deslocar a água presente no meio poroso. O potencial do óleo atingir o nível d'água torna-se em função do volume do vazamento, da espessura da zona não saturada e da litologia da área.

Quando o nível d'água desce parte do LNAPL permanece preso pelas forças capilares na zona não saturada na forma residual. Parte do LNAPL anteriormente trapeado torna-se móvel, aumentando a espessura de fase livre no poço de monitoramento. A resultante vertical do movimento do nível d'água gera uma fase residual tanto na porção não saturada quanto na porção saturada do aquífero. O contínuo processo de variação sazonal do nível d'água faz com que a espessura da lâmina de fase livre presente no poço de monitoramento, não entre em equilíbrio vertical com a formação, prejudicando a avaliação da saturação e o volume de LNAPL presente no meio poroso. O fenômeno cíclico de variação do nível d'água faz com o LNAPL tenha uma maior área de contato com a água subterrânea, aumentando a fase dissolvida (Ratnam et al., 1996).

Segundo Parcher et al. (1995), a fase residual de LNAPL resultante do movimento vertical do nível d'água é menor na porção não saturada, onde os poros são ocupados por ar, LNAPL e água, e maior na zona saturada, onde a água e o LNAPL ocupam completamente o meio poroso. Na zona não saturada, a fase residual varia de 3 a 7% e, na zona saturada, de 5 a 25%. Para Mercer e Cohen (1990), a saturação residual de LNAPL varia de 10 a 20 % na zona não saturada. A presença de LNAPL na forma de fase separada em subsuperfície atua como fonte ativa de contaminação da água subterrânea (Marinelli, Dunford, 1996). Portanto, fica evidente que a presença de óleo residual no meio poroso, demanda métodos de remediação que busquem a remoção da massa de LNAPL da fase residual.

### 3.3 Espécies vegetais

Selecionou-se as espécies vegetais de maneira que representassem grupos taxonômicos distintos (vascular sem semente, monocotiledônea e eudicotiledônea), pois estas possuem diferentes características morfoanatômicas e fisiológicas. Também buscou-se espécies que fossem comuns em ambientes antropizados e de fácil propagação. Tendo isso em consideração e baseando-se em literatura sobre indícios de potencial fitorremediador de espécies vegetais, selecionou-se *Pteris vittata* L. (vascular sem semente), *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf (monocotiledônea) e *Impatiens walleriana* Hook. f. (eudicotiledônea).

#### 3.3.1 *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf

*Brachiaria brizantha* (Figura 6) é uma gramínea da família Poaceae originária de região vulcânica da África, de clima tropical (Pita-Barbosa et al., 2009). Foi introduzida nas Américas, provavelmente, como cama para os escravos em navios negreiros, no período colonial (Parsons, 1972). Na bovinocultura, espécies do gênero *Brachiaria* são as mais utilizadas como forrageiras (Pita-Barbosa et al., 2009). Atualmente, o capim braquiária é cultivado em 80 milhões de hectares, sendo *B. brizantha* e *B. decumbens* (Stapf) Prain. as espécies

predominantes (Boddey et al., 2004). Considerando a ampla utilização de *B. brizantha* como forrageira na alimentação de bovinos, este estudo contribuirá com informações sobre um provável acúmulo de benzeno nesta espécie e uma possível interferência na cadeia alimentar.

Esta espécie caracteriza-se por possuir elevada produção de forragem, tolerância a solos ácidos, ao calor (seca e fogo) e à deficiência hídrica, no entanto não suporta solos saturados e tem pouca tolerância ao sombreamento. Absorve os nutrientes nas camadas mais profundas do solo, é bastante persistente e de estabelecimento rápido. *Brachiaria brizantha* apresenta um sistema radicular vigoroso e profundo responsável por seu maior tempo de permanência verde (Meirelles, Mochiutti, 1999; Brito, Rodella, 2002; Peternelli, 2003). É uma espécie perene, robusta podendo formar touceiras que variam entre 1,5 e 2,5 m de altura sendo considerada, por esse motivo, uma planta cespitosa. Os estômatos na *B. brizantha* são encontrados em ambas as faces da folha denominada anfiestomática.

*Brachiaria brizantha* tem sido estudada desde a década passada em relação ao seu poder de fitorremediação de alguns compostos, entre eles o BTEX. Hernández-Valencia e Mager (2003) estudaram a capacidade de *B. brizantha* na fitorremediação de solo contaminado com petróleo e observaram que houve redução da biomassa foliar e radicular, mas houve redução significativa do teor de óleo no solo. Merkl et al. (2005) testando a capacidade de leguminosas e gramíneas na estimulação de microrganismos para degradação de óleo cru em solo, verificou que *B. brizantha* reduziu a concentração do óleo e apresentou considerável redução de hidrocarbonetos aromáticos.



Aguiar (2006) verificou o desempenho de *B. brizantha* na fitorremediação de solos contaminados com óleo cru, e aos 30 dias a espécie promoveu redução de BTEX em solo. Há também estudos de fitotoxicidade com a espécie *B. brizantha* exposta a diferentes substâncias químicas, como herbicida Picloran (Carmo et al., 2008) e o fluoreto (Pita-Barbosa et al., 2009).

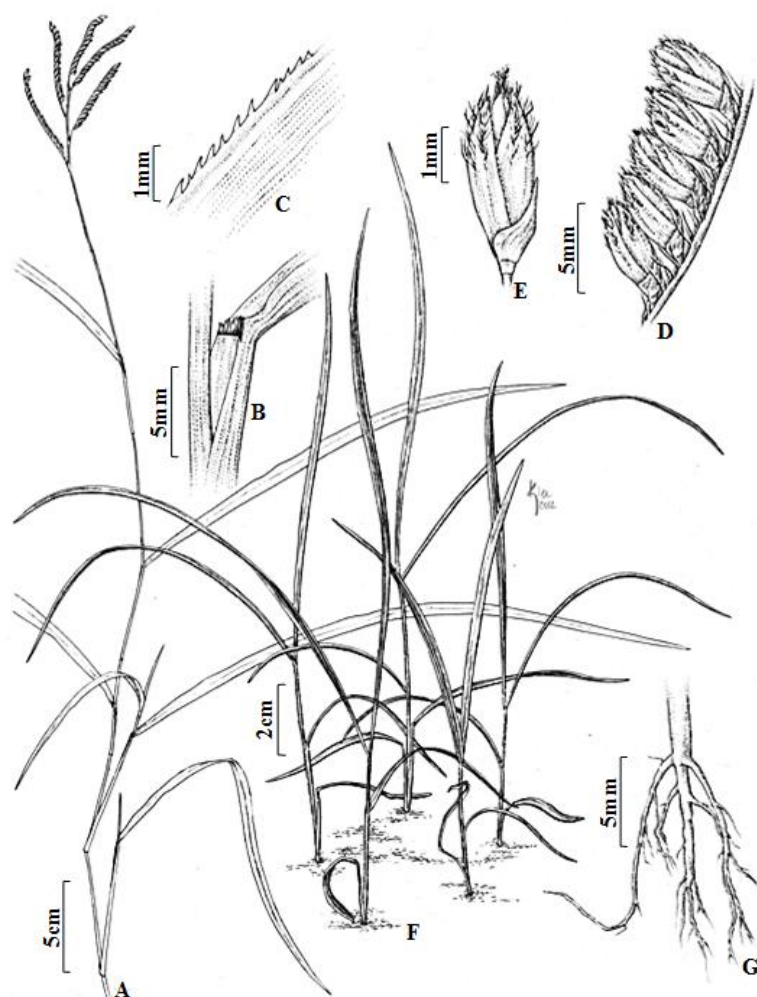


Figura 6 – *Brachiaria brizantha* e suas estruturas. **A** - Hábito. **B** - Base da folha com lígula e bainha roliça. **C** - Limbo com recorte marginal serrado. **D** - Racemo. **E** - Espigueta pilosa. **F** - Colmos eretos perfilhados. **G** - Raiz fasciculada (Campos et al., 2014).

### 3.3.2 *Impatiens walleriana* Hook. f.

*Impatiens walleriana* (Figura 7) é uma das 1000 espécies da família Balsaminaceae, pertencendo ao maior gênero de plantas com flores (Janssens et al., 2009). É uma herbácea ornamental (Maciel, 2011) originária de diversas regiões do mundo (Yuan et al., 2011). Apresenta porte de 20 a 60 cm de altura e produz flores com cinco pétalas das mais variadas cores, sendo vermelha, rosa e branca as mais comuns (Armitage, 1994). Por ser pouco exigente, a espécie se reproduz em quase todos os locais onde caem suas sementes, produzidas em um fruto tipo cápsula. *Impatiens walleriana* é uma espécie muito utilizada em jardim, sendo que produtores dessas cultivares tem desenvolvido plantas compactas, bem ramificadas e com diferentes colorações de flores (Armitage, 1994). Apresenta a característica de enraizar facilmente quando algum nó entra em contato com o solo, desta forma, torna-se de fácil propagação (Carpanezi, 2007). Os estômatos de suas folhas são encontrados somente na face abaxial, denominadas hipoestomáticas. Aparece em sub-bosques de Floresta Ombrófila Mista, tendo preferência por locais parcialmente sombreados, com muita matéria orgânica e umidade. É encontrada em abundância nos locais sombreados, onde houve modificação do sub-bosque (retirada ou redução de espécies nativas) e em áreas de florestas úmidas (Pastore et al., 2012).

*Impatiens walleriana* é eficaz na remoção de metais de solos contaminados por resíduos sólidos, apresentando bioacumulação

de metais como cobre, zinco, cromo e níquel (Schenato et al., 2008). Essa espécie também é capaz de acumular mercúrio, apresentando uma maior concentração nas folhas que nas flores e caules (Pant et al., 2011), zinco (Torrecilha et al., 2013) e cádmio (Lin et al., 2010; Wei et al., 2012). Em relação ao cádmio, Lai (2015) verificou que há uma relação linear positiva entre área foliar, taxa transpiratória e acúmulo de cádmio em *I. walleriana*. Segundo o autor a maior parte do cádmio acumulado nas raízes e folhas de *I. walleriana* foi compartimentado, respectivamente, na fração solúvel da célula e parede celular.

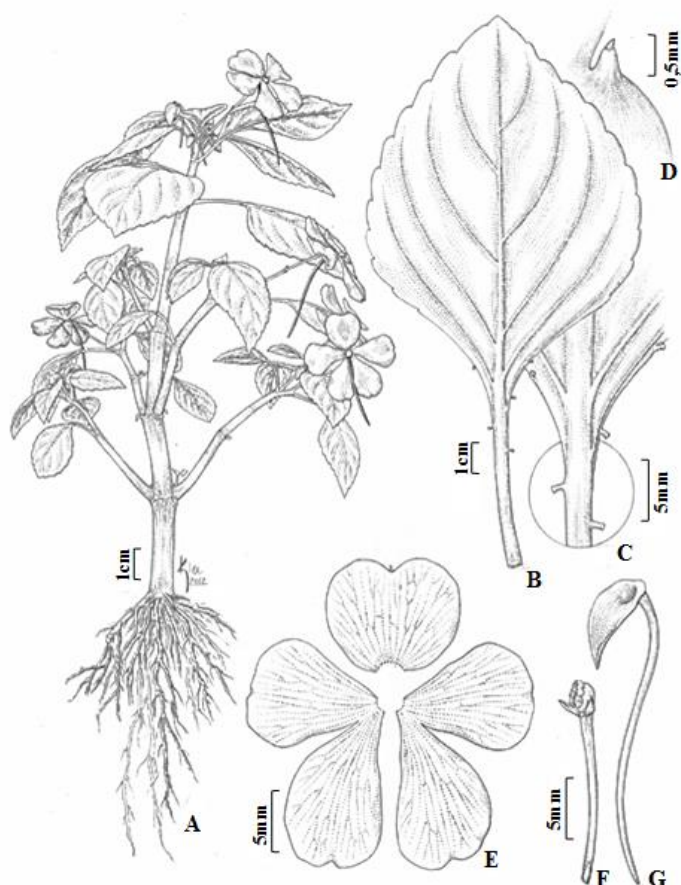


Figura 7 – *Impatiens walleriana* e suas estruturas. **A** - Hábito. **B** - Face abaxial da folha ovada-lanceolada com margem crenada-serreada e venação penínervia. **C** - Pecíolo provido de esparsos nectários extraflorais. **D** - Esporão delgado. **E** - Pétalas anterior e lateral. **F** - Estame com antera evidente. **G** - Sépala posterior (Campos et al. 2014).

### 3.3.3 *Pteris vittata* L.

As espécies popularmente conhecidas como samambaias são plantas vasculares sem sementes reunidas em 32 famílias com aproximadamente 250 gêneros e cerca de 10.000 espécies de distribuição ampla (Prado, 1997). A espécie mais conhecida no Brasil é *P. vittata* (Figura 8), que apresenta comportamento de planta ruderal propagando-se facilmente em ambiente artificial (Campos, 2003). Os estômatos são encontrados apenas na face abaxial da lâmina foliar, denominada hipoestomática, e apresentam-se entre as nervuras, possuindo tamanhos iguais.

*Pteris vittata* tem sido estudada especialmente em relação à fitorremediação de arsênio (Ma et al., 2001; Wang et al., 2002; Tu, Ma, 2003; Singh et al., 2006; Zhang et al. 2004), sendo extremamente eficiente na extração desse contaminante do solo e na translocação para parte aérea (Ma et al., 2001). Segundo Wang et al. (2002) o arsenato é facilmente absorvido por *P. vittata* devido à sua similaridade com o fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e utilizam as mesmas enzimas transportadoras das raízes. A aplicação de fosfato pode ser uma estratégia importante para o uso eficiente de *P. vittata* na fitorremediação de arsênio em solos contaminados, pois resulta em um aumento significativo na absorção deste poluente (Tu, Ma, 2003). Singh et al. (2006) estudando espécies do gênero *Pteris* expostas ao arsênio, verificaram que este contaminante não causa sintomas visíveis de toxicidade em *P. vittata*, pois aparentemente a espécie possui um

eficiente sistema antioxidante que atenua o estresse oxidativo causado pelo arsênio. Para o autor a maior resistência desta espécie ao arsênio, pode estar associada a capacidade de manter um aumento coordenado na concentração de clorofila, carotenoides, glutathiona e ascorbato, resultando em menor produção de  $H_2O_2$ , peroxidação lipídica e estabilidade da membrana. Estudo realizado por Zhang et al. (2004) sugere que fitoquelatinas podem desempenhar um papel na desintoxicação de *P. vittata* exposta ao arsênio, além de um mecanismo independente que envolve o sequestro desta substância em vacúolos.

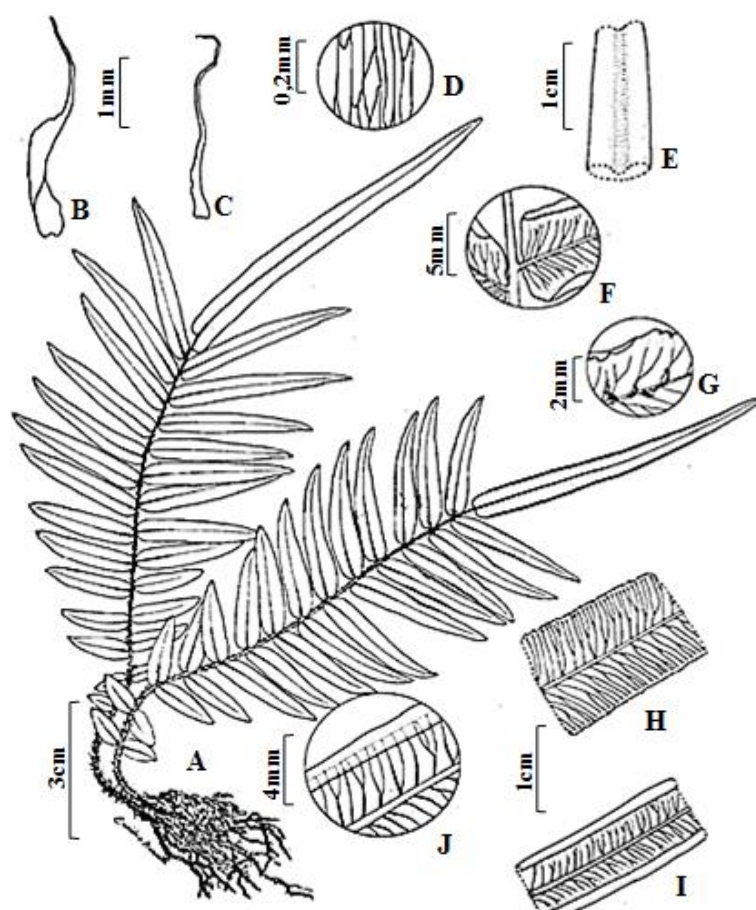


Figura 8 – *Pteris vittata* L. (Prado, Windisch, 2000). **A** - Hábito. **B**, **C** - Escamas do caule. **D** - detalhe das células da escama. **E** - Pecíolo sulcado. **F** - Detalhe da inserção das pinas na raque. **G** - Vista adaxial da costa. **H** - Padrão de venação da fronde estéril. **I** - Padrão de venação da fronde fértil. **J** - Detalhe da margem da fronde fértil.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, o solo utilizado foi o Latossolo Vermelho distrófico (LVd) com 8,74% de ferro endógeno cristalino. A amostra foi coletada no município de Campinas, a partir de zonas não compactadas (0,00 – 0,20 m). O solo foi selecionado tomando-se como referência, tanto o teor ferro, como sua constituição mineralógica, na fração argila. O percentual de goethita ( $\alpha$ -FeO.OH) e hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) foi estimado por difratometria de raios X (Siemens D5000 com radiação CuK $\alpha$ ) com varredura escalonada (“step counting” 0,02°2 $\theta$ /20 s), obtido pela relação Gt/Gt + Hm e relacionando-as com o teor de óxido de ferro, obtido pelo tratamento com ditionito-citrato-bicarbonato de sódio (Holmgren, 1967 e Kampf, Schwertmann, 1998). A hematita foi dissolvida com HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e o ferro extraído, determinado através do espectrômetro de absorção atômica com chama AAS 6 Vario (Analytik Jena AG). A relação hematita/(hematita + goethita) foi calculada da intensidade dos reflexos Hm(012) x 3,5 e Gt(110).

*Brachiaria brizantha* foi semeada em substrato comercial, composto de origem mineral enriquecido com húmus. Em cada vaso foram colocados dez gramas de sementes a lanço e cobertos por uma camada de um centímetro de substrato. Após, aproximadamente, 52 dias de semeadura quando as plantas atingiram cerca de 10 cm, foi realizado o desbaste para uniformizar o estágio de

desenvolvimento. Ao atingir o estágio de quatro folhas, as plantas foram replantadas no solo analisado (Latossolo Vermelho distrófico - LVd) e expostas ao contaminante (Barbosa et al., 2009).

*Impatiens walleriana* por ser uma planta ornamental é facilmente encontrada nas floriculturas na forma de mudas. Sua propagação foi realizada por estaquia, devido à facilidade de enraizamento desta espécie. As estacas foram retiradas dos ramos laterais (5 cm), sem flores, cortadas em bisel, retirando-se o excesso de folhas e tratando-as com ácido indolbutírico, quando necessário. Foram efetuadas seis estacas por vaso, em substrato comercial para plantas ornamentais. As mudas permaneceram em local sombreado e foram cobertas com plástico transparente, para manter a umidade até o aparecimento das raízes. Quinze dias após a estaquia, quando já tinham atingido seu crescimento vegetativo e apresentaram as primeiras folhas (Ramos, 2003), as plantas foram replantadas no solo LVd e expostas ao benzeno.

*Pteris vittata* foi obtida através de germinação *in vitro*, pelo método de Knop e *in vivo*, em vasos de cimento contendo tijolo fragmentado. Os esporos foram obtidos de frondes férteis que apresentavam soros maduros, a separação foi efetuada em peneira de malha 120. A solução de Knop foi preparada em pH 5,7, contendo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  510 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{KNO}_3$  120 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  144 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250 mg L<sup>-1</sup> e 1 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Para desinfecção, os esporos foram agitados por 20 minutos em soluções de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, com adição de Tween 20. Posteriormente, foram inoculados nos meios de

cultivo (*in vitro*), com o auxílio de uma espátula metálica. A solução de Knop foi distribuída em tubos de ensaio, com ponte de papel filtro. Todo material inoculado foi mantido em temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas, além de irrigações com água destilada (Borelli et al., 1990). A cultura *in vivo* foi realizada em vasos de argamassa, usualmente contendo cimento, cal hidratada e areia, quando as plantas apresentavam as folhas expandidas, elas foram transferidas para vasos contendo porções de LVd (solo analisado) com pedrisco, areia e tijolo fragmentado.

#### **4.1 Injeção de benzeno no solo**

A primeira série experimental constou de ensaios de tolerância das espécies vegetais, através da injeção direta de benzeno no solo, próximo ao sistema radicular. Para esta fase utilizou-se de delineamento experimental inteiramente casual, com três repetições para contaminação de benzeno, além da série controle.

Os experimentos de absorção direta consistiram, basicamente, da injeção de benzeno no solo (20 mg L<sup>-1</sup>). O experimento foi realizado em incubadora, com a temperatura mantida a 25 °C, durante um período de dez dias. O fotoperíodo foi mantido por 16 horas diárias com iluminação proporcionada por lâmpadas fluorescentes de 40 W. Após os dez dias de contato com o benzeno, procedeu-se o corte de cada espécie separando-se caule, folha e raiz para quantificação do



teor de benzeno. O estabelecimento do potencial de cada espécie vegetal, em absorver substância química como o benzeno, através das raízes, torna-se uma etapa inicial no estudo da fitorremediação de ambientes contaminados. Neste caso, a absorção direta pelas raízes, pode levar a distúrbios na estrutura das folhas sem, necessariamente, comprometer a superfície foliar.

Nesta fase experimental, os efeitos da idade das plantas e duração do fotoperíodo não foram avaliados. Para os experimentos de absorção direta foram utilizadas plantas de mesma idade, indivíduos jovens, e mesmo fotoperíodo. Direcionou-se, essencialmente, para sintomatologia frente à poluição de benzeno no solo, buscando o entendimento da acumulação e translocação, como também compreensão das alterações micromorfológicas e histoquímicas nas folhas das espécies vegetais.

#### 4.1.1 Índice de translocação e fator de bioacumulação

Para avaliar o potencial remediador e tolerância de cada espécie diante da absorção de benzeno, buscou-se o índice de translocação (IT) da substância na planta. Através da análise do teor de benzeno no solo foi possível obter, também, o fator de bioacumulação (FA). O fator de bioacumulação do benzeno foi obtido pela divisão entre a concentração, em  $\text{mg L}^{-1}$ , da substância na parte aérea da planta e a concentração do contaminante disponível no solo, extraído pelo

método por agitação (Shin, Kwon, 2000) e determinado segundo USEPA 5030B com 8260B. Já a taxa de transferência foi obtida pela divisão entre a concentração do benzeno na parte aérea e a concentração na planta.

$$FA = \frac{\text{Concentração de benzeno na parte aérea}}{\text{Concentração de benzeno no solo}}$$

$$IT = \frac{\text{Acúmulo de benzeno na parte aérea}}{\text{Acúmulo de benzeno na planta}} \times 100$$

Os extratos orgânicos, das amostras vegetais, expostas ao benzeno foram extraídos com diclorometano ultrapuro, em mesa agitadora, por 60 minutos. O extrato orgânico foi, então, concentrado a um volume de 1 mL em evaporador. O concentrado final foi injetado, sem divisão de fluxo, em uma coluna de fase estacionária HP-1, acoplada a um detector de ionização por chama. A programação de CG volta-se para injetor a 300 °C com temperatura inicial da coluna em 60 °C. A taxa de aquecimento foi de 9 °C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 310 °C, com isoterma por 13 minutos. O gás de arraste utilizado foi hélio (99,999% de pureza) em fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Para evitar erros na etapa de preparação das soluções e correção da porcentagem de pureza, as soluções estoque foram também quantificadas por GC/MS, Agilent Technologies, modelo 5975C com ALS 7693. A água utilizada, nos experimentos de caráter quantitativo, foi ultrapura (modelo Milli-Q, da Millipore) e como conduta, os sistemas foram preparados em triplicata.

#### 4.1.2 Curva dose-resposta

Pretendeu-se estimar as relações entre dose e resposta para diferentes concentrações de benzeno. A avaliação dose-resposta implica considerar que as plantas frequentemente diferem em suscetibilidade a um mesmo poluente. Foi verificada também, a dose na qual não se observa nenhum efeito. Os dados foram analisados quanto a homogeneidade da variância e normalidade. Para construção das curvas de dose-resposta foi utilizado SigmaPlot® e Origin 9.0.

As curvas dose-resposta tiveram os dados ajustados ao modelo de regressão não linear do tipo logístico. A equação matemática adotada que relaciona a resposta da planta com a curva dose-resposta para a substância contaminante foi estabelecida por Seefeldt et al. (1995). Para ajuste da equação (1) e obtenção dos parâmetros estatísticos, os dados foram submetidos a análise de regressão não linear. A partir da equação foi construído gráfico utilizando a escala logarítmica para a dose de benzeno. O delineamento experimental adotado foi o de bloco ao acaso, com três repetições e sete doses de benzeno que variaram de zero a 1600 mg L<sup>-1</sup> aplicadas diretamente no solo. A aplicação de benzeno em diferentes doses estendeu-se por 60 dias e foi realizada utilizando-se pipetador de precisão, para adicionar as soluções na superfície do solo. Os sintomas de fitotoxicidade ou a ausência deles foram avaliados visualmente, atribuindo-se notas entre zero e 100%, sendo: zero, para ausência de sintomas, a 100%, para

morte da planta. A escala percentual foi utilizada para satisfazer exigência do modelo log-logístico proposto por Seefeldt et al. (1995).

$$y = \frac{a}{[1 + (\frac{x}{b})^c]} \quad (1)$$

Onde:  $y$  = porcentagem controle;  $x$  = dose de benzeno;  $a$ ,  $b$  e  $c$  = parâmetros da curva, sendo  $a$  diferença entre o ponto máximo e mínimo da curva. O parâmetro  $b$  descreve a declividade da curva em torno do  $C_{50}$  e  $c$  é a declividade da curva.

Aos 60 dias após o contato avaliou-se a massa da matéria seca obtida por meio de pesagem do material colhido, seco em estufa de circulação forçada (70 °C) por 72 horas.

## 4.2 Aspersão de benzeno nas espécies vegetais

Para os experimentos de aspersão, as plantas foram submetidas à nebulização com solução aquosa de benzeno, em concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> e de 1600 mg L<sup>-1</sup>. O nevoeiro, aplicado no interior da câmara de nebulização, teve duração de 10, 30 e 60 dias. As plantas do tratamento controle foram submetidas ao nevoeiro, utilizando-se apenas água deionizada com os mesmos períodos. A série experimental foi realizada no laboratório de biologia da Universidade Aberta do Brasil, polo Itapetininga. Anteriormente à contaminação por benzeno as folhas ou ramos de cada espécie foram identificadas com

papel adesivo. Como critério, efetuou-se a escolha de folhas expandidas e verdes.

A câmara de nebulização utilizada (Figura 9) foi confeccionada em vidro, com dimensões de 25 x 35 x 15 cm e acoplada a um nebulizador pneumático a jato de ar. A câmara foi coberta por filme PVC, para eliminar a transferência de massa de benzeno para o ar.

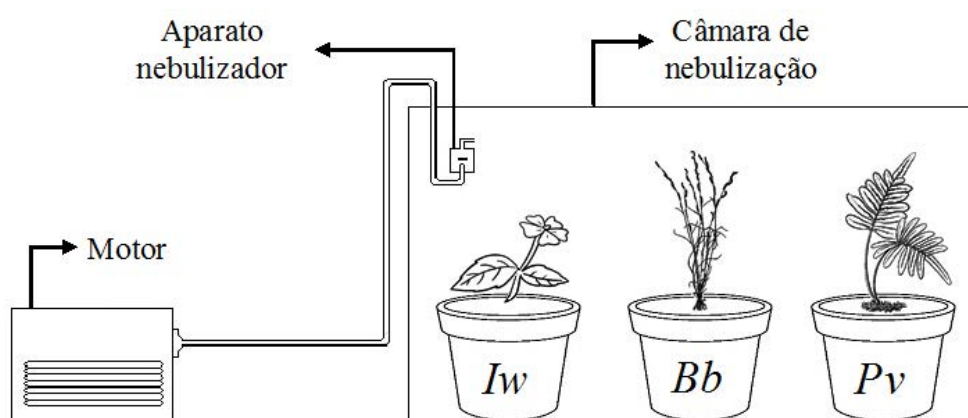


Figura 9 – Representação esquemática do sistema de nebulização, onde cada espécie vegetal, foi exposta a diferentes concentrações de benzeno (*Iw* = *I. walleriana*; *Bb* = *B. brizantha*; *Pv* = *P. vittata*).

O sistema permitiu uma taxa de nebulização de  $0,17 \text{ mL min}^{-1}$  produzindo partículas de 1 a 5 micron, compatíveis com as dimensões dos estômatos. As três espécies foram submetidas a nevoeiro, diariamente, por uma hora de exposição, em capela de exaustão, utilizando 10 mL de solução do contaminante (Figura 10).

As alterações visíveis na superfície foliar ou até a morte de indivíduos foram registradas, diariamente, através de anotações e imagens fotográficas. Ao término da simulação foram efetuadas coletas de amostras foliares para análise micromorfológica.

Os experimentos de laboratório consistiram da avaliação da concentração de equilíbrio de benzeno puro em água. A magnitude da concentração de equilíbrio para o benzeno foi de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . A escolha da dosagem baseou-se na concentração máxima permitida pela Organização Internacional do Trabalho (OIT), estipulada em 02 de junho de 1971, que estabelece a concentração máxima na atmosfera de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . As concentrações aquosas de equilíbrio no sistema benzeno-água foram até próximo ao ponto de saturação, ou seja,  $1600 \text{ mg L}^{-1}$ . Previamente à sua aspersão nas câmaras de nebulização, a solução estoque permaneceu em agitação, em ambiente fechado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante três dias, de modo a homogeneizar o sistema e garantir a máxima solubilidade de benzeno em água.

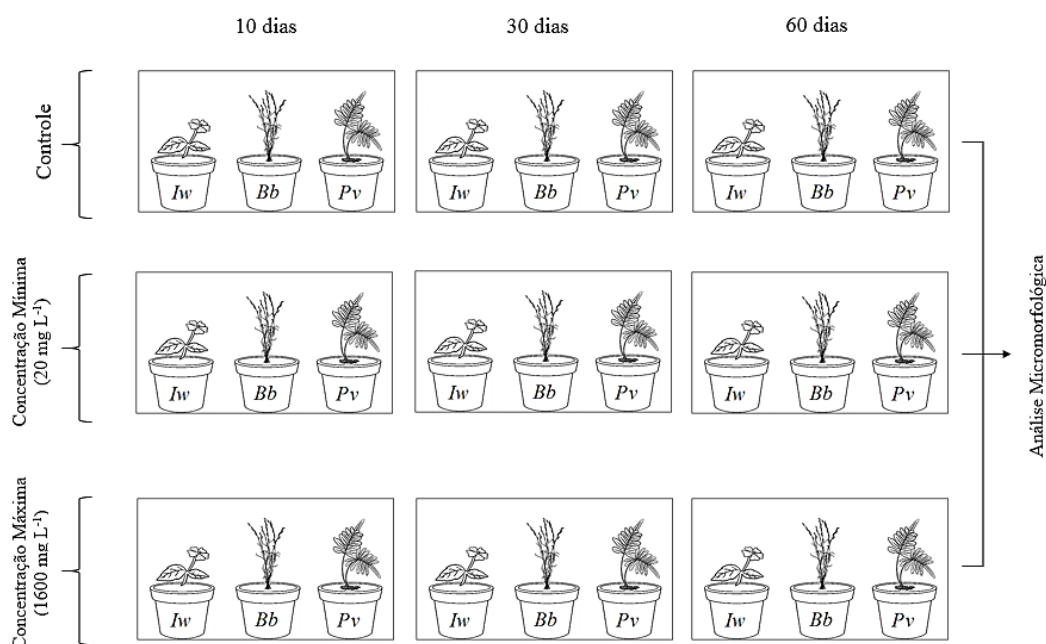


Figura 10 – Fluxograma com o direcionamento para os experimentos de aspersão de benzeno, envolvendo o tratamento controle, concentração mínima e máxima do contaminante, períodos e espécies estudadas (*Iw* = *I. walleriana*; *Bb* = *B. brizantha*; *Pv* = *P. vittata*).

### 4.3 Coleta e análise das amostras após os tratamentos

As coletas foram realizadas no dia seguinte a última aspersão e injeção de benzeno no solo, onde estabeleceu-se um padrão para coleta das folhas para as análises histoquímica e micromorfológica.

Para *B. brizantha* priorizou-se a coleta das folhas da base para o ápice, uma vez que são as folhas mais velhas, tornando-se uma maneira confiável de constatar que estas foram expostas pelo período desejado. Para *I. walleriana* foram escolhidas folhas do 4º e 5º nós, respectivamente, para a análise micromorfológica e histoquímica. Para *P. vittata* coletou-se, do ápice para a base, o primeiro e segundo par de folíolos para análise histoquímica. O quinto par de folíolos foi coletado para análise micromorfológica (Figura 11).

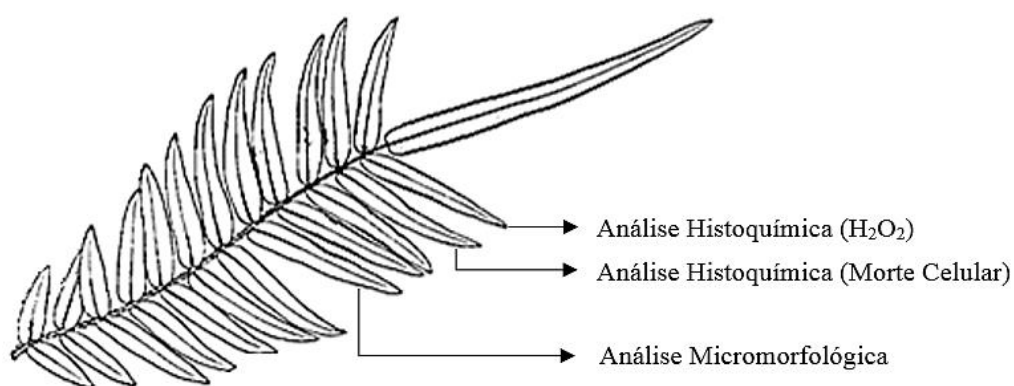


Figura 11 – Representação esquemática da folha composta de *P. vittata* com indicações dos folíolos selecionados para cada análise.

Para avaliação dos danos na superfície foliar e densidade estomática, as amostras foram fixadas em solução aquosa de

glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico. A superfície foliar foi recoberta com ouro, em metalizador Sputter-Coating Emitec K550 e analisada em microscópio eletrônico de varredura FEI, modelo Quanta 250. A análise de imagem foi efetuada através da utilização do software ImageJ, mediante o uso de eletromicrografias, determinando-se a densidade estomática, área, perímetro e diâmetros (maior e menor) de cada estômato, para comparação com os indivíduos saudáveis. Utilizar ferramentas adequadas de seleção de características quantificáveis, pode evidenciar aspectos de tolerância e/ou adaptação de cada espécie ao benzeno.

Para o entendimento das alterações histoquímicas foram realizados testes para verificar a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de morte celular.

Para o acúmulo de peróxido de hidrogênio dois fragmentos de folhas frescas com cerca de  $1\text{ cm}^2$  foram coletados. As amostras foram imersas em solução de  $1\text{ mg mL}^{-1}$  de 3,3' - diaminobenzidina (DAB)-HCl, (pH 5,6 ajustado com hidróxido de sódio) e incubados em câmara escura por oito horas. Em seguida, os fragmentos foram clarificados em álcool a 95% (Faoro et al., 2001) e montados em glicerina 50%. As células que apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio adquiriram a coloração marrom.

Para o estabelecimento do acúmulo de  $H_2O_2$  nas plantas, foi quantificado o número de plantas que apresentaram esse acúmulo (N=3). E avaliou-se na área de, aproximadamente,  $0,04\text{ mm}^2$  dos fragmentos (N=6), o número de células que apresentaram a coloração



marrom característica, considerando 4 classes: 1 (1-5 células coradas em marrom), 2 (6-10 células), 3 (11-15 células) e 4 (16-20 células) (Pedroso, 2009).

Na determinação da morte celular dois fragmentos de cada folha fresca coletada, com cerca de  $1 \text{ cm}^2$ , foram fervidos por um minuto em mistura de ácido láctico, fenol, glicerina e água contendo  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  de azul de Evans (1:1:1:1) (Iriti et al., 2003). Logo após, os mesmos foram clarificados por 24 horas em solução aquosa de  $2,5 \text{ g mL}^{-1}$  de cloral hidratado (Iriti et al., 2003), e montados em glicerina 50%. As células mortas foram evidenciadas pela coloração azul, em contraste com as células saudáveis que se apresentaram transparentes. Para quantificação do número de células com morte celular, foi avaliado o número de células com a coloração azul característica em toda a área de, aproximadamente,  $0,04 \text{ mm}^2$  dos fragmentos (N=6), utilizando o mesmo padrão de classes, e o número de plantas que apresentaram células mortas (N=3) (Pedroso, 2009).

As amostras em ambos os testes foram analisadas em microscópio de campo claro equipado com sistema de captura de imagens.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Injeção de benzeno no solo

O meio mais diretamente afetado pela contaminação antrópica é o solo e, posteriormente, as águas subterrâneas. Do ponto de vista hidrogeológico, os processos e fatores que interferem na qualidade das águas subterrâneas podem ser externos, ou mesmo intrínsecos ao aquífero (Menezes, 2012). Inicialmente, a água subterrânea tende a aumentar concentrações de substâncias dissolvidas à medida que se move, lentamente, nos diferentes aquíferos, a partir das litologias atravessadas (Rebouças et al., 2006). A mobilidade de metais traço, por exemplo, bem como sua acumulação no solo, ocorre devido a diversos tipos de mecanismos que envolvem reações químicas como potencial redox, precipitação, dissolução, sorção e dessorção (Singh, Steinnes, 1994). O principal fator de controle e concentração de metais traço na água subterrânea é a adsorção em hidróxido de ferro. As propriedades físico-químicas do solo foram determinadas e são apresentadas na Tabela 2, e o percentual de goethita ( $\alpha$ -FeO.OH) e hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) estão organizados na Tabela 3.

Tabela 2 – Análise físico-química do solo estudado LVd – Latossolo Vermelho distrófico

MO	pH	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H+Al	CTC	Textura	TA
17	5,1	13	3,8	10	5	26	46,5	argilosa	64,5

Nota: MO (g dm<sup>-3</sup>); S e P (mg dm<sup>-3</sup>); K, Ca, Mg, H+Al e CTC (mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>); TA, teor de argila (%).

Tabela 3 – Teor de goethita e hematita na fração argila do solo LVd.

LVd	goethita (%)	hematita (%)	cor
	9,56	90,44	2,5 YR

Neste caso, o Latossolo Vermelho distrófico utilizado neste estudo pode cumprir a função de retenção de metais traço no solo, deixando margem para estudo de poluentes orgânicos, a exemplo dos hidrocarbonetos aromáticos (BTEX).

As alterações fisiológicas das plantas, em virtude da contaminação por hidrocarboneto de petróleo ocorrem, de maneira geral, com a perda ou deficiência de pigmentos fotossintetizantes (clorofila a, b) e queda no teor de água e de assimilados, como amido, açúcares, gorduras e proteínas (Quitério, 2010). Morfologicamente, as plantas passam a apresentar menor densidade e altura quando comparadas a plantas crescidas sem influência do contaminante (Griffiths, 1975). A queda no teor de clorofila, observada através de descoloração das folhas, foi muito rápida e notável, posteriormente, à injeção de benzeno em *I. walleriana* e *B. brizantha*. Em *B. brizantha* o teor de benzeno, ao final do tratamento no solo levou à morte da planta,

provavelmente, por interromper a respiração da raiz ou mesmo, pela acidificação da água contida no solo. Em *I. walleriana* ocorreu crescimento debilitado da parte aérea e perda de folhas, mas a planta sobreviveu ao solo contaminado por benzeno. *Pteris vitatta* não apresentou sintomas visíveis e sobreviveu a exposição ao benzeno.

Para os experimentos de absorção direta, observou-se o teor mínimo de benzeno na parte aérea (caule, folha e flor) e da parte subterrânea (rizoma e raiz) (Figura 12). Em geral, houve maior concentração na parte aérea, seguido do sistema radicular.

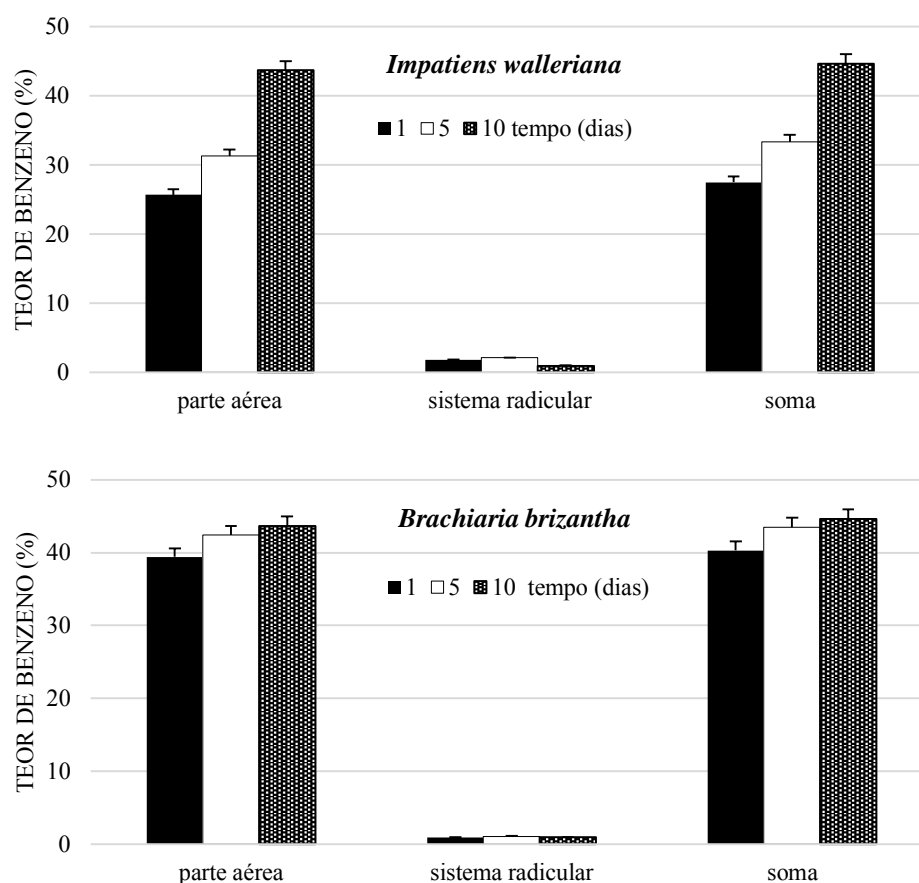


Figura 12 – Teor de benzeno aplicado nas amostras vegetais (*I. walleriana* e *B. brizantha*), separadas entre parte aérea (caule, folha e flor) e sistema radicular, com relação ao teor encontrado no solo. O experimento foi realizado em dez dias e os valores representam a média de três repetições. As barras de erro representam o desvio padrão para n = 3.

Os critérios utilizados para estimar o potencial de fitorremediação de plantas são o fator de bioacumulação (FA) e o índice de translocação (IT) (Zhang et al., 2010; Ngyen et al., 2011).

O fator de bioacumulação, definido como a razão entre a concentração do contaminante na parte aérea em relação ao solo, é uma medida da capacidade de uma planta absorver o contaminante do solo e transportá-lo da raiz para parte aérea, onde pode ser facilmente colhida (McGrath, Zhao, 2003). Plantas hiperacumuladoras apresentam fator de bioacumulação geralmente  $> 1$ , e em alguns casos atingindo valores muito superiores. Estas plantas apresentam uma eficiente translocação do contaminante da raiz para parte aérea.

Outra medida importante para avaliar o potencial fitorremediador de espécies vegetais é o índice de translocação da substância na planta, que refere-se ao movimento ou à transferência do contaminante da raiz para a parte aérea da planta, sendo representado pela porcentagem acumulada na parte aérea em relação quantidade total acumulada na planta (Abichequer, Bohnen, 1998). Os valores referentes ao fator bioacumulação e índice de translocação para o benzeno são apresentados nas Figuras 13 e 14.

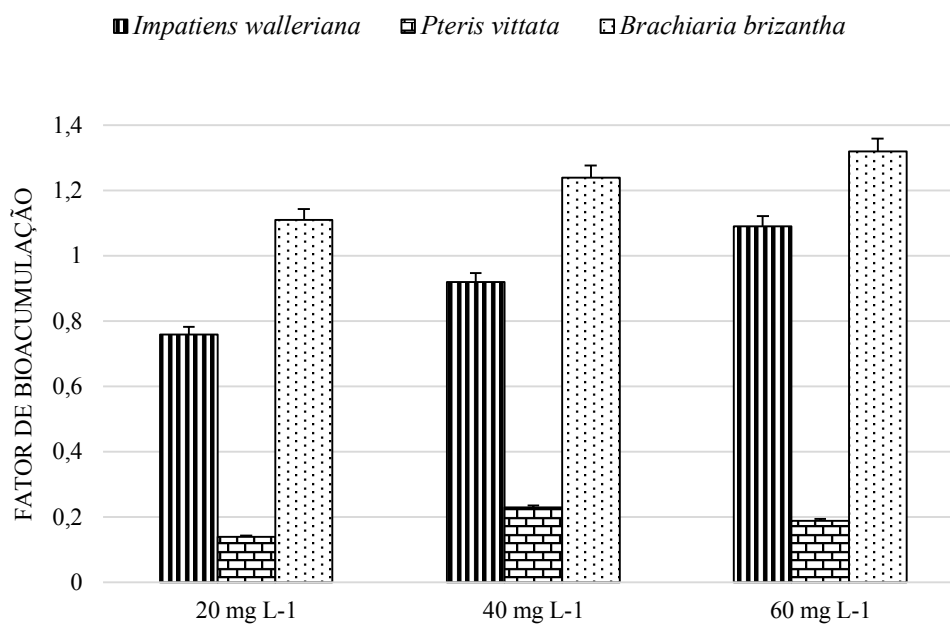


Figura 13 – Valores médios referentes ao fator de bioacumulação de benzeno na *I. walleriana*, *P. vittata* e *B. brizantha*, em solos contaminados artificialmente com benzeno (20, 40 e 60 mg L<sup>-1</sup>).

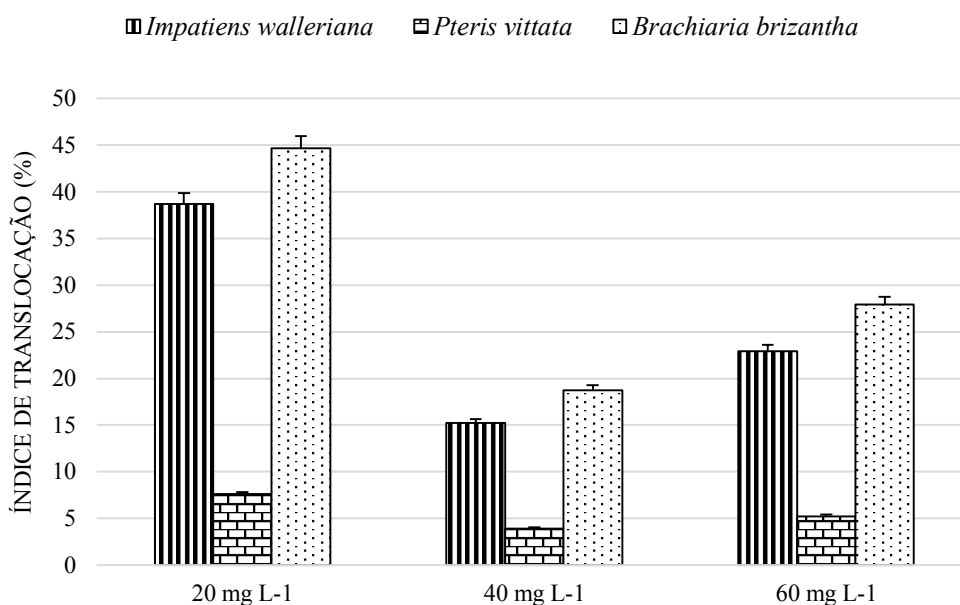


Figura 14 – Valores médios referentes ao índice de translocação (%) de benzeno na *I. walleriana*, *P. vittata* e *B. brizantha*, em solos contaminados artificialmente com 20, 40 e 60 mg L<sup>-1</sup>.

Dentre as três espécies, *P. vittata* apresentou menor fator de bioacumulação (FA), e através dos resultados torna-se possível inferir que a espécie é tolerante ao benzeno, por exclusão, pois apresenta  $FA < 1$  (Araújo et al., 2011). Além disso, provavelmente restringe a translocação do benzeno da raiz para parte aérea, já que, o benzeno foi pouco acumulado na parte aérea ( $< 2\%$ ) ficando, predominantemente, retido na raiz (5,88%). Segundo Fitz e Wenzel (2002), plantas tolerantes podem restringir a translocação do contaminante do solo para planta e da raiz para a parte aérea. Para Oliveira (2012) um dos mecanismos de plantas tolerantes é a exclusão do contaminante, minimizando a absorção e, mesmo apresentando alta concentração da substância nas raízes, restringe a translocação do contaminante para a parte aérea.

Com o aumento na concentração da substância tóxica no solo, observou-se uma variação não linear no fator de bioacumulação de *P. vittata*, sendo que na maior concentração houve um decréscimo do FA. Estudando o fator de bioacumulação, Testiati et al. (2013) verificaram que em diferentes espécies expostas a contaminantes, houve um decréscimo no FA com o acréscimo da concentração da substância tóxica no solo. Esta diferença se dá em decorrência de uma restrição de absorção do solo para raiz em resposta ao elevado teor destes elementos no solo (Testiati et al., 2013).

Já *I. walleriana* e *B. brizantha* absorveram e translocaram ativamente o benzeno do solo, características de plantas hiperacumuladoras (Fitz, Wenzel, 2002). Esta absorção, verificada através do fator de bioacumulação, foi diretamente proporcional com o

aumento na concentração do contaminante aplicada no solo, entretanto, *B. brizantha*, apesar de apresentar o maior fator de bioacumulação entre as espécies, não pode ser considerada tolerante e tão pouco hiperacumuladora de benzeno, uma vez que a planta não reagiu ao processo de desintoxicação e morreu ao final do tratamento.

Para Wang et al. (2009) o critério, fator de bioacumulação  $> 1$ , não é suficiente para designar uma espécie como hiperacumuladora, especialmente, quando a concentração do contaminante é altamente superior ao nível crítico de espécies hiperacumuladoras. Nesse sentido, o FA nunca seria alcançado (Zhao et al., 2003). De acordo com Watanabe (1997) plantas hiperacumuladoras devem também possuir características como alta taxa de crescimento, produção de biomassa e principalmente tolerância ao contaminante. *Impatiens walleriana* apesar de apresentar FA  $> 1$ , em concentrações maiores, na concentração ao redor de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  o fator de bioacumulação foi de 0,76. Segundo Watanabe (1997), para uma planta ser considerada hiperacumuladora é necessário que possua alta taxa de acumulação, mesmo em baixas concentrações do contaminante. Assim, segundo este autor *I. walleriana* não deve ser considerada uma espécie hiperacumuladora de benzeno.

A solução de benzeno apresentou moderada mobilidade em *I. walleriana*, verificado através índice de translocação e do fator de bioacumulação. *Impatiens walleriana* apresentou características de tolerância por acumulação, uma vez que a planta acumulou altas concentrações do contaminante em seus tecidos, dos quais somente uma pequena parte foi armazenada nas raízes, e o restante foi translocado e



acumulado na parte aérea da planta (Sun et al., 2009). Após a suspensão do tratamento, *I. walleriana* reagiu lentamente ao processo de desintoxicação, retomando a rigidez do caule e coloração habitual. Essa situação indica a ocorrência do processo de fitovolatilização, onde o benzeno pode ter sido aos poucos liberado pelas folhas na forma original ou transformando (Andrade et al., 2007). A volatilização, neste caso, pode estar relacionada às taxas transpiratórias da planta.

A transpiração influencia no transporte do xilema e conseqüentemente na translocação de substâncias polares (Oliveira, Bacarin, 2011). Apesar do benzeno ser um contaminante orgânico lipofílico, a transpiração favorece a sua translocação da raiz para parte aérea (Moreno, 1998). A habilidade das plantas em absorver contaminantes orgânicos está diretamente relacionada ao caráter lipofílico do contaminante. Quando estes ligam-se aos tecidos das plantas ficam indisponíveis ou podem ser translocados e posteriormente volatilizados pelas superfícies das folhas (Cunningham, Ow, 1996). No caso da *I. walleriana* levando-se em conta o coeficiente de partição entre água e o octanol ( $\text{Log de } K_{ow}$ ), o benzeno por ser um composto moderadamente hidrofóbico, apresenta “facilidade” em ultrapassar as membranas da endoderme das plantas (Courseuil et al., 1998) e alcançar a corrente transpiratória, podendo sofrer volatilização a partir da superfície foliar.

A absorção e transporte do benzeno na raiz até o xilema, pode ter acontecido pelas vias apoplástica e simplástica, devido as características do contaminante. Todavia a difusão apoplástica tem uma taxa de deslocamento relativamente lenta para moléculas de tamanhos

maiores, pois precisa passar pela membrana plasmática, parede celular e lamela média até atingir outra célula, já na via simplástica, através dos plasmodesmos, o transporte pode ser mais eficiente para estas moléculas maiores (Concenço et al., 2007).

Durante os experimentos de injeção de benzeno no solo, algumas alterações visuais foram observadas em *I. walleriana* como folhas amareladas e leve despigmentação nas pétalas, logo após o primeiro dia de contaminação. No quarto dia foi possível verificar despigmentação mais intensa das pétalas. Após o quinto dia de contaminação *I. walleriana* não se alterou.

No primeiro dia, *B. brizantha* apresentou pequenas manchas claras na base de algumas das folhas. Ao longo do experimento, a coloração verde foi se perdendo e, ao final do sexto dia, a planta estava com caule amolecido e folhas amareladas e acastanhadas. Estudo realizado por Aguiar (2006), com *B. brizantha* em solo contaminado com petróleo, a planta exposta ao contaminante apresentou menor número de cloroplastos.

*Pteris vittata* não apresentou qualquer alteração visual, provavelmente pela baixa absorção do benzeno, do solo para raiz, e pela menor translocação do contaminante para parte aérea, evitando assim alterações fisiológicas e conseqüentemente não apresentando perturbações visíveis nos órgãos vegetativos aéreos.

A interpretação micromorfológica permite verificar distúrbios nas estruturas das folhas que não apresentaram sintomas visíveis. Nos experimentos de injeção de benzeno no solo, para o período de dez dias, todas as espécies apresentaram injúrias

microscópicas. O estudo da micromorfologia foliar, indicou alterações importantes para densidade estomática. A densidade estomática de *P. vittata* foi de 91 estômatos por mm<sup>2</sup> no grupo controle e cerca de 132 por mm<sup>2</sup> no grupo do solo contaminado aos 10 dias; já em *B. brizantha* no grupo controle o valor encontrado foi de 52 por mm<sup>2</sup> e 83 por mm<sup>2</sup> para o grupo contaminado. Em *I. walleriana* tem-se 277 para grupo controle e 389 estômatos por mm<sup>2</sup> no solo contaminado.

Essa variação na densidade estomática relaciona-se a uma redução da área foliar, que está ligada a uma menor disponibilidade hídrica, pois o estresse hídrico induz o fechamento dos estômatos, que está diretamente relacionado com a fixação de carbono e produção de biomassa da planta (Gonçalves et al., 2013). Isto indica uma adaptação, pois com a redução da superfície foliar há uma diminuição na perda de água através transpiração (Maranho et al., 2006). Segundo Hernandez-Valencia e Mager (2003), quando a película de óleo cobre as raízes, altera-se a absorção de água e nutrientes e para Kozłowski et al. (1991), devido ao estresse hídrico há uma redução na área foliar, levando a uma diminuição da fotossíntese, refletindo no crescimento. A redução da área foliar pode ser atribuída à redução de assimilados transportados (Xu, Johnson, 1995; Pezeshki et al., 2000). Em *B. brizantha* foi observado que a sinuosidade das paredes das células epidérmicas é maior nas plantas do grupo controle, tendo essa característica desaparecido nas outras. Essa alteração também pode ser consequência de uma condição de estresse hídrico (Fahn, 1982).

Como resposta às condições de estresse hídrico, há uma tendência no aumento do número de estômatos (Maranho, 2006).

Segundo Woodward (1987) a frequência estomática não pode ser relacionada apenas com a transpiração, mas também com as condições do ambiente no qual as plantas se encontram, como a presença de poluentes. Para Esau (1998), a alta frequência estomática pode indicar uma reação ao estresse ambiental.

Como a quantidade de estômatos de uma folha é definida ao longo do processo de crescimento (Kouwenberg et al., 2004), as espécies, de maneira geral, responderam com aumento da densidade estomática, pois com um maior número de estômatos a planta tem maior controle na perda de água. Para Larcher (2000) esta alteração na densidade estomática permite uma redução mais rápida da transpiração, por meio da regulação do fechamento dos estômatos. De fato, o aumento na densidade estomática é geralmente observado em folhas de plantas expostas a estresses ambientais, e pode ser um indicativo de mecanismo de adaptação das plantas às condições de baixa disponibilidade hídrica no solo (Almeida, 2001).

Juntamente com o estudo da micromorfologia, a análise histoquímica permite identificar alterações que ocorrem nos tecidos das plantas antes do aparecimento de injúrias visíveis. Existem evidências na literatura da participação de peróxido de hidrogênio em resposta ao estresse ambiental (Soares e Machado, 2007).

Para verificar o acúmulo de peróxido de hidrogênio foi quantificado o número de células, com a cor marrom característica, e enquadrado em quatro classes. Todas as três espécies, nas três repetições e controle, apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares, em grupo de células espalhadas pela amostra.

Contudo, este acúmulo ocorreu em diferentes intensidades, conforme mostra a Figura 15. A presença de  $H_2O_2$ , no tratamento controle, se justifica em decorrência do metabolismo regular das plantas, pois as EROs são resultantes da redução do oxigênio molecular, a partir dos elétrons da cadeia respiratória, sendo que os principais pontos de produção destas espécies são as mitocôndrias e cloroplastos (Bray et al., 2000; Apel e Hirt, 2004). Entretanto, em condições normais a produção de EROs na célula é baixa, mas quando a planta é submetida a um estresse ambiental há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, como observa-se neste estudo, onde o aumento de peróxido de hidrogênio, na contaminação com benzeno, é um indicativo de perturbação da homeostase celular (Mittler, 2002; Foyer, Noctor, 2005).

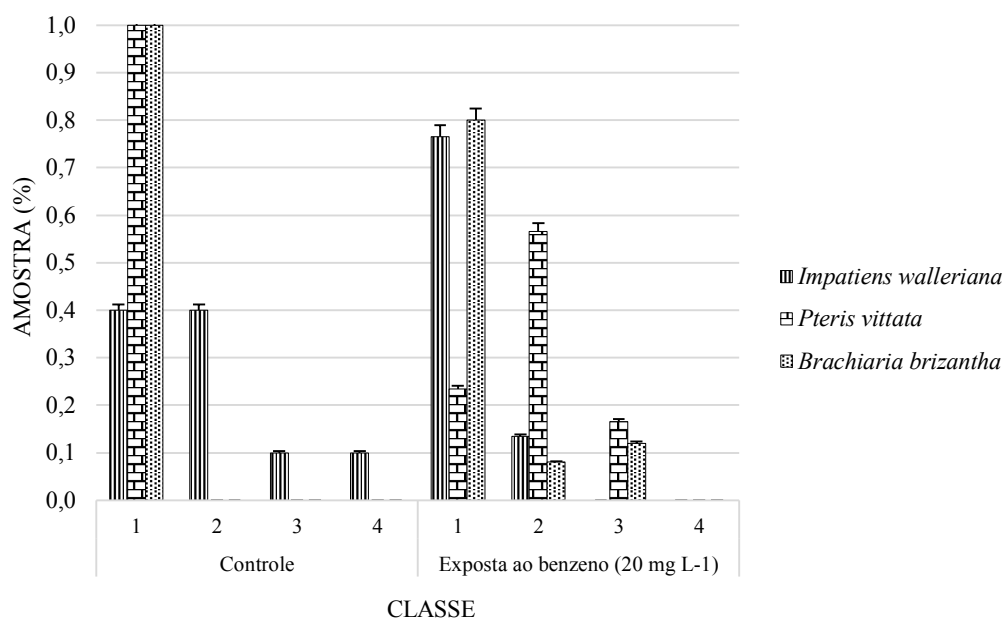


Figura 15 – Porcentagem de amostras enquadradas em cada classe, nas três espécies vegetais, de células que apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio (classe 1 = 1 - 5 células; classe 2 = 6 - 10 células; classe 3 = 11 - 15 células e classe 4 = 16 - 20 células).

*Pteris vittata* e *B. brizantha* apresentaram acúmulo  $H_2O_2$  em todas plantas do tratamento controle, sendo que todas as amostras foram enquadradas na classe 1 (1 - 5 células). Já em *P. vittata* exposta ao benzeno, na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  por dez dias, o acúmulo foi maior, uma vez que as amostras foram enquadradas, predominantemente, na classe 2 (6 - 10 células) e cerca de 17% na classe 3 (11 - 15 células) (Figura 16).

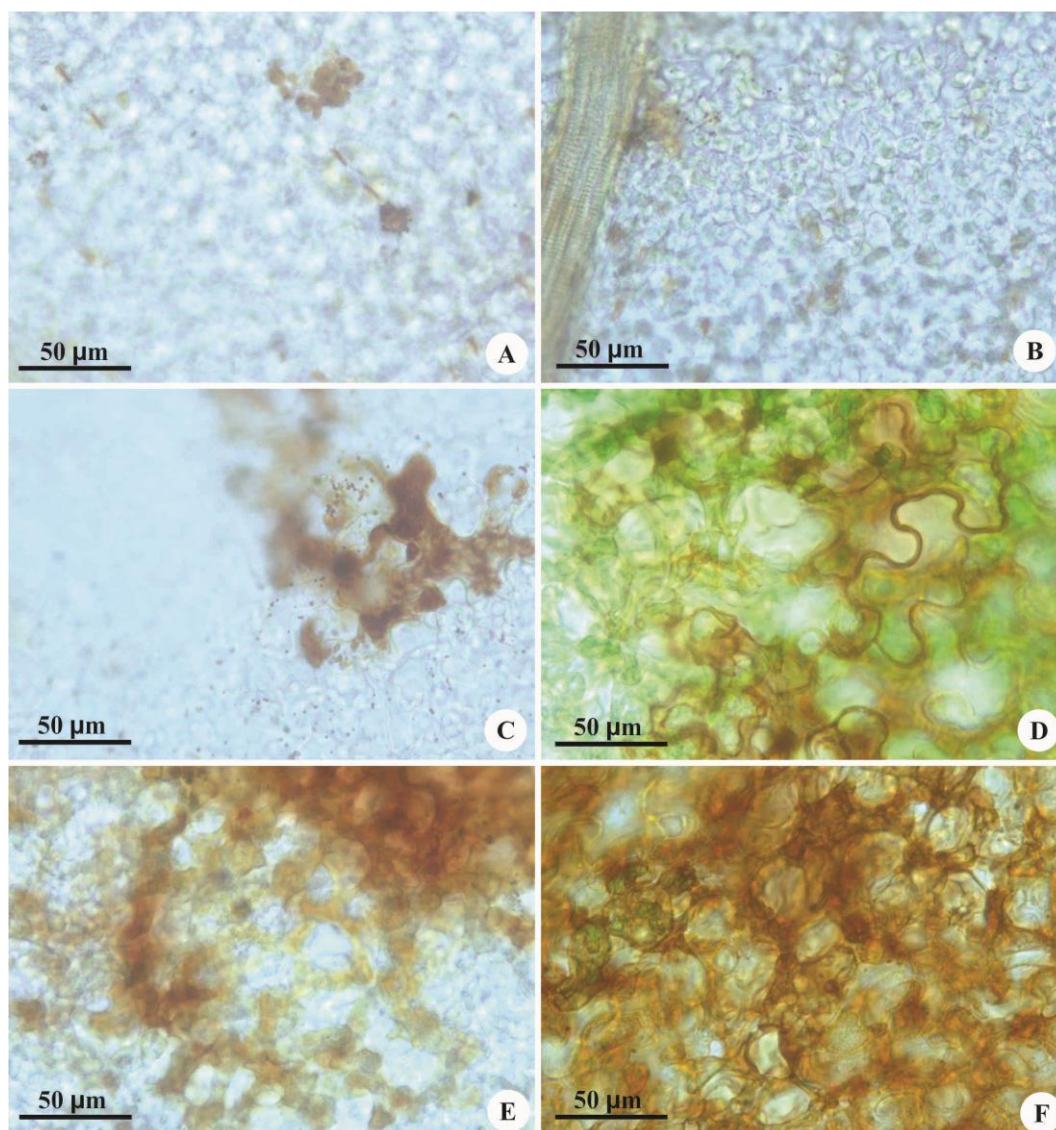


Figura 16 – Fotomicrografias da superfície abaxial de folhas de *Pteris vittata* tratadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) que marca em marrom escuro a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A–B. Tratamento controle. C–F. Plantas expostas a  $20\text{ mg L}^{-1}$  de contaminante. C–D. Acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células epidérmicas. E–F. Acúmulo de  $H_2O_2$  nas células do mesófilo.

*Brachiaria brizantha* também mostrou um acúmulo maior nas plantas expostas ao contaminante, contudo, com menos intensidade, quando comparado com *P. vittata*, pois as amostras, em sua maioria (80%), foram enquadradas na classe 1, mas também houve amostras enquadradas na classe 2 e classe 3 (Figura 17). Um grande

acúmulo de peróxido de hidrogênio foi observado nas células-guarda dos estômatos dessa espécie (Figura 18), indicando um provável transporte do contaminante da raiz até as folhas através do xilema.

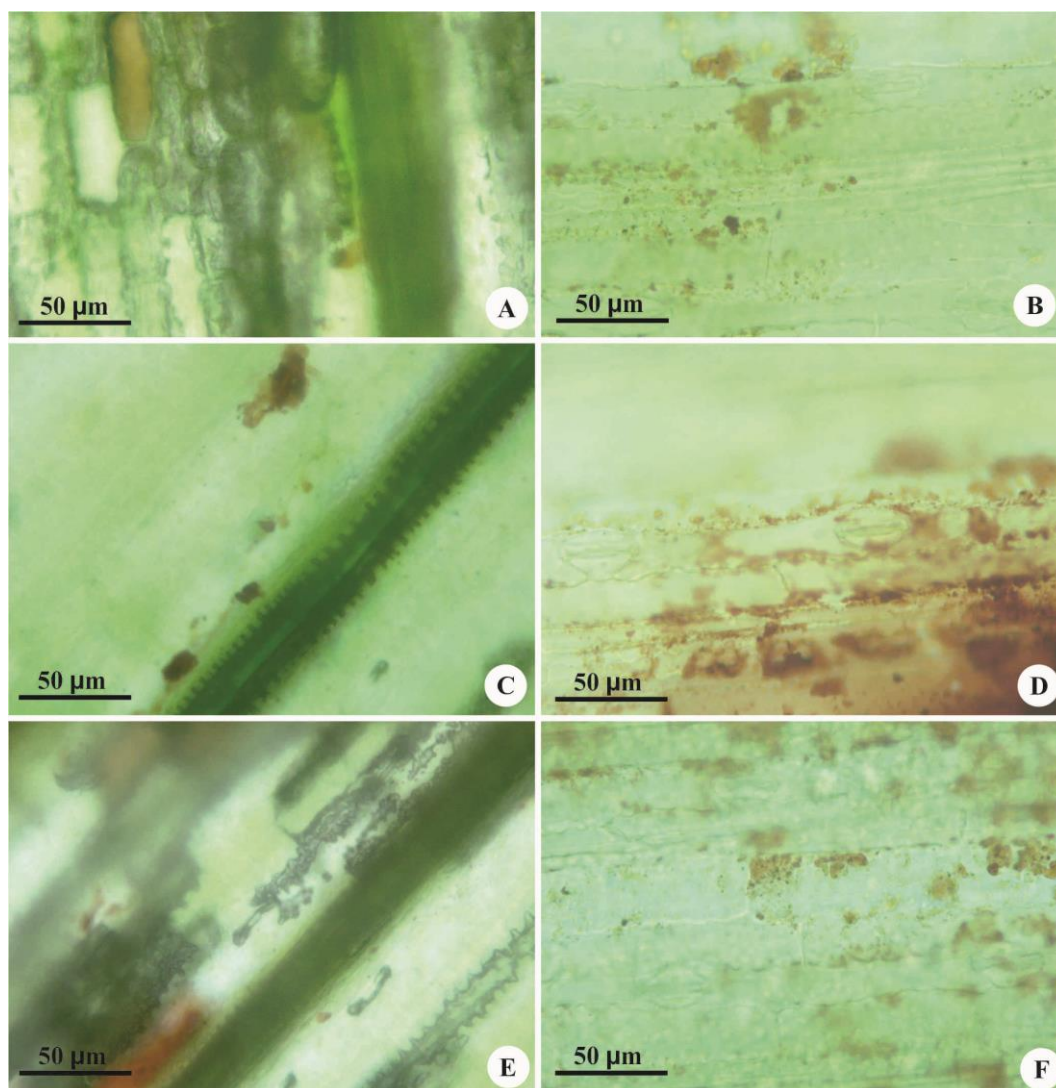


Figura 17 – Fotomicrografias da superfície adaxial de folhas de *Brachiaria brizantha* tratadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) que marca em marrom escuro a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A, C e E. Tratamento controle. B, D e F. Plantas expostas a  $20\text{ mg L}^{-1}$  de contaminante.



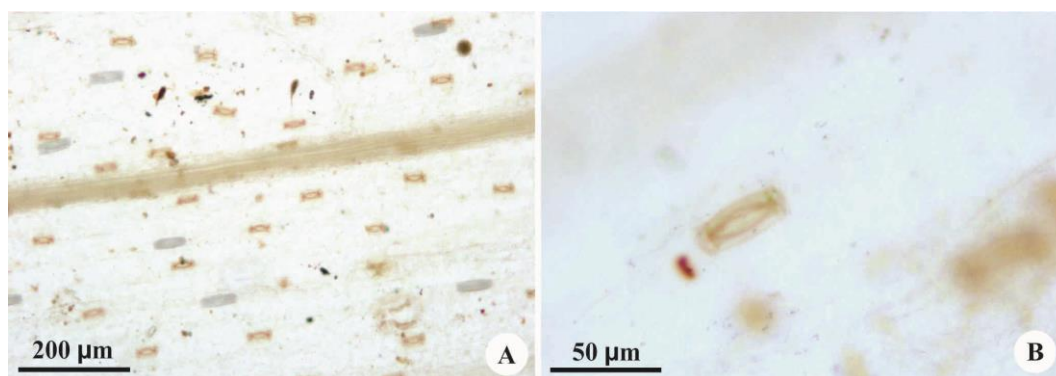


Figura 18 – Fotomicrografias da superfície adaxial de folhas de *Brachiaria brizantha*, expostas a 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, tratadas com DAB (3,3''-diaminobenzidina) que marca em marrom escuro as células-guarda dos estômatos com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Baixos níveis de EROs sugerem respostas adaptativas, enquanto altas concentrações destas espécies causam danos severos, iniciando a morte celular (Benavides et al., 2005). Neste estudo como foi verificado somente a presença de peróxido de hidrogênio e não das outras espécies reativas de oxigênio, pode-se deduzir que o benzeno induziu a produção de radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), e através da enzima superóxido dismutase (SOD) houve a conversão destes radicais em peróxido de hidrogênio. Este seria um mecanismo de defesa das plantas, pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é menos reativo que o radical superóxido, sendo assim menos danoso à planta e conferindo também uma maior tolerância (Ferreira, Matsubara, 1997). Este comportamento foi observado em diversos estudos, onde a adição de peróxido de hidrogênio ou mesmo sua produção endógena, induziu a expressão de genes referentes à superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e outras enzimas antioxidantes (Soares e Machado, 2007). Contudo, a atividade da SOD sozinha não é suficiente para manter a homeostase celular, pois altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem causar danos às células ou mesmo, na presença de ferro ou cobre (Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>), produzir

radicais hidroxila (OH<sup>\*</sup>) que são altamente reativos, causando a peroxidação proteica e lipídica (Pedroso, 2009).

Srivastava et al. (2006) estudando os antioxidantes enzimáticos em *P. vittata* exposta ao arsênio, verificou um aumento da atividade na enzima SOD. O mesmo pode ter ocorrido com *P. vittata*, quando exposta ao benzeno, ou seja, houve um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, o que intensificou a geração de peróxido de hidrogênio nas células. Srivastava et al. (2006) verificaram também aumento das enzimas CAT e APx em *P. vittata* contaminadas com arsênio. Contudo, *P. vittata* quando exposta ao benzeno, provavelmente não apresenta este mesmo aumento das enzimas CAT e APx, justificando a grande concentração de peróxido de hidrogênio.

O acúmulo de peróxido de hidrogênio em tecidos específicos e em quantidades apropriadas beneficia as plantas mediando aclimatação e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Bowler, Fluhr, 2000). As espécies reativas de oxigênio podem agir de duas maneiras nas plantas, como causadora de danos ou ativadora de respostas de defesa da planta. Entretanto, esta dualidade é definida levando em consideração o que é produzido e consumido através do sistema antioxidante (Breusegem et al., 2001; Neto et al., 2005; Gadjev et al., 2006).

*Brachiaria brizantha*, apesar de apresentar uma menor intensidade no acúmulo de peróxido de hidrogênio quando comparado com *P. vittata*, reagiu de maneira mais sensível a contaminação, pois apresentou sintomas visíveis e morte ao final do tratamento com benzeno por dez dias. A grande quantidade de benzeno absorvido pela

raiz e translocado para parte aérea pode justificar um possível aumento nas moléculas do radical superóxido, intensificando as perturbações nas estruturas celulares, uma vez que o  $O_2^-$  pode causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (Breusegem et al., 2001).

Além disto, a atividade da enzima SOD pode ter sido menos intensa nesta espécie, explicando a menor quantidade de células com  $H_2O_2$ , ou seja, houve uma menor conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, podendo também justificar os danos visíveis na planta, pois uma maior quantidade de radical superóxido causaria mais danos as células ou mesmo poderia produzir radicais hidroxila, que são mais reativos. Para Soares e Machado (2007), o acúmulo de radical superóxido pode ser nocivo às plantas.

Segundo Srivastava et al. (2006) as enzimas-chave dentro do mecanismo de defesa antioxidante são SOD, CAT e APx, pois estas enzimas determinam diretamente a concentração das EROs. Entretanto, os mecanismos antioxidantes enzimáticos em *B. brizantha*, provavelmente, não reagiram suficientemente para converter o que foi produzido de  $H_2O_2$  em água e gás oxigênio, através das enzimas catalase e/ou ascorbato peroxidase. Segundo Patra et al. (2004) a atividade da enzima catalase pode ser influenciada por diversos fatores como o tipo de contaminante, concentração, tempo de exposição e espécie vegetal, sendo que a atividade desta enzima pode sofrer grandes variações.

*Impatiens walleriana* apresentou maior acúmulo de  $H_2O_2$  no tratamento controle quando comparada ao tratamento com

20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno. As amostras controle enquadraram-se na classe 1 (40%), classe 2 (40%), classe 3 (10%) e classe 4 (10%), já as expostas ao contaminante foram classificadas, principalmente, na classe 1 (77%). Isto se justifica, pois a planta produz naturalmente o peróxido de hidrogênio em decorrência do seu metabolismo.

*Impatiens walleriana*, dentre as três espécies, foi a que, comparativamente, apresentou menor acúmulo de peróxido de hidrogênio (Figura 19), mesmo tendo absorvido razoável quantidade de benzeno e translocado para parte aérea. Isto indica um equilíbrio entre o processo de produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (Pergo, Ishii-Iwamoto, 2011). O peróxido de hidrogênio e o radical superóxido podem induzir genes diferentes, em conjunto ou separadamente, e em baixas concentrações, EROs induzem genes de defesa e resposta adaptativa (Soares e Machado, 2007). Esta espécie, possivelmente, possui um eficiente mecanismo antioxidante, que pode ter sido ativado, indiretamente, pelo benzeno ou pelas EROs levando a uma ação sincrônica entre superóxido dismutase (SOD) e outras enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APx), convertendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e gás oxigênio (Gratão et al., 2005). A ação combinada de catalase e superóxido dismutase reduz a ação tóxica e altamente reativa dos radicais hidroxil (Scandalios, 1993), evitando danos maiores às células.

É necessários estudos futuros, para compreender melhor as atividades de enzimas antioxidantes nesta espécie, quando exposta ao benzeno através das raízes.

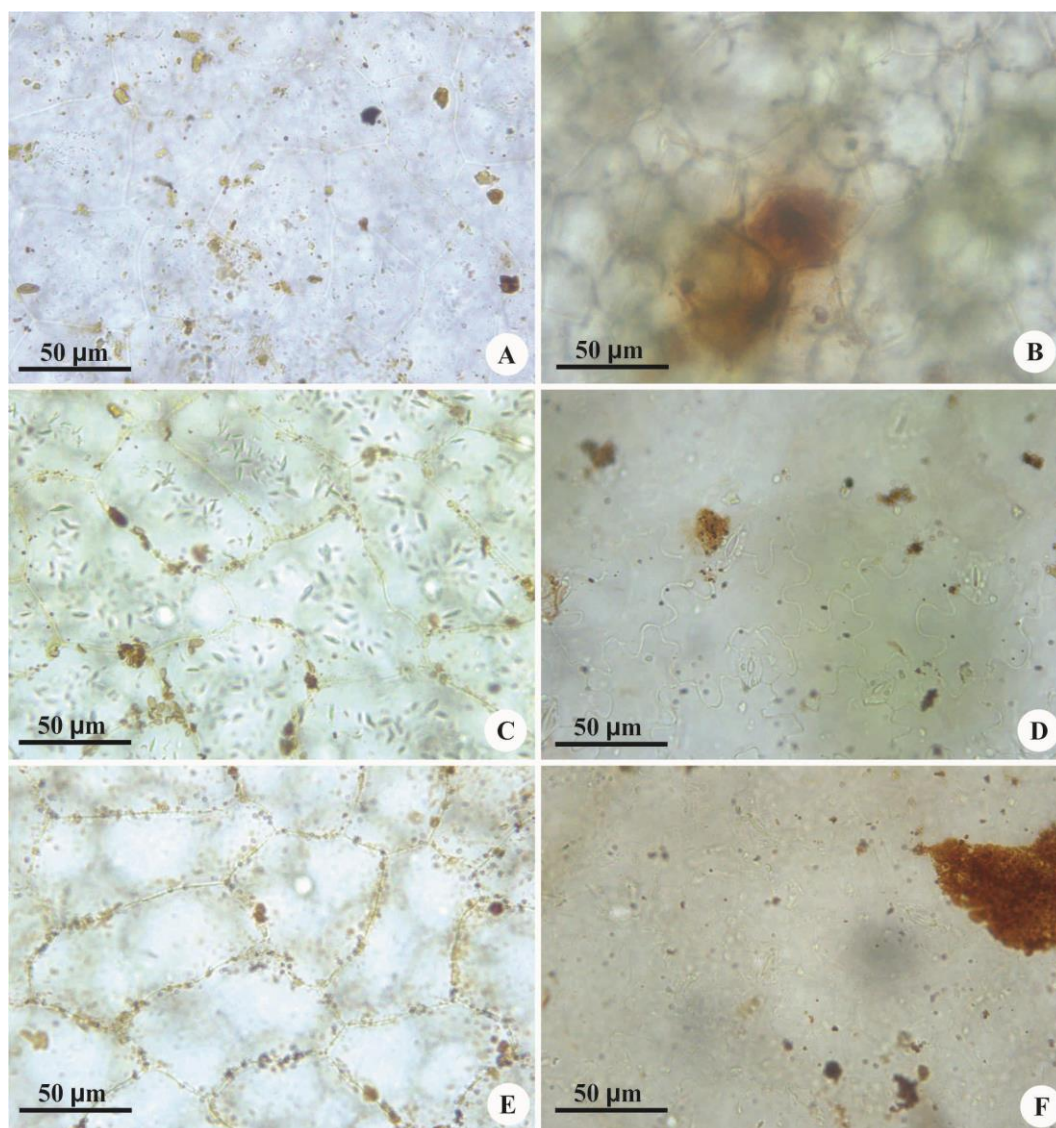


Figura 19 – Fotomicrografias da superfície abaxial de folhas de *Impatiens walleriana* tratadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) que marca em marrom escuro a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A, C e E. Tratamento controle. B, D e F. Plantas expostas a  $20\text{ mg L}^{-1}$  de contaminante.

O peróxido de hidrogênio tem como uma de suas funções sinalizar morte celular (Levine et al., 1994), pois esta substância acumula-se, primeiramente, na parede celular e membrana plasmática, atingindo posteriormente o citoplasma e organelas, o que leva ao colapso da célula (Faoro, Iriti, 2001; Iriti et al., 2003). Para identificar a morte celular nos tecidos foliares, antes do aparecimento

de sintomas visíveis, nas espécies estudadas, foi utilizado o corante azul de Evans, que cora de azul intenso as células mortas.

*Impatiens walleriana* e *P. vittata* não apresentaram nenhuma indicação de morte celular nas folhas do tratamento controle, já *B. brizantha* apresentou azul intenso nas células-guarda de alguns estômatos, em uma das amostras, provavelmente em decorrência de um processo natural de morte celular.

A morte celular foi mais evidente e intensa no tratamento com 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, onde todas as três espécies apresentaram morte em algumas regiões do tecido foliar (Figura 20).

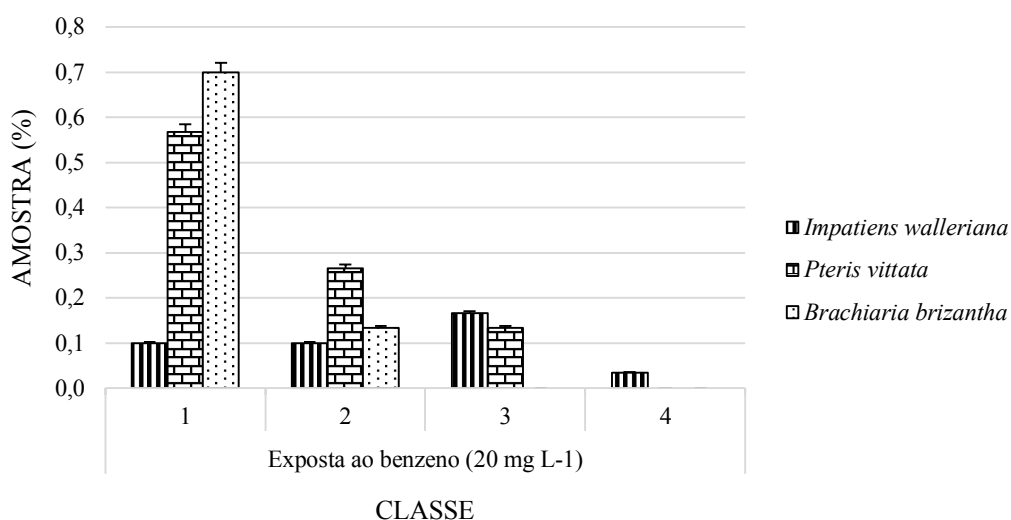


Figura 20 – Porcentagem de amostras enquadradas em cada classe, nas três espécies vegetais, de células que apresentaram morte celular (classe 1 = 1 - 5 células; classe 2 = 6 - 10 células; classe 3 = 11 - 15 células e classe 4 = 16 - 20 células).

*Impatiens walleriana*, dentre as três espécies, apresentou menor quantidade de amostras com células mortas no tratamento com benzeno, possivelmente em decorrência da menor quantidade de peróxido de hidrogênio produzida e por um provável eficiente sistema antioxidante da espécie. Contudo, houve

enquadramento nas classes 2, 3 e 4. A morte celular foi detectada principalmente nas células-guarda dos estômatos. Houve, também, coloração azul intenso em algumas células da epiderme, mas em menor quantidade (Figura 21). A detecção de morte celular nas células-guarda dos estômatos, pode ser um indicativo do contato direto do contaminante com estas células, corroborando com a ideia de que a planta metabolizou e volatilizou o benzeno, eliminando-o através dos estômatos.

Além disto, a baixa quantidade de células mortas, mesmo com considerável concentração do contaminante na parte aérea, é um sinal de resistência da planta à absorção do benzeno através das raízes, uma vez que a espécie reduziu os efeitos danosos que os metabólitos deste poluente podem gerar e sobreviveu à exposição.

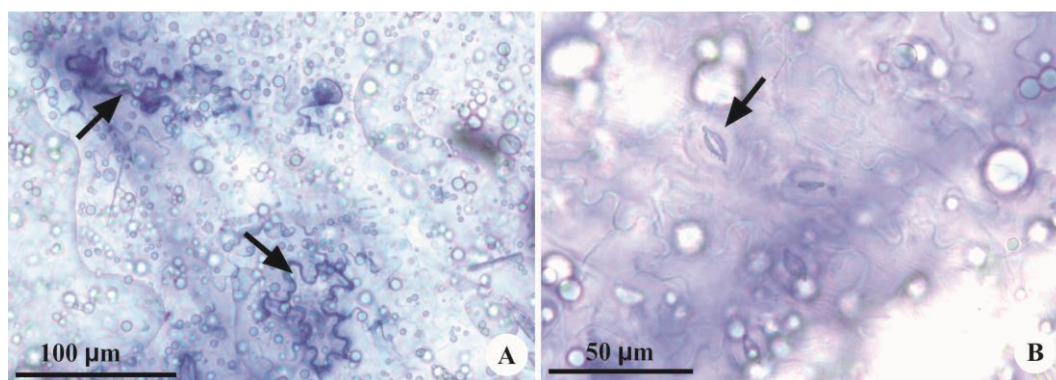


Figura 21 – Fotomicrografias da superfície abaxial de folhas de *Impatiens walleriana*, expostas a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de benzeno, tratadas com azul de Evans que marca em azul intenso células mortas. A. Célula comum da epiderme com indicação de morte celular (seta). B. Estômatos com indicação de morte celular (seta).

*Brachiaria brizantha* e *P. vittata* apresentaram maior quantidade de células com morte celular, sendo que *P. vittata* teve morte celular mais intensa que *B. brizantha*, pois apresentou uma



porcentagem maior de amostras na classe 2 e 3, que abrange de 6 a 15 células por área analisada (Figuras 22 e 23).

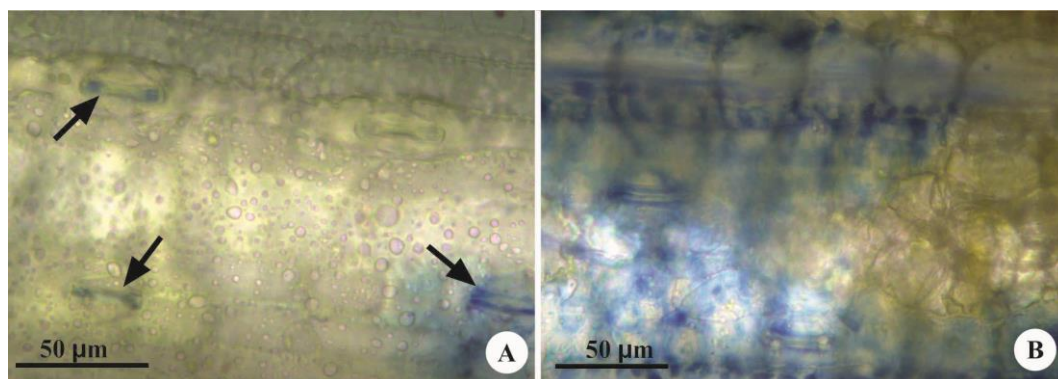


Figura 22 – Fotomicrografias da superfície adaxial de folhas de *Brachiaria brizantha*, expostas a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de benzeno, tratadas com azul de Evans que marca em azul intenso células mortas. A. Estômatos com indicação de morte celular (seta). B. Região com predominância de células coradas em azul, indicando morte celular.

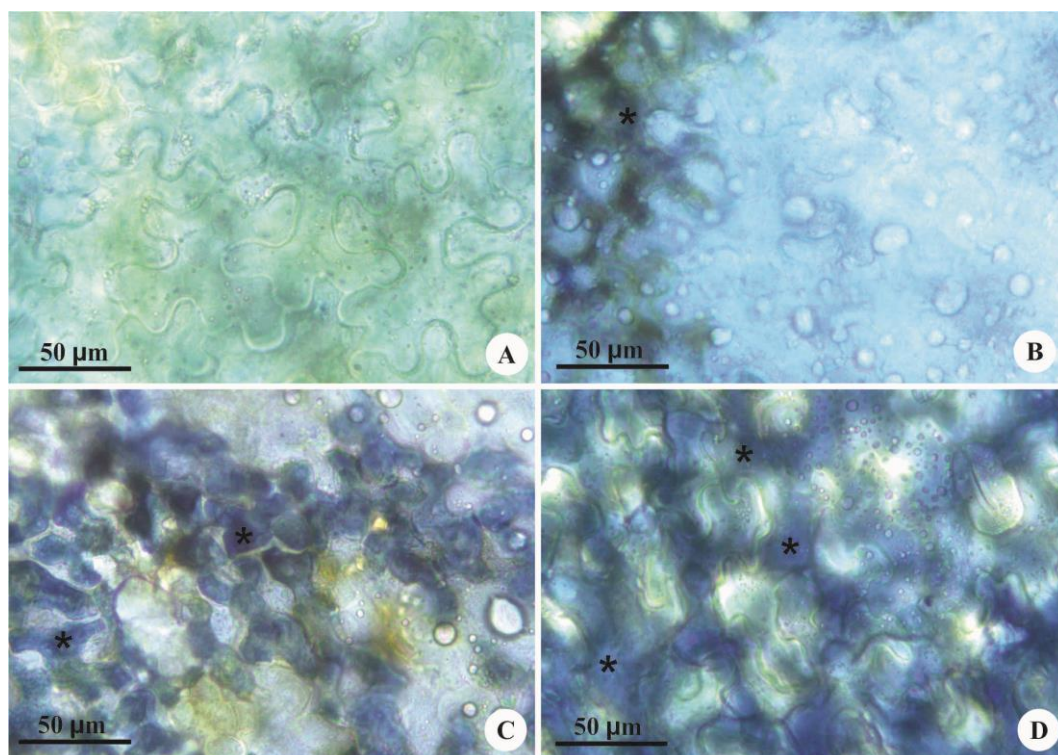


Figura 23 – Fotomicrografias da superfície abaxial de folhas de *Pteris vittata*, expostas a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de benzeno, tratadas com azul de Evans que marca em azul intenso células mortas. A. Tratamento controle. B–D. Plantas expostas ao benzeno (\* indica as células com reação positiva indicando morte celular).



*Pteris vittata* foi a espécie que menos translocou o benzeno para parte aérea da planta, contudo mesmo em baixa quantidade houve produção de peróxido de hidrogênio em um número maior de células, quando se compara com o controle e com as outras espécies. Segundo Soares e Machado (2007) o peróxido de hidrogênio é nocivo quando acumulado. Isto justifica o maior número de células mortas nesta espécie, pois segundo Levine et al. (1994) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como um sinalizador de morte celular e para Breusegem et al. (2001) em altas concentrações, as EROs levam a um programa de morte celular controlado geneticamente. Contudo, a planta não apresentou sintomas visíveis nos dez dias de exposição ao benzeno, pois provavelmente é necessário um período maior para que as injúrias visíveis surjam, uma vez que o corante azul de Evans pode detectar células mortas antes mesmo do aparecimento de sintomas visíveis (Pedroso, 2009).

Os dados de *B. brizantha* mostram que essa espécie absorveu e translocou grandes quantidades de benzeno, que induziram uma expressiva produção de peróxido de hidrogênio e, provavelmente, de outras espécies reativas de oxigênio mais danosas às células. As EROs intensificaram o processo de morte celular, nas células do mesofilo e epiderme, o que culminou em sintomas visíveis e morte da planta. Estes indicativos mostram que *B. brizantha* é uma espécie pouco tolerante ao benzeno, quando absorvido pela raiz.

Uma das formas de fitorremediação é a fitoextração em que os contaminantes são captados pela raiz e ocorre a sua translocação dentro da planta, sendo esta técnica muito utilizada para BTEX

(benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e outros compostos orgânicos (Susarla, Medina, McCutcheon, 2002).

*Brachiaria brizantha* e *P. vittata*, por diferentes razões, não apresentaram potencial fitorremediador para solo contaminado com benzeno. *Brachiaria brizantha*, apesar de possuir um alto fator de bioacumulação e índice de translocação, não conseguiu reagir ao término das exposições, nas diferentes concentrações, e morreu, inclusive em baixa concentração do benzeno (20 mg L<sup>-1</sup>), provavelmente por estar acima do limite de tolerância da planta (Cunningham et al., 1996), ou mesmo, pelo aumento das EROs mais danosas as células que, possivelmente, intensificou a morte celular e culminou em injúrias visíveis. Para uma espécie ser viável no processo de fitorremediação é indispensável a sobrevivência na presença do contaminante.

*Pteris vittata* sobreviveu as contaminações e não apresentou sintomas visíveis. Isto ocorreu, pois a planta absorveu e translocou pouco benzeno, mas mesmo em baixas quantidades o contaminante induziu o aumento de peróxido de hidrogênio e morte celular. Deduz-se que essa espécie possui um ativo sistema antioxidante, que priorizou a produção de peróxido de hidrogênio, reduzindo as EROs mais reativas e danosas as células. Contudo, o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não evitou a morte celular, mas tornou tardio o aparecimento de sintomas visíveis. *Pteris vittata* mostrou-se tolerante ao benzeno, porém evitou absorção e translocação, característica indesejada na fitoextração. Estudos futuros seriam interessantes para compreender melhor os mecanismos antioxidantes dessa espécie.

*Impatiens walleriana* é a espécie que mostrou maior potencial para fitorremediação de solos contaminados por benzeno, pois apresentou razoável fator de bioacumulação e preferencial acumulação do contaminante na parte aérea, possibilitando a desintoxicação da planta, possivelmente, através da volatilização do contaminante pelas folhas ou mesmo a partir de uma eficiente atividade enzimática antioxidante. Para Moreno e Courseuil (2001) a liberação de contaminantes orgânicos voláteis através das folhas não é o destino final almejado pela fitorremediação, embora a liberação lenta e controlada do benzeno, para atmosfera, é até certo ponto aceitável, quando os compostos presentes no solo podem atingir o aquífero causando uma eventual contaminação em pontos receptores.

Tecnologias atualmente utilizadas nos Estados Unidos para a limpeza de locais contaminados, além de não atingirem 100% de eficácia, costumam ocasionar outros problemas como a destruição do perfil do solo, trazendo como consequência sérios prejuízos ecológicos ao local. As alternativas atualmente viáveis para a remediação de águas subterrâneas, no caso de contaminantes orgânicos voláteis, envolvem a utilização de bombeamento e extração de vapores do solo (SVE), as quais consistem na transferência destes compostos para a atmosfera sob a forma de vapores e a um custo muito elevado (Moreno, Courseuil, 2001). A utilização de espécies vegetais para a remoção destes contaminantes e a sua posterior conversão a metabólitos inativos nos tecidos vegetais, como já foi relatado para o solvente tricloroetileno (TCE), para o pesticida atrazina e também para resíduos de armamentos como o trinitrotolueno (TNT), tem sido uma alternativa ecologicamente

correta (Moreno, Courseuil, 2001). No meio natural, o tempo de meia-vida do benzeno é de 0,02 a 2 anos, portanto, processos combinados devem ser adotados, em diferentes compartimentos ambientais, para desencadear a degradação biológica ou até mesmo, conter a mobilidade em subsuperfície e minimizar os impactos negativos através de diferentes técnicas a baixo custo operacional.

### 5.1.1 Curva dose-resposta

Para *I. walleriana* foi estimada a relação entre dose e resposta para diferentes concentrações de benzeno. A avaliação dose-resposta implica considerar que as plantas frequentemente diferem em suscetibilidade a um mesmo poluente.

A principal exigência a ser cumprida para que a planta seja selecionada como potencialmente fitorremediadora é que a mesma seja tolerante ao benzeno (Scramin et al., 2001). A tolerância é uma característica inata, relacionada com a variabilidade genética natural de uma espécie, que é capaz de sobreviver e se reproduzir após o tratamento com a substância, mesmo sofrendo injúrias (Silva et al., 2007). Esta seletividade deve-se ao fato de que tecidos vegetais possuem capacidade de absorver, metabolizar, compartimentalizar e/ou translocar compostos orgânicos que são posteriormente volatilizados, podendo também ser completa ou parcialmente degradados ou mesmo,

sofrerem transformações, originando compostos menos tóxicos, especialmente menos fitotóxicos (Scramin et al., 2001).

De acordo com o destino dado ao contaminante, a fitorremediação pode ser classificada em diferentes processos que podem estar agindo em conjunto ou separadamente, sendo eles: degradação, extração e contenção (Vimieiro, Silva, 2007). Para cada um destes processos, existem mecanismos distintos de ação utilizados pelas plantas, que englobam a extração do contaminante das zonas vadosa e saturada; concentração do contaminante no tecido das plantas; degradação do contaminante por meio de uma série de processos metabólicos, envolvendo enzimas; volatilização do contaminante para a atmosfera; imobilização dos contaminantes na zona da raiz, entre outros (Cunningham et al., 1996; Accioly, Siqueira, 2000; Santos et al., 2004; Fernandes, Alcantara, 2009).

Os experimentos de curvas dose-resposta foram conduzidos com *I. walleriana* (Figura 24) por tratar-se de espécie mais tolerante ao benzeno e, conseqüentemente, passível de ser utilizada em estratégias de remediação. Assim, as espécies menos tolerantes foram descartadas nesta etapa.

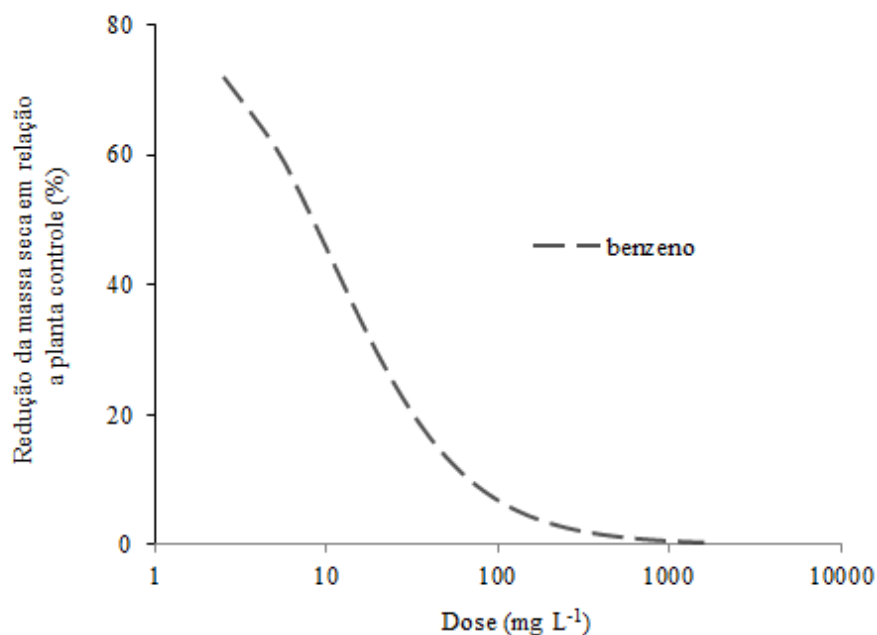


Figura 24 – Curva dose-resposta da espécie resistente (*Impatiens walleriana*) ao benzeno, avaliada através da redução de massa da matéria seca aos 60 dias de contato com a substância contaminante.

*Impatiens walleriana* foi a espécie que mais agregou características desejáveis como espécie fitorremediadora, ou seja, o aumento da dose não causou redução significativa na estatura da planta, a espécie parece ter volatilizado o benzeno absorvido evitando danos irreversíveis e, em poucos dias, recuperou seu estado aparente, mostrando visivelmente sua tolerância ao produto.

## 5.2 Aspersão de benzeno nas espécies vegetais

A avaliação da sintomatologia, método mais utilizado para avaliar a sensibilidade de espécies vegetais a diversos fatores

estressantes, frequentemente requer validação adicional com interpretação microscópica. Segundo Kabata-Pendias e Pendias (1986) espécies vegetais podem adaptar-se a poluentes químicos, mas em muitos casos são observados sintomas visíveis como clorose, manchas e necrose em parte das folhas.

Na exposição à concentração mínima ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) de benzeno, algumas folhas jovens de *I. walleriana* iniciaram o processo de clorose a partir do 20º dia de contaminação, sendo que até o 30º dia estas folhas necrosaram e sofreram abscisão. Porém, desde o início e durante todo o período de contaminação, algumas folhas maduras sofreram clorose, que teve início, a partir da base da lâmina foliar espalhando-se para as extremidades laterais e depois para toda a folha, seguido por sua queda. Este comportamento pode ser justificado pela distribuição dos estômatos na lâmina foliar. Provavelmente há um número maior de estômatos na região basal, seguido pela região mediana lateral. Neste caso, o benzeno parece ter formado diversos complexos responsáveis pelo surgimento de zonas sem coloração característica, provavelmente devido à redução na biossíntese de clorofila. Nas extremidades e ápice de algumas folhas, as cloroses evoluíram para necroses, que se espalharam para toda lâmina foliar, levando à abscisão. Observou-se que a partir do 35º dia de contaminação, algumas folhas apresentaram necroses de formas e tamanhos irregulares sem posterior queda, atingindo os 60 dias esperados. Quando comparada com o controle, a área das folhas das plantas contaminadas apresentou-se reduzida.

Na exposição à concentração máxima (1600 mg L<sup>-1</sup>), observou-se os mesmos sintomas da concentração mínima, porém os danos ocorreram em um tempo mais curto. Para Godoi et al. (2010) quanto maior a concentração de BTEX, menor é o teor de clorofila total foliar. Notou-se que as folhas necrosadas apresentaram, inicialmente, necrose nas extremidades da lâmina foliar. No 50º dia de contaminação todas as folhas sofreram clorose e/ou necrose, seguido pela queda da folha.

No primeiro dia de contaminação de *P. vittata*, na concentração mínima, pôde-se observar necrose, ao redor da nervura principal dos folíolos mais velhos, espalhando-se, para todo o folíolo. De maneira quase que sequencial, os folíolos foram necrosando até que todos os folíolos da folha composta fossem necrosados, este processo teve duração de 26 dias. Os folíolos mais jovens sofreram necrose já nos primeiros dias de nebulização. Observou-se também necrose em forma de pontos ou ao redor da raque, as quais não se espalharam para todo o limbo foliar.

O benzeno pode ter sido absorvido, pelos estômatos, atingindo o mesofilo foliar, acumulando-se no tecido clorofiliano e causando lesões. Contudo, a maioria das folhas de *P. vittata* não apresentaram nenhuma injúria visível. Um fato a considerar é a condição ruderal da espécie, bastante adaptada ao meio urbano. Quando comparadas com as folhas do tratamento controle, as expostas a 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, apresentaram um número reduzido de folíolos por folha e estes possuíam uma área foliar, aparentemente, menor que o tratamento controle.



No decorrer das contaminações na concentração mínima e máxima, algumas folhas iniciaram a emergência e o processo de expansão, sendo que estas folhas não apresentaram nenhum sinal de danos visíveis, entretanto, foi possível observar uma sinuosidade dos folíolos e uma aparência mais fina e translúcida destes. Na concentração máxima, mais folhas compostas foram completamente necrosadas e muitos folíolos apresentaram pontos de necrose, sendo que as outras características assemelham-se muito com as observadas na exposição à concentração mínima.

*Brachiaria brizantha*, por sua vez, não apresentou queda de suas folhas e nem injúrias foliares visíveis, nas folhas jovens, como também observado por Fornasiero (2001). Pôde-se observar um crescimento do vegetal, porém com enfraquecimento da planta, uma vez que as folhas apresentaram um aspecto mais frágil com lâmina foliar mais fina, menor e menos áspera quando comparada com o tratamento controle. Algumas folhas mais velhas, presentes na base, apresentaram clorose e posterior ressecamento. Na exposição à saturação de benzeno as características dos danos são muito parecidas com a concentração mínima.

A fitotoxicidade do benzeno depende de diversos fatores como a espécie estudada, o estágio de desenvolvimento e a concentração do contaminante (Pita-Barbosa et al., 2009). As três espécies reagiram diferentemente quando expostas as diferentes concentrações do poluente, sendo que na concentração a 1600 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, os sintomas visíveis foram mais intensos. *Impatiens walleriana* foi a espécie menos tolerante a aspersão de benzeno, quando

exposta à concentração máxima, pois apresentou maior número de injúrias em suas folhas e morte da planta. As espécies mais resistentes à nebulização com o contaminante foram *P. vittata* e *B. brizantha*, uma vez que, apresentaram poucas perturbações visíveis, quando expostas a concentração mínima e máxima. Sriprapat e Thiravetyan (2013) estudando o potencial de *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl. em reduzir a concentração de BTEX em ambientes fechados, verificou que a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno não foi suficiente para interromper a fotossíntese e nem induzir o surgimento de clorose e necrose.

Segundo Sriprapat e Thiravetyan (1999) a captura do benzeno pelas plantas ocorre em maior quantidade através dos estômatos, mas existem outras vias não estomáticas, como a cutícula. O uso destas diferentes vias de captura de benzeno é dependente das características de cada planta. A importância das cutículas cerosas na adsorção do benzeno é maior ou menor dependendo da espécie vegetal.

A área do estômato pode influenciar fortemente as habilidades de captura dos contaminantes voláteis, mas Cornejo et al. (1999) supõem que é simplista considerar a área do estômato sozinha como a única variável para entender a captura de poluentes gasosos, sendo mais razoável considerar também as características micromorfológicas das folhas, como a morfologia dos estômatos e sua abundância, pois estas características também interferem na absorção do poluente pela planta. Na maioria das plantas, os estômatos abrem durante o dia e fecham a noite, mas este processo pode ser influenciado por diversos fatores como a intensidade e qualidade da luz, umidade do

solo, concentração interna de CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade relativa do ar (Machado, Lagôa, 1994).

*Impatiens walleriana*, *B. brizantha* e *P. vittata* demonstraram um comportamento parecido quando expostas à concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, pois continuaram desenvolvendo-se, com o surgimento de novas folhas, possivelmente indicando que a concentração utilizada estaria dentro do limite de tolerância destas espécies, pois o longo período de exposição não levou à morte dos indivíduos. No trabalho realizado por Treesubstorn e Treesubstorn (2012) a parte aérea das plantas estudadas continuaram a desenvolver-se durante a fumigação com 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno. Entretanto, na concentração máxima somente *B. brizantha* e *P. vittata* continuaram desenvolvendo-se, indicando mecanismos de tolerância a altas concentrações do contaminante.

Este comportamento pode, possivelmente, ser justificado pelo fator luminosidade, uma vez que as plantas foram expostas ao contaminante no início do dia e dentro de uma capela de exaustão, o que pode ter influenciado diminuindo a abertura dos estômatos. Kozłowski e Pallardy (1997) citam que a tolerância das plantas à poluição está rigorosamente correlacionada com a condutância estomática, e refere-se ao tamanho e, principalmente, à frequência dos estômatos. O processo de abertura e fechamento dos estômatos está relacionado principalmente com a intensidade de luz, sendo que o início do dia, é o período no qual inicia-se a abertura dos estômatos (Costa e Marengo, 2007). Quando a luz incide sobre as células estomáticas, a fase clara da fotossíntese começa e há um

aumento na quantidade de solutos nestas células e, conseqüentemente, ocorre a entrada de água nas células-guarda levando a abertura do ostíolo (Schroeder, 2001). Ferreira et al. (1999) verificaram que os maiores valores de condutância estomática em *Eucalyptus citriodora* (Hook) ocorrem quando a radiação solar era máxima.

A toxicidade do benzeno pode variar de acordo com cada espécie, sendo que a *I. walleriana* mostrou-se mais sensível que as demais espécies, provavelmente por possuir uma abundância maior de estômatos, o que aumenta a entrada do contaminante nas folhas, intensificando os danos. O número elevado de estômatos aumenta a extração de benzeno da atmosfera para as plantas (Sriprapat e Thiravetyanç., 2012). Para Hiatt (1998) a acumulação de compostos hidrofóbicos nas folhas é afetado pelas características de cada planta e o potencial de acumulação se dá entre a velocidade de entrada e saída do poluente nas folhas.

*Brachiaria brizantha* e *I. walleriana*, no tratamento controle, apresentaram seus estômatos abertos, quando coletadas no período da manhã, mesmo período das contaminações. O grau de condutância estomática variou entre as duas espécies, sendo que a média das aberturas estomáticas de *B. brizantha* foi maior que a média das aberturas dos estômatos de *I. walleriana*. Isto ocorre devido as dimensões dos estômatos de *B. brizantha* serem maiores. Porém, quando comparadas as duas espécies através da área relativa das aberturas estomáticas, que consiste na soma das aberturas estomáticas de todos os estômatos em relação a um milímetro quadrado de área, verifica-se que *I. walleriana* possui uma área relativa de abertura dos

estômatos maior que *B. brizantha*, conforme é apresentado na Tabela 3. *Pteris vittata* não apresentou nenhum estômato aberto no momento da coleta das amostras no tratamento controle, sendo que esta coleta também foi realizada no período da manhã (Figura 25). Esta característica pode justificar a baixa quantidade de injúrias aparentes nas folhas desta espécie, pois durante as contaminações com benzeno, pela manhã, os estômatos provavelmente estavam fechados. O que pode explicar as necroses em algumas folhas é a captura do benzeno através da cutícula, entretanto, os mecanismos de penetração do benzeno na cutícula cerosa ainda são incertos, mas estudos sugerem que a cera pode ser um adsorvente de benzeno (Ugrekheldize et al., 1997).

Tabela 3 – Valores de área das aberturas estomáticas de *B. brizantha* (adaxial) e *I. walleriana* (abaxial) no tratamento controle

Espécie	Aumento	Soma das áreas das aberturas estomáticas ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total da eletromicrografia ( $\text{mm}^2$ )	Área relativa das aberturas estomáticas ( $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ )
<i>Brachiaria brizantha</i>	300x	230,0	0,21	1091,35
<i>Impatiens walleriana</i>	500x	112,4	0,08	1486,51

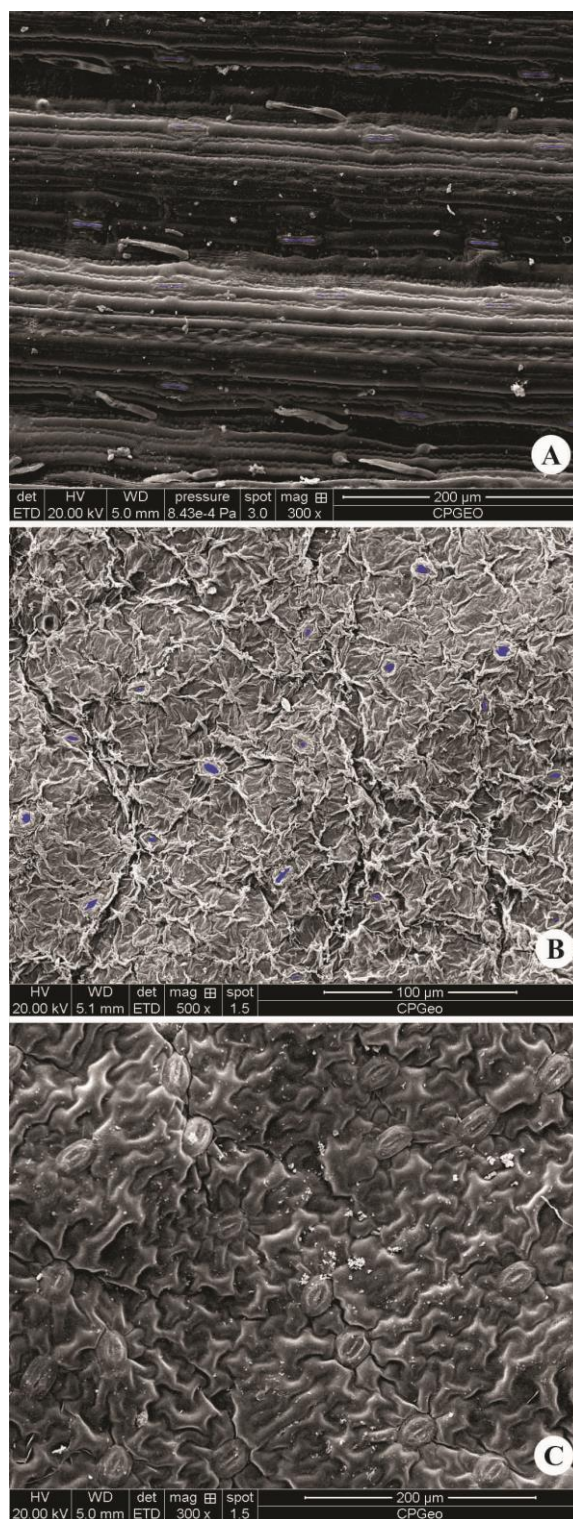


Figura 25 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura de folhas do tratamento controle coletadas no período da manhã, apresentando os estômatos de *B. brizantha* (300x), *Impatiens walleriana* (500x) e *P. vittata* (300x), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul. (A = adaxial; B – C = abaxial).

Apesar de *I. walleriana* possuir uma maior área relativa de abertura dos estômatos, *B. brizantha* possui um número de estômatos por folha muito superior, devido sua característica anfiestomática, sendo assim, *B. brizantha* teria um potencial para absorver, através dos estômatos, uma grande quantidade de benzeno. Esta espécie, aparentemente, é altamente resistente a aspensão de benzeno nas folhas, pois mesmo na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 60 dias os indivíduos não morreram, apenas apresentaram sinal de enfraquecimento, quando comparados com os indivíduos controle. É provável que a espécie possua mecanismos internos que minimizem os danos fisiológicos do benzeno na planta, como por exemplo uma maior compactação do mesofilo foliar, evitando a difusão do contaminante aéreo.

### 5.2.1 Densidade estomática e mensuração dos estômatos

O estômato consiste de um par de células-guarda e o poro estomático (ostíolo). As células subsidiárias, que circundam os estômatos, formando o aparelho estomático, auxiliam as células-guarda no controle da abertura e fechamento dos poros estomáticos. A resistência estomática, ou seja, o grau de fechamento dos estômatos, que por sua vez é o inverso da condutância estomática, é regulada pela planta de forma que a transpiração é proporcional ao balanço de energia, sem induzir o aquecimento excessivo das folhas (Larcher,

2000; Taiz, Zeiger, 2004). Acredita-se que o *status* hídrico das células da epiderme é responsável pela abertura estomática, e não o aumento do *status* hídrico da folha (Inman-Bamber, Smith, 2005). A densidade estomática presente em uma folha é inversamente proporcional à expansão das células da epiderme. Assim, quanto mais as células da epiderme se expandirem durante o crescimento da folha, menor será a densidade estomática (Murphy et al., 2012). A quantidade de estômatos de uma folha é definida no decorrer do processo de crescimento, e os fatores que afetam esta quantidade são as diferenças na intensidade luminosa e a disponibilidade hídrica (Kouwenberg et al., 2004). Entre espécies há uma grande variação nas dimensões e frequência de estômatos, o que tem grande importância nas diferenças de regulações das trocas gasosas (Angelocci, 2002). A regulação da abertura e fechamento estomático é um processo extremamente complexo, envolvendo fatores do ambiente e da própria planta. O rápido fechamento estomático pode ser uma característica desejável e variável em genótipos de plantas, sendo causado pela eficiente sinalização entre as raízes e as folhas (Inman-Bamber, Smith, 2005; Machado, 2009).

A célula-guarda difere-se morfologicamente entre as espécies de plantas (Taiz, Zeiger, 2004), bem como a quantidade, distribuição, tamanho, forma e mobilidade dos estômatos são características específicas de cada espécie e podem ser alteradas em função das adaptações às condições ambientais (Larcher, 2000).

As dimensões e frequência dos estômatos interferem na quantidade de poluentes gasosos absorvida pela planta e, conseqüentemente, nos possíveis efeitos causados pela poluição (Alves



et al., 2001). Nas Tabelas de 4 a 19 encontram-se os dados sobre a contagem do número de estômatos e outros parâmetros, para cada espécie vegetal, a partir da análise de micrografias eletrônicas de varredura. Para cada atributo, tem-se a visualização da eletromicrografia correspondente (Figuras de 26 a 44).

Tabela 4 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Número de estômatos	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidade estomática (nº de estômatos/mm <sup>2</sup> )
<i>Bb</i> /controle	300x	16	0,21	75,92

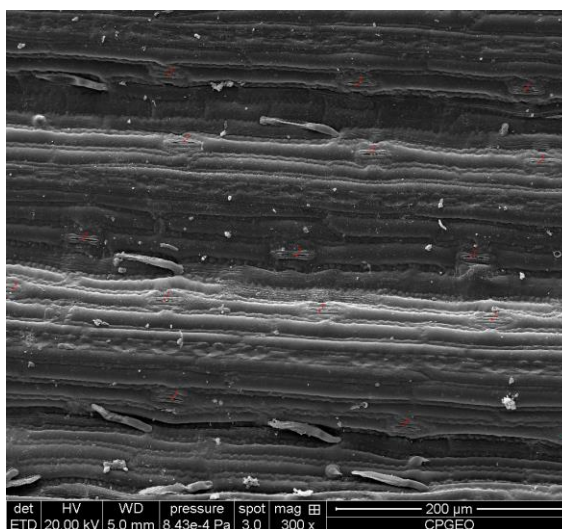


Figura 26 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), no tratamento controle. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se os dados sobre a contagem do número de estômatos e outros parâmetros, respectivamente, para a concentração mínima ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) e concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ). As eletromicrografias correspondentes podem ser visualizadas nas Figuras de 27 e 28.

Tabela 5 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha* na concentração mínima ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) nos três períodos de exposição

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Número de estômatos</b>	<b>Área (<math>\text{mm}^2</math>)</b>	<b>Densidade estomática (nº de estômatos/<math>\text{mm}^2</math>)</b>
<b><i>Bb/10</i></b>	300x	19	0,21	90,16
<b><i>Bb/30</i></b>	300x	28	0,21	132,86
<b><i>Bb/60</i></b>	300x	13	0,21	61,69

Tabela 6 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha* na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) nos três períodos de exposição

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Número de estômatos</b>	<b>Área (<math>\text{mm}^2</math>)</b>	<b>Densidade estomática (nº de estômatos/<math>\text{mm}^2</math>)</b>
<b><i>Bb/10</i></b>	300x	25	0,21	118,63
<b><i>Bb/30</i></b>	300x	26	0,21	123,37
<b><i>Bb/60</i></b>	300x	24	0,21	113,88

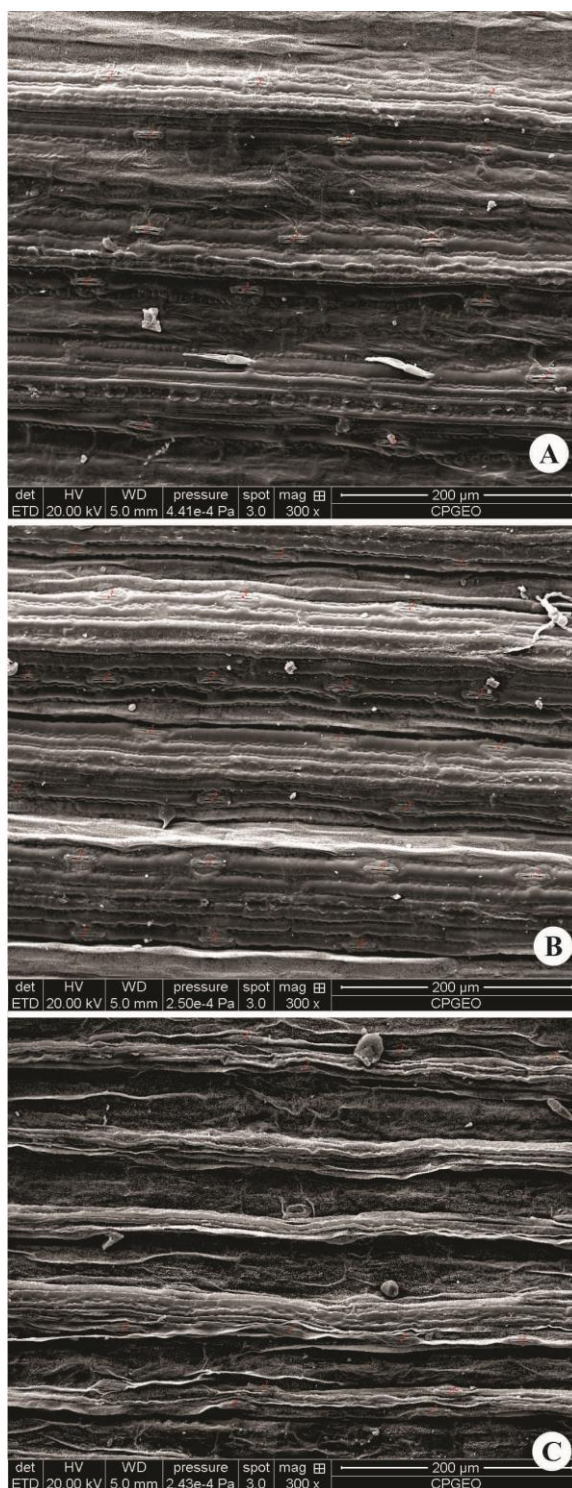


Figura 27 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta à concentração mínima de benzeno ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

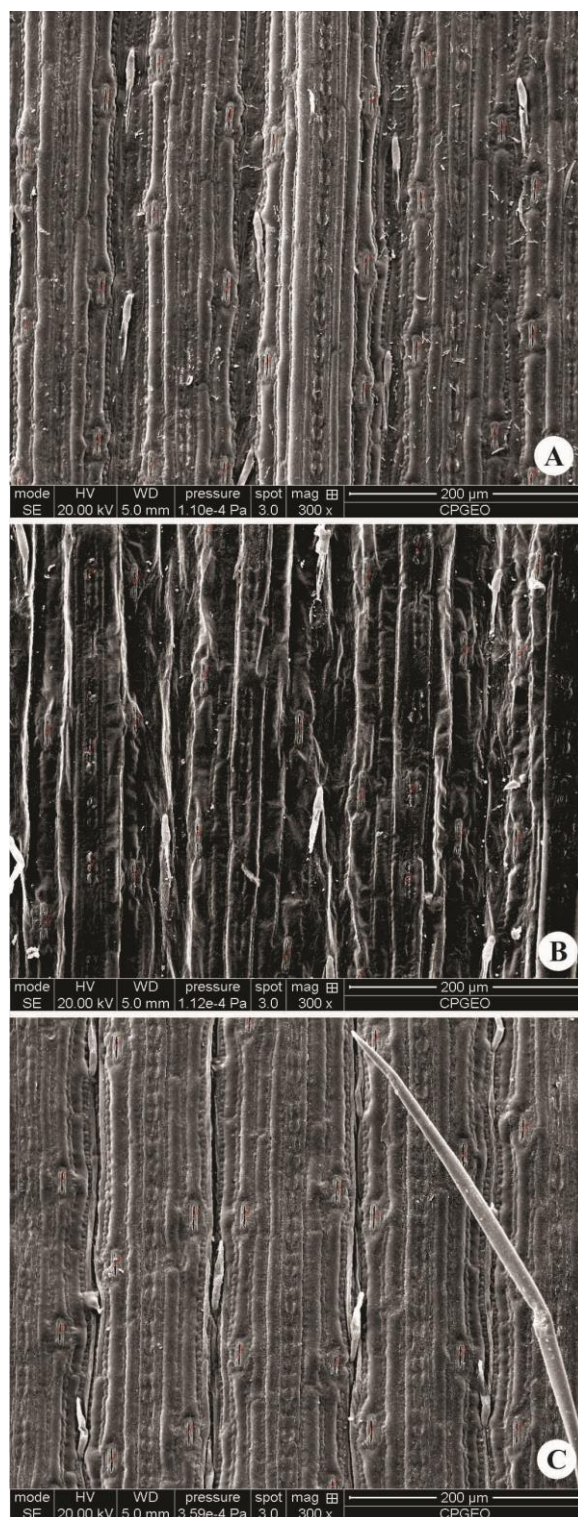


Figura 28 – Densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta à concentração máxima de benzeno (1600 mg L<sup>-1</sup>) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Na Figura 29 estão organizados os valores de densidade estomática de *B. brizantha* na concentração mínima e máxima nos três períodos estabelecidos.

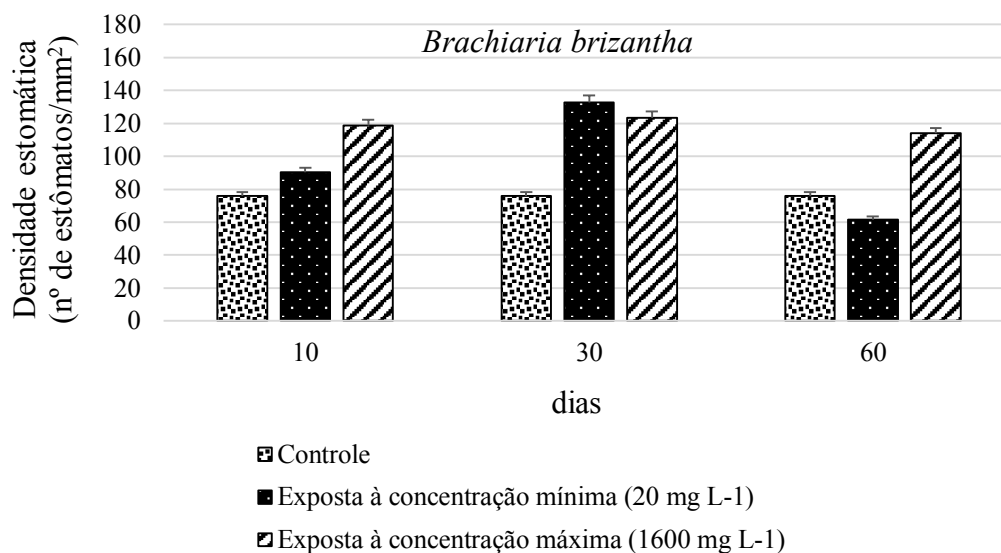


Figura 29 – Visualização a partir de gráfico de barras, da densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta ao tratamento controle e às concentrações mínima e máxima de benzeno, respectivamente, 20 mg L<sup>-1</sup> e 1600 mg L<sup>-1</sup> por 10, 30 e 60 dias.

*Brachiaria brizantha* quando exposta à concentração mínima, apresentou um aumento em sua densidade estomática no 10<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia, contudo houve um decréscimo no número de estômatos quando a planta atingiu os 60 dias de exposição ao benzeno. Isso provavelmente ocorreu, pois o prolongado período de exposição intensificou os danos às células estomáticas e estas não ficaram claramente visíveis nas eletromicrografias. O mesmo ocorreu com a densidade estomática das folhas de *B. brizantha* expostas ao tratamento na concentração máxima de benzeno, ou seja, houve um aumento nos dois primeiros períodos e um decréscimo no terceiro período. Verificou-se que na exposição ao

contaminante, através da aspersão, gerou um aumento da densidade estomática nos 30 primeiros dias, sendo que o prolongado período de exposição levou à redução do número de estômatos, possivelmente, pelos danos causados nas células-guarda.

A média das densidades estomáticas na concentração máxima (118,63 estômatos/mm<sup>2</sup>) foi significativamente maior que na concentração mínima (94,90 estômatos/mm<sup>2</sup>), isso indica que em concentrações maiores a espécie reage com aumento da densidade dos estômatos. O movimento estomático é o meio mais rápido de que a planta dispõe para ajustar-se às variações ambientais a que os órgãos fotossintéticos são submetidos, e com um número maior de estômatos a planta possui um controle maior da interação planta-ar (Passioura, 1982). A principal via de entrada do benzeno volatilizado nas plantas ocorre através dos estômatos, mas em solução o contaminante pode ser adsorvido por toda a superfície foliar (Miller, 1993). Através de microscópio eletrônico de varredura, da parte adaxial da folha de *B. brizantha*, verificou que as células-guarda dos estômatos são halteriformes e possuem tricomas morfológicamente semelhantes a acúleos.

Os resultados das medidas dos estômatos estão descritos abaixo, os valores das aberturas do ostíolo podem ser verificados nas Tabelas de 7 a 9 e as eletromicrografias correspondentes nas Figuras de 30 a 32.

De maneira geral verificou-se uma redução na área dos estômatos de *B. brizantha* em ambas as concentrações com benzeno. No tratamento controle os estômatos apresentaram uma área de

230,6  $\mu\text{m}^2$ , já quando a planta foi exposta à concentração mínima de benzeno (20 mg L<sup>-1</sup>) por 10, 30 e 60 dias, a área dos estômatos foram, respectivamente, 180,1  $\mu\text{m}^2$ , 159,1  $\mu\text{m}^2$  e 97,25  $\mu\text{m}^2$ . Já na concentração máxima (1600 mg L<sup>-1</sup>) não se obteve um padrão decrescente de valores, mas em todos períodos os valores de área estavam abaixo do resultado encontrado no tratamento controle. Estudo realizado por Alves et al. (2001), onde uma espécie vegetal foi exposta a poluentes aéreos na cidade de São Paulo, verificou uma redução no tamanho dos estômatos das plantas expostas ao ambiente poluído, quando comparada com plantas-controle. Este mesmo autor diz que existe uma tendência geral para caracteres anatômicos mensuráveis que relaciona a diminuição no tamanho com o aumento na frequência do caráter, e isto foi observado para *B. brizantha*, onde houve um aumento na densidade estomática com a redução no tamanho dos estômatos.

A redução no tamanho dos estômatos, pode influenciar na abertura estomática, tornando-a menor, e isto pode ser verificado nas Tabelas 7, 8 e 9. Este fato é favorável para plantas expostas a poluentes, pois esta é uma maneira de diminuir a absorção do contaminante e evitar danos as folhas.

Tabela 7 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Maior ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Menor ( $\mu\text{m}$ )
<i>Bb</i> /controle	3000x	23,30	55,40	27,10	0,60



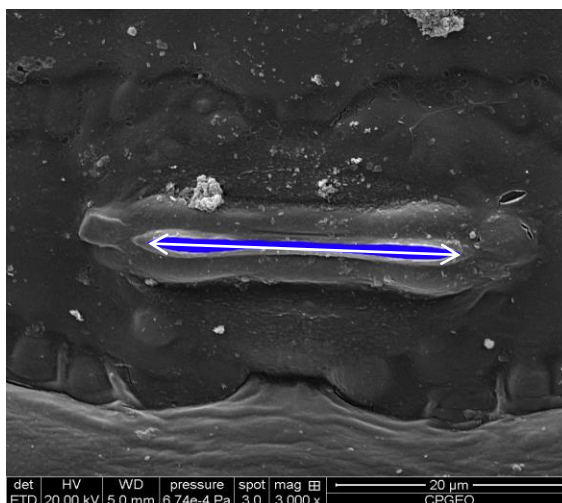


Figura 30 – Eletromicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura, apresentando estômato da face adaxial de *B. brizantha* (3000x) no tratamento controle. Destaque para a área da abertura estomática em azul e seta indicando o diâmetro maior.

Tabela 8 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* após os três períodos de contaminação na concentração mínima ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ )

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Maior ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Menor ( $\mu\text{m}$ )
<i>Bb/10</i>	3000x	18,70	38,60	19,90	0,70
<i>Bb/30</i>	3000x	18,10	43,20	21,30	0,60
<i>Bb/60</i>	3000x	0,96	6,58	18,00	0,20



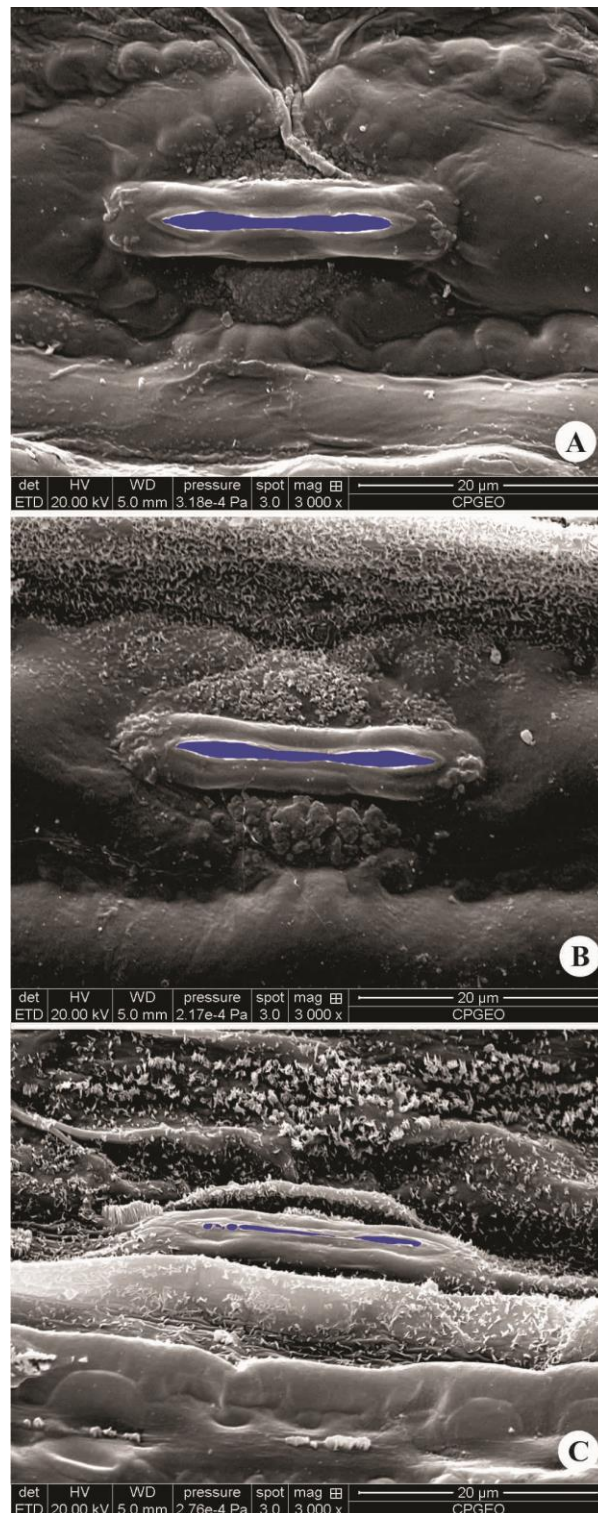


Figura 31 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, apresentando os estômatos da face adaxial de *B. brizantha* (3000x) após período de contaminação de 10, 30 e 60 dias na concentração mínima ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

Tabela 9 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* após os três períodos de contaminação na concentração máxima (1600 mg L<sup>-1</sup>)

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Área (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Perímetro (µm)</b>	<b>Diâmetro Maior (µm)</b>	<b>Diâmetro Menor (µm)</b>
<b><i>Bb/10</i></b>	3000x	17,15	37,1	18,05	0,65
<b><i>Bb/30</i></b>	3000x	17,35	51,3	24,75	0,2
<b><i>Bb/60</i></b>	3000x	17,60	43,00	20,70	0,6

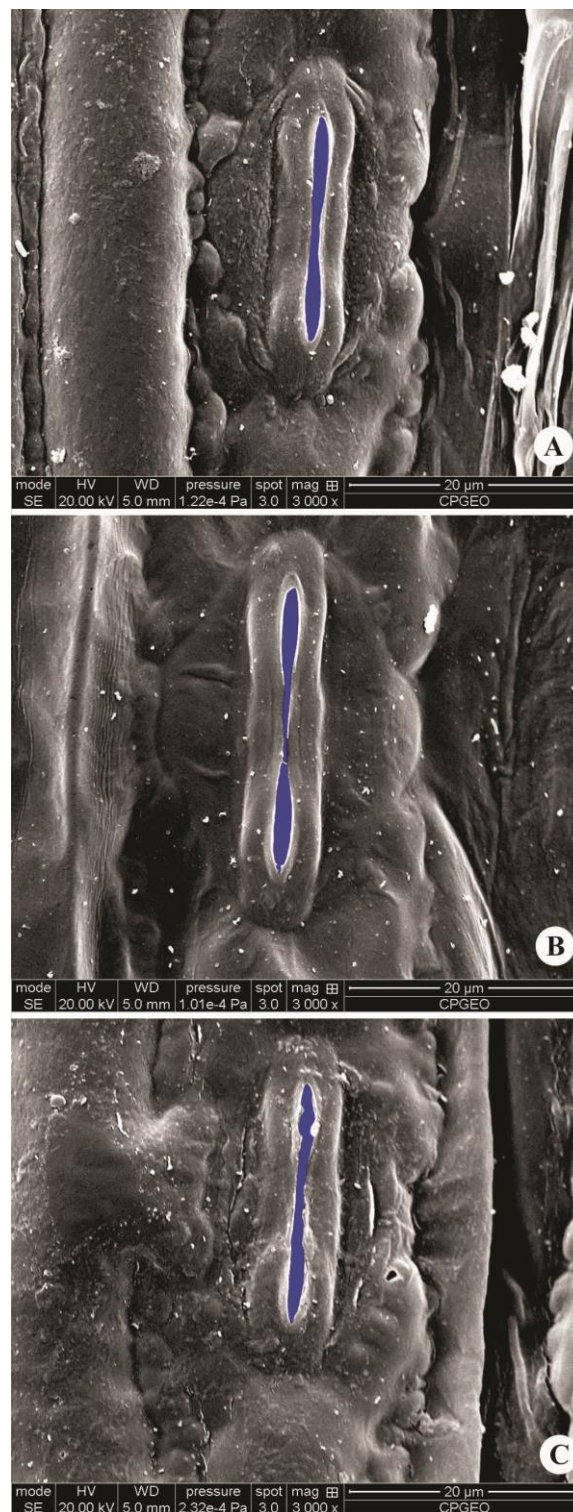


Figura 32 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, apresentando os estômatos da face adaxial de *B. brizantha* (3000x) após período de contaminação de 10, 30 e 60 dias na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

Tabela 10 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Número de estômatos	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidade estomática (nº de estômatos/mm <sup>2</sup> )
<i>Iw</i> /controle	500x	23	0,08	304,18

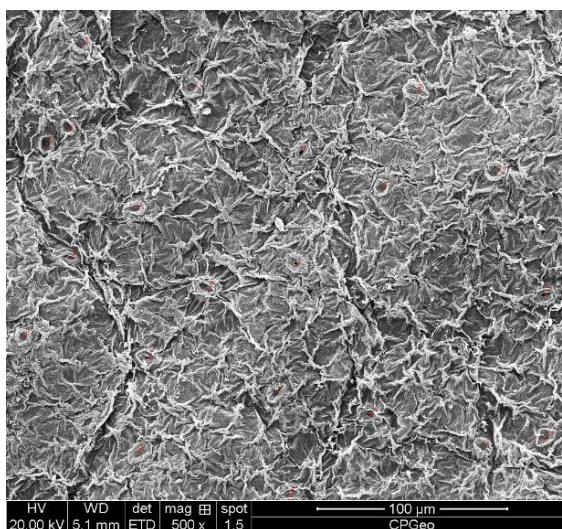


Figura 33 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana*, a partir de eletromicrografia de varredura (500x), no tratamento controle. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Tabela 11 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana* na concentração mínima (20 mg L<sup>-1</sup>) nos três períodos de exposição

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Número de estômatos	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidade estomática (nº de estômatos/mm <sup>2</sup> )
<i>Iw</i> /10	500x	21	0,08	277,73
<i>Iw</i> /30	500x	11	0,08	145,64
<i>Iw</i> /60	500x	9	0,08	119,03



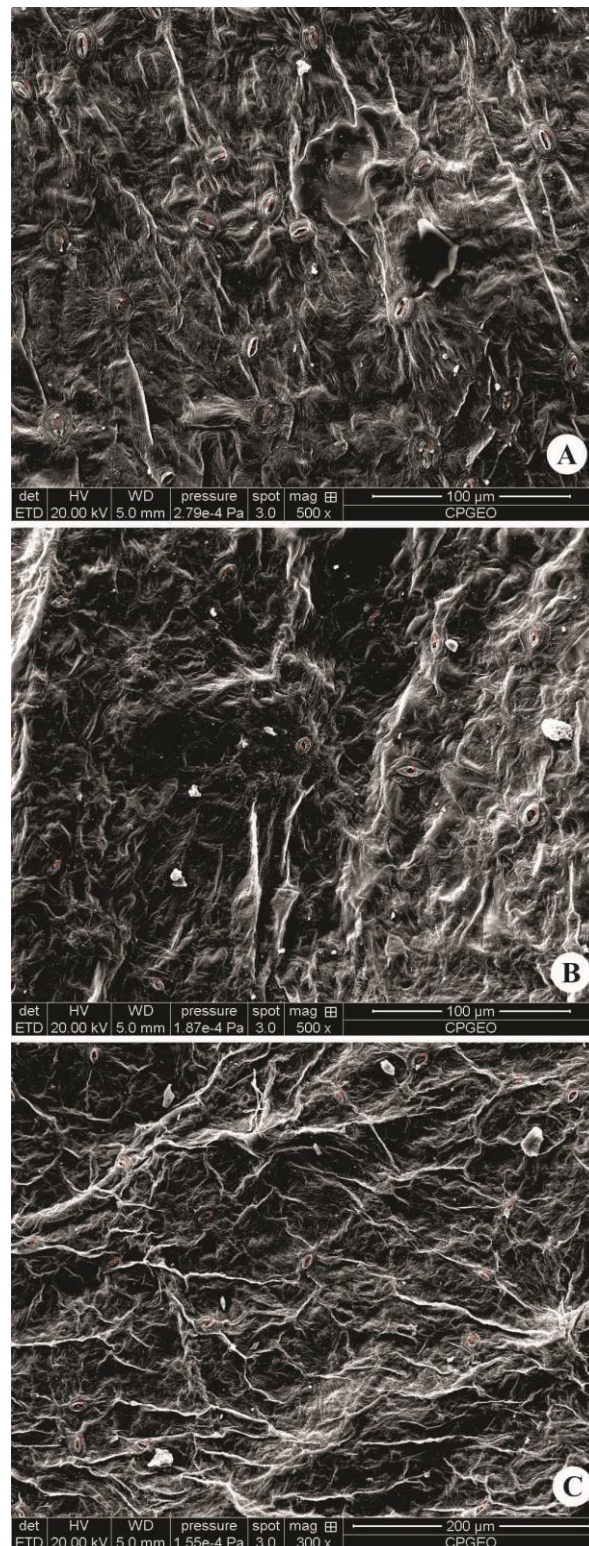


Figura 34 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana*, a partir de eletromicrografia de varredura (500x), exposta à concentração mínima de benzeno (20 mg L<sup>-1</sup>) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Tabela 12 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana* na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) nos três períodos de exposição

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Número de estômatos	Área ( $\text{mm}^2$ )	Densidade estomática (nº de estômatos/ $\text{mm}^2$ )
<i>Iw/10</i>	500x	19	0,08	251,28
<i>Iw/50</i>	500x	19	0,08	251,28

Nota: O período de 60 dias não foi atingido, pois a partir do 50º dia todas as folhas sofreram abscisão.

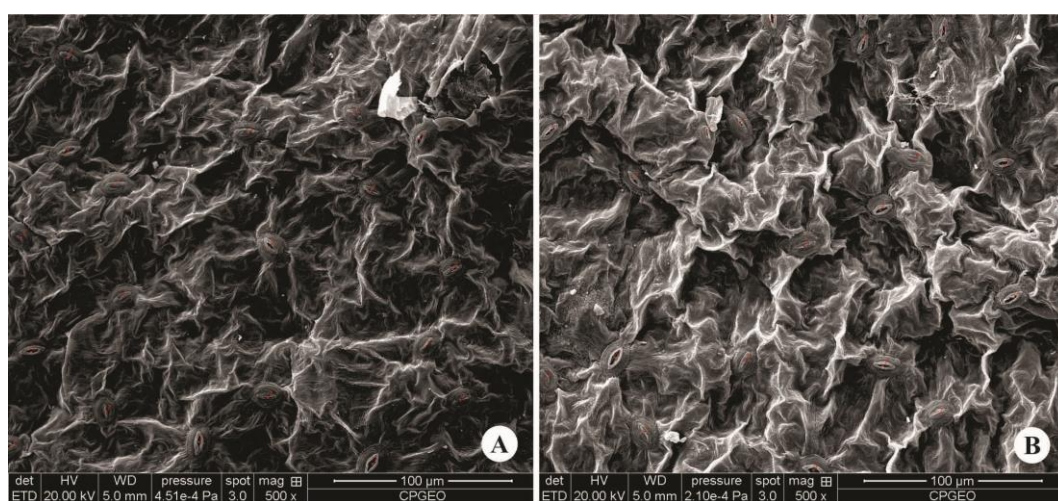


Figura 35 – Densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana*, a partir de eletromicrografia de varredura (500x), exposta à concentração máxima de benzeno ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Na Figura 36 estão organizados os valores de densidade estomática de *I. walleriana* na concentração mínima e máxima nos três períodos estabelecidos.

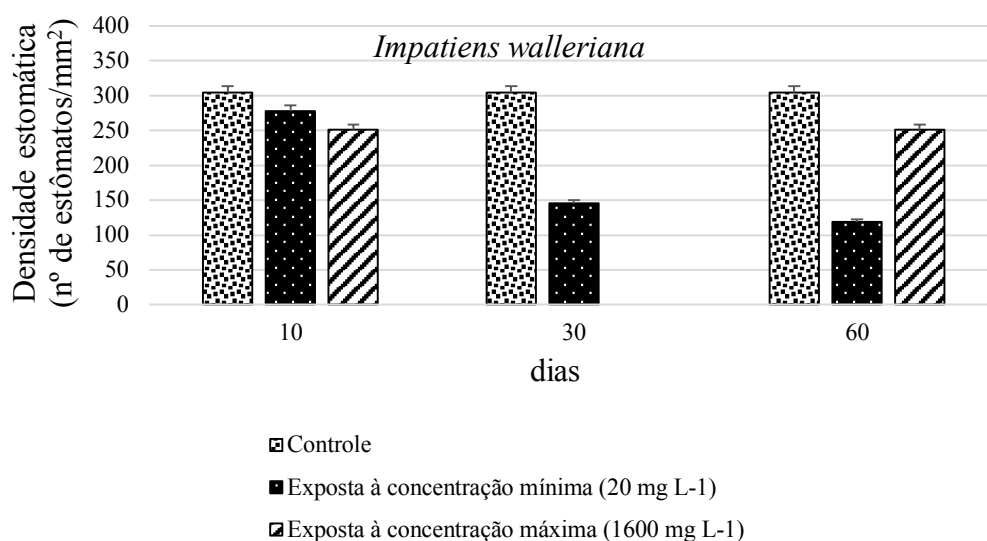


Figura 36 – Visualização a partir de gráfico de barras, da densidade estomática da face abaxial de *I. walleriana*, a partir de eletromicrografia de varredura (500x), exposta ao tratamento controle e às concentrações mínima e máxima de benzeno, respectivamente, 20 mg L<sup>-1</sup> e 1600 mg L<sup>-1</sup> por 10, 30 e 60 dias. Na concentração máxima no período de 60 dias a folha foi exposta por 50 dias, pois a partir deste período todas as folhas sofreram abscisão.

A densidade estomática de *I. walleriana*, exposta a 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, apresentou uma redução gradual no decorrer dos 60 dias, e deduz-se que mesmo em baixas concentrações o benzeno causa danos aos estômatos desta espécie, e quanto mais prolongado for o período de exposição ao contaminante, mais estômatos são danificados e a densidade estomática é reduzida. Por outro lado, esta diminuição no número de estômatos pode ter reduzido a absorção do benzeno e evitado danos maiores ao mesófilo foliar, o que poderia levar a morte do indivíduo (Larcher, 2000). Entretanto, a redução da densidade estomática diminui a eficiência nas trocas gasosas e, conseqüentemente, reduz a assimilação de carbono, comprometendo a capacidade fotossintética da planta (Santos, 2012).

Na concentração máxima a densidade estomática aos 10 e 50 dias apresentaram os mesmos valores (251,28 estômatos/mm<sup>2</sup>) com uma diminuição em relação ao tratamento controle (304,18 estômatos/mm<sup>2</sup>). A planta não alterou significativamente sua densidade estomática, podendo provavelmente ter sido, juntamente com o alto teor de benzeno, o fator que levou a morte do indivíduo no 50º dia de contaminação, pois o maior número de estômatos facilitou a entrada de benzeno no mesofilo foliar, causando danos irreversíveis as células clorofilianas, levando a morte da planta.

Os estômatos e a aberturas dos ostíolos de *I. walleriana* também foram caracterizados e os resultados podem ser verificados nas Tabelas 13 a 15.

A área dos estômatos de *I. walleriana* nos dois tratamentos com benzeno, em todos os períodos, teve considerável aumento quando comparada com os estômatos do tratamento controle. Entretanto, não foi possível estabelecer um padrão dos valores da área de abertura dos estômatos, pois tiveram grande variação entre si no mesmo tratamento, como se observa na Figura 38-A, que representa o tratamento na concentração mínima por 10 dias, a média obtida de 18,13 µm<sup>2</sup> é resultado de valores mínimo e máximo bastante flutuantes. A maior área estomática corrobora com os sintomas observados, pois o aumento no tamanho dos estômatos, permitiu que a condutância estomática também aumentasse, o que intensificou a captação do benzeno através dos estômatos e justifica a maior intensidade de sintomas visíveis nesta espécie. Observa-se a diminuição da abertura do



estômato na Figura 39-C, pois o longo período de exposição, provavelmente, causou danos mais intensos às células-guarda.

Na concentração mínima, a condutância estomática, também teve um leve aumento, quando comparada com o controle. Contudo, isto não levou à morte do indivíduo, pois possivelmente a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno não é letal para esta espécie quando exposta por um período de até 60 dias.

Tabela 13 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face abaxial, de *B. brizantha* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Maior ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Menor ( $\mu\text{m}$ )
<i>Iw</i> /controle	2000x	3,08	6,94	2,67	1,5

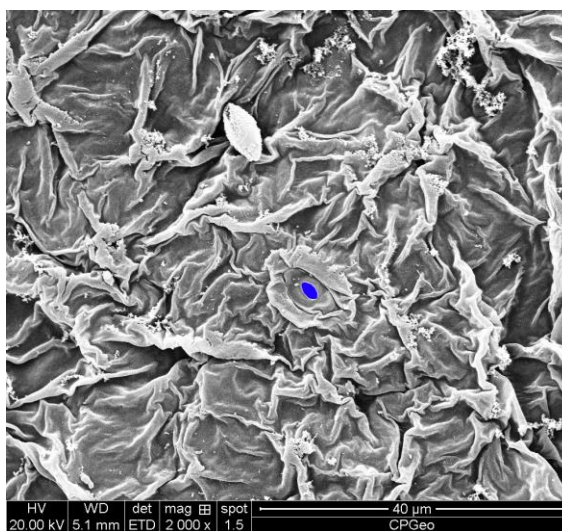


Figura 37 – Eletromicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura, apresentando estômato da face abaxial de *I. walleriana* (2000x) no tratamento controle. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

Nas Tabelas 14 e 15 encontram-se os dados sobre as mensurações dos estômatos de *I. walleriana*, respectivamente, para a concentração mínima e concentração máxima. As eletromicrografias correspondentes podem ser visualizadas nas Figuras de 38 e 39.

Tabela 14 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face abaxial, de *I. walleriana* após os três períodos de contaminação na concentração mínima (20 mg L<sup>-1</sup>)

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Área (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Perímetro (µm)</b>	<b>Diâmetro Maior (µm)</b>	<b>Diâmetro Menor (µm)</b>
<i>Iw/10</i>	5000x	18,13	20,91	8,3	2,75
<i>Iw/30</i>	5000x	5,5	10,5	4,4	1,7
<i>Iw/60</i>	5000x	4,7	10,60	4,7	1,1

Tabela 15 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face abaxial, de *I. walleriana* após os três períodos de contaminação na concentração máxima (1600 mg L<sup>-1</sup>)

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Área (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Perímetro (µm)</b>	<b>Diâmetro Maior (µm)</b>	<b>Diâmetro Menor (µm)</b>
<i>Iw/10</i>	5000x	6,1	11,3	5,0	1,5
<i>Iw/30</i>	5000x	5,95	13,2	5,45	1,15
<i>Iw/50</i>	5000x	0,33	2,67	1,1	0,6

Nota: O período de 60 dias não foi atingido, pois a partir do 50º dia todas as folhas sofreram abscisão.

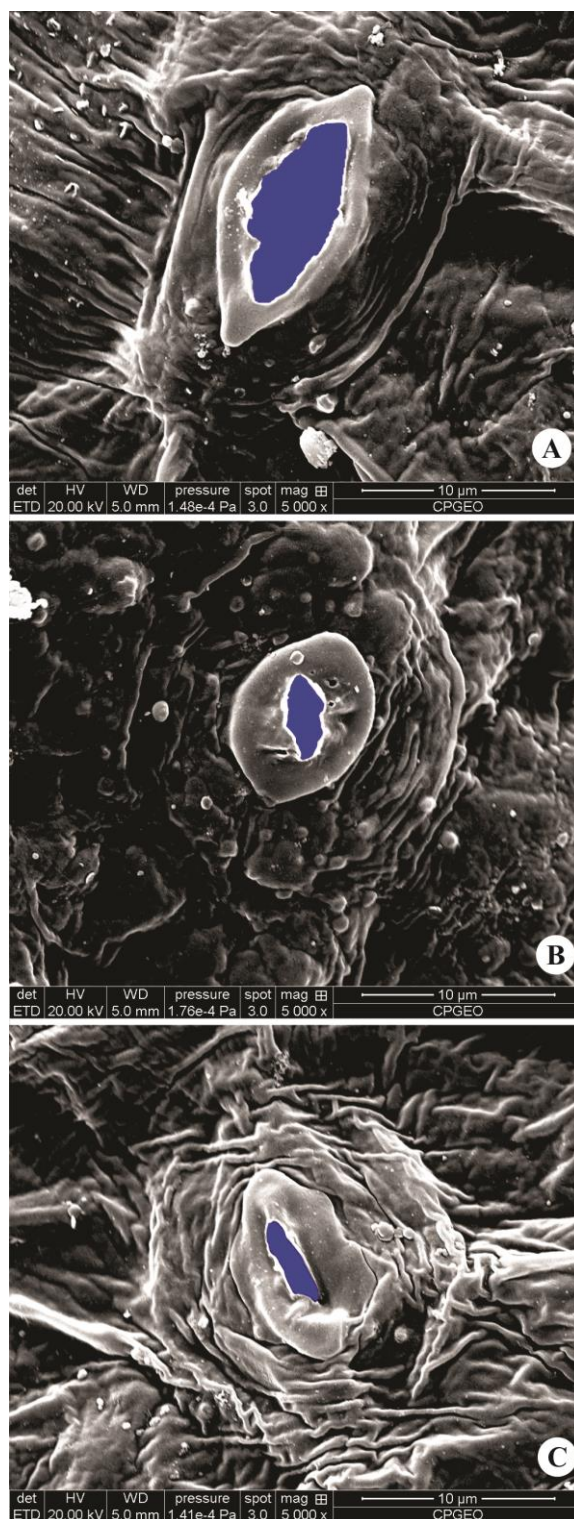


Figura 38 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, apresentando os estômatos da face abaxial de *I. walleriana* (5000x) após período de contaminação de 10, 30 e 60 dias na concentração mínima (20 mg L<sup>-1</sup>), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

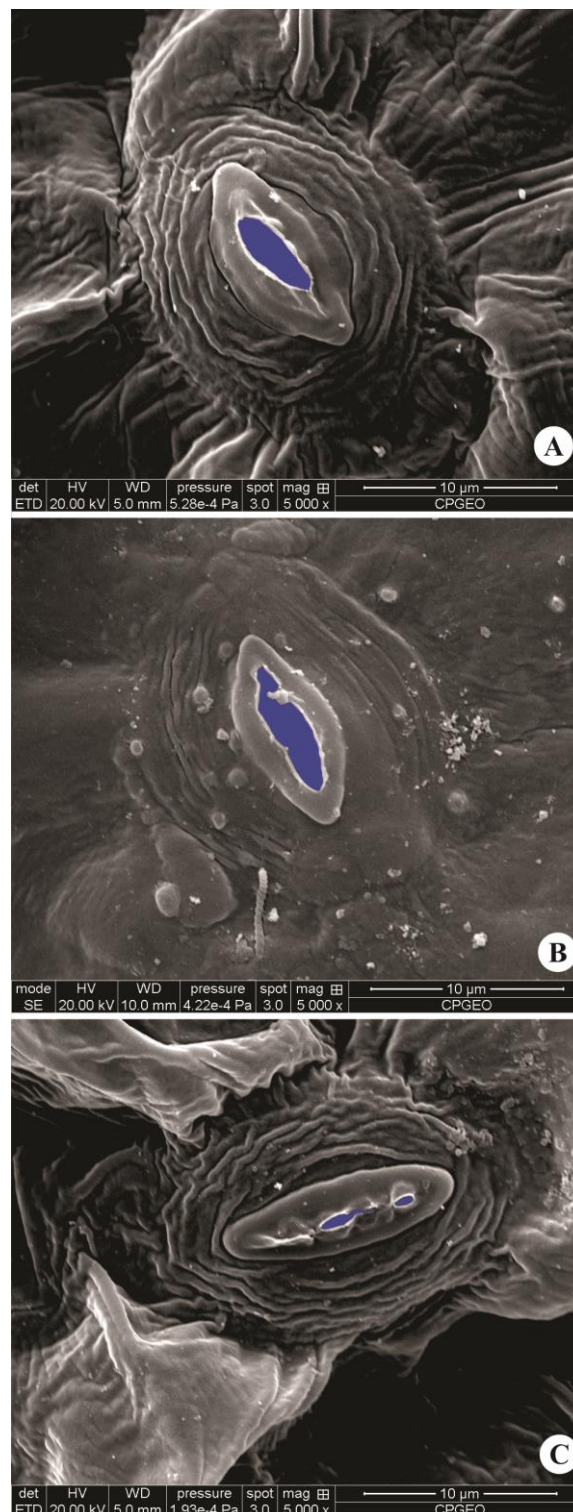


Figura 39 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, apresentando os estômatos da face abaxial de *I. walleriana* (5000x) após período de contaminação de 10, 30 e 60 dias na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

Tabela 16 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Número de estômatos	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidade estomática (nº de estômatos/mm <sup>2</sup> )
<i>Pv</i> /controle	300x	21	0,21	99,65

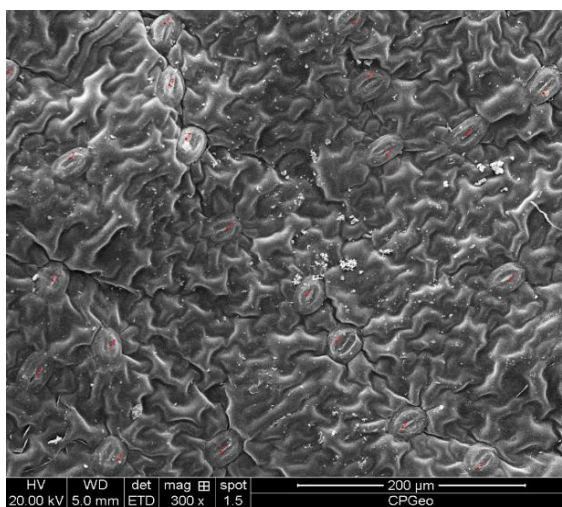


Figura 40 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), no tratamento controle. A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Tabela 17 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata* na concentração mínima (20 mg L<sup>-1</sup>) nos três períodos de exposição

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Número de estômatos	Área (mm <sup>2</sup> )	Densidade estomática (nº de estômatos/mm <sup>2</sup> )
<i>Pv</i> /10	300x	14	0,21	66,43
<i>Pv</i> /30	300x	15	0,21	71,18
<i>Pv</i> /60	300x	25	0,21	118,63
<i>Pv</i> /60 EDC	300x	23	0,21	109,14

Nota: Emergiu durante a contaminação (EDC)



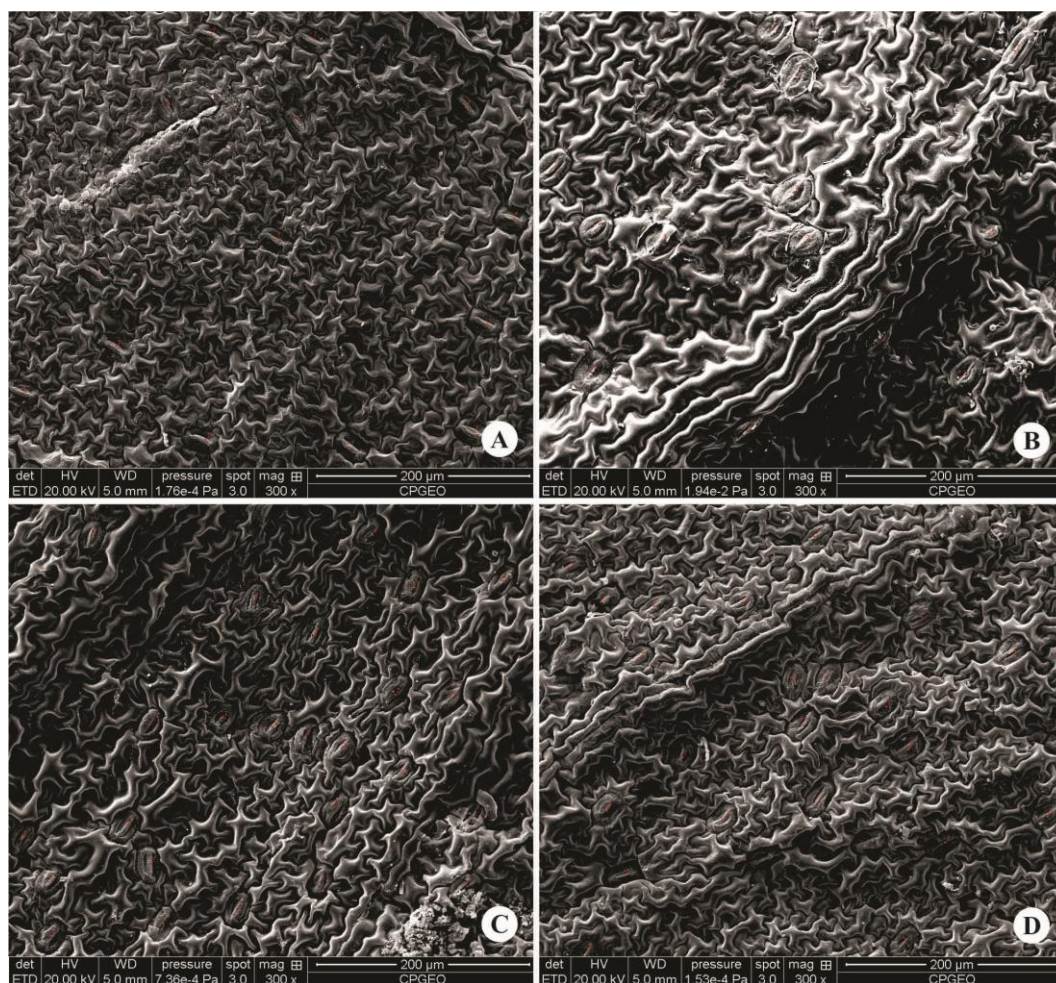


Figura 41 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta à concentração mínima de benzeno ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A eletromicrografia D refere-se a folha que emergiu durante a contaminação (ECD). A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

Tabela 18 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata* na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) nos três períodos de exposição

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Número de estômatos	Área ( $\text{mm}^2$ )	Densidade estomática (nº de estômatos/ $\text{mm}^2$ )
<i>Pv/10</i>	300x	46	0,21	218,27
<i>Pv/30</i>	300x	24	0,21	113,88
<i>Pv/60</i>	300x	23	0,21	109,14
<i>Pv/60 EDC</i>	300x	15	0,21	71,18

Nota: Emergiu durante a contaminação (EDC)



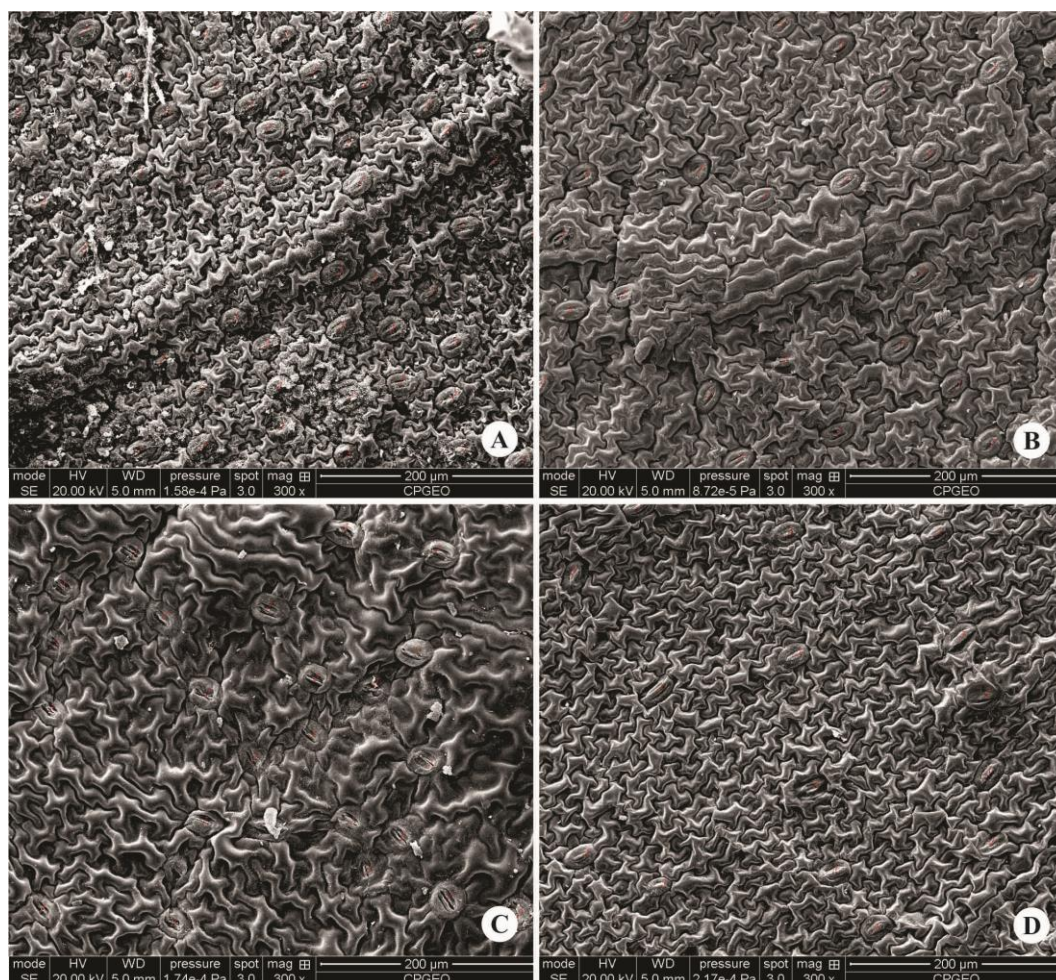


Figura 42 – Densidade estomática da face abaxial de *P. vittata*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta à concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 10, 30 e 60 dias, respectivamente, identificadas por A, B e C. A eletromicrografia D refere-se a folha que emergiu durante a contaminação (ECD). A contagem (em vermelho) foi efetuada pelo software ImageJ.

No decorrer da exposição ao contaminante, para o período preestabelecido de 60 dias, algumas folhas da *P. vitatta* emergiram e iniciaram o processo de expansão durante todo o período de contaminação, sendo que estas folhas, ao término dos 60 dias, não apresentaram nenhum sinal de danos visíveis, como clorose e necrose, mas foi possível observar uma sinuosidade nos folíolos e uma aparência mais fina e translúcida destes.

Na Figura 43 estão organizados os valores de densidade estomática de *P. vittata* na concentração mínima e máxima nos três períodos estabelecidos.

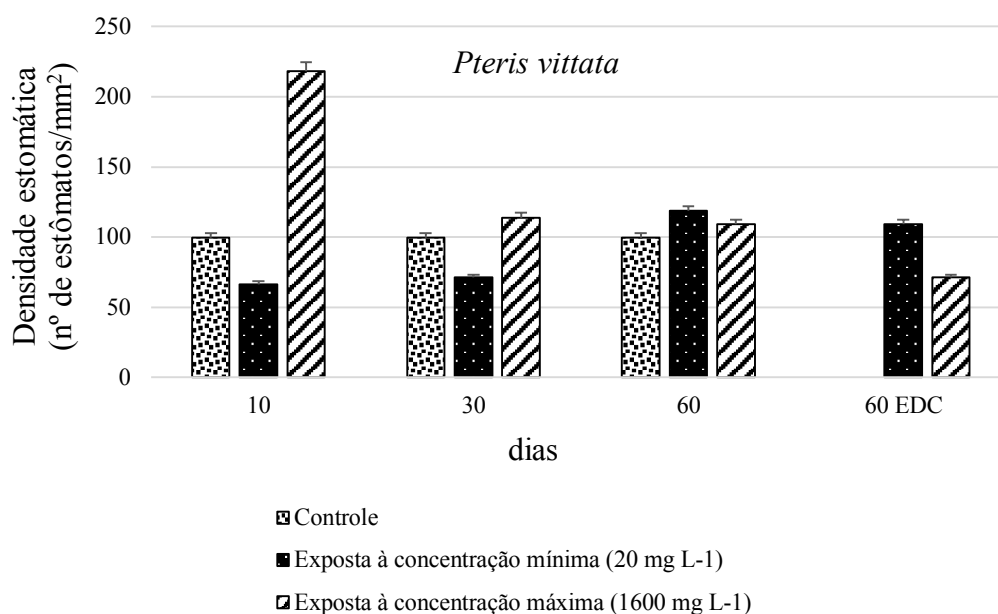


Figura 43 – Visualização a partir de gráfico de barras, da densidade estomática da face abaxial de *P. vittata*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta ao tratamento controle e às concentrações mínima e máxima de benzeno, respectivamente, 20 mg L<sup>-1</sup> e 1600 mg L<sup>-1</sup> por 10, 30 e 60 dias. No eixo x é apresentado 60 EDC que corresponde às folhas que emergiram durante a contaminação de 60 dias.

*Pteris vittata* exposta à concentração máxima de benzeno, apresentou maiores valores de densidade estomática, quando comparadas com o tratamento controle, exceto nas folhas que emergiram durante a contaminação, que apresentou densidade estomática de 71,18 estômatos/mm<sup>2</sup>. Já as plantas expostas à concentração mínima, quando comparadas com o controle, apresentaram densidade estomática menor nos 30 primeiros dias e maior aos 60 dias de exposição ao benzeno.



Diversos fatores ambientais podem ser responsáveis por diferenças na quantidade de estômatos, como a luminosidade, a umidade, a temperatura e exposição a contaminantes (Lee et al., 1988), sendo que a densidade é uma característica determinada pelo conjunto de fatores ao qual o vegetal está exposto. As folhas que emergiram durante a contaminação nos 60 dias de experimento, tiveram condições mais controladas, sendo que quando comparadas ao tratamento controle (99,65 estômatos/mm<sup>2</sup>), observa-se um leve aumento na densidade estomática das plantas expostas a 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno (109,14 estômatos/mm<sup>2</sup>) e uma grande redução na densidade das plantas expostas a 1600 mg L<sup>-1</sup> de benzeno (71,18 estômatos/mm<sup>2</sup>).

Possivelmente o fator principal que afetou a densidade estomática foi a concentração do contaminante, pois em alta concentração de benzeno a planta reagiu com a drástica redução do número de estômatos. Conforme Larcher (2000), isso pode estar relacionado a uma tentativa do vegetal em diminuir a incorporação do poluente. Já na concentração mínima a densidade estomática apresentou pouca variação com o tratamento controle, indicando que a aspersão de benzeno a 20 mg L<sup>-1</sup> não interfere a ponto de alterar significativamente a densidade estomática, e a baixa concentração de benzeno não é letal para esta espécie.

A área dos estômatos de *P. vittata* foi mensurada, e observou-se que entre as três espécies esta é a que possui os estômatos de maiores dimensões. No tratamento controle os estômatos apresentaram uma área de 806,33 μm<sup>2</sup>. As plantas expostas ao benzeno tiveram uma redução na área dos estômatos nas concentrações mínima

e máxima, em todos os períodos. Apesar de possuir grandes estômatos, a espécie comportou-se de maneira a evitar danos mais intensos, que poderiam levar a morte da planta. Este resultado corrobora com a ideia de Cornejo et al. (1999), que somente o tamanho dos estômatos não explica a capacidade de captura de um poluente atmosférico, é necessário outros parâmetro como densidade estomática. Somando-se a isso outros fatores que podem interferir na condutância estomática devem ser levados em consideração em estudos futuros.

Não foi possível quantificar a abertura dos estômatos em todos os tratamentos e períodos, somente na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ), nos três períodos (10, 30 e 60 dias), os estômatos apresentaram abertura do ostíolo. Isto justifica a maior intensidade de danos visíveis nas folhas de *P. vittata* na concentração máxima. Os resultados podem ser verificados na Tabela 19.

Tabela 19 – Caracterização da abertura dos estômatos, da face abaxial, de *P. vittata* após os três períodos de contaminação na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ )

<b>Espécie/Período de exposição (dias)</b>	<b>Aumento</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro Maior (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro Menor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<i>Pv/10</i>	2500x	4,0	16,0	7,1	0,9
<i>Pv/30</i>	2500x	20,4	27,0	9,8	2,7
<i>Pv/60</i>	2500x	13,83	36,07	15,63	1,53

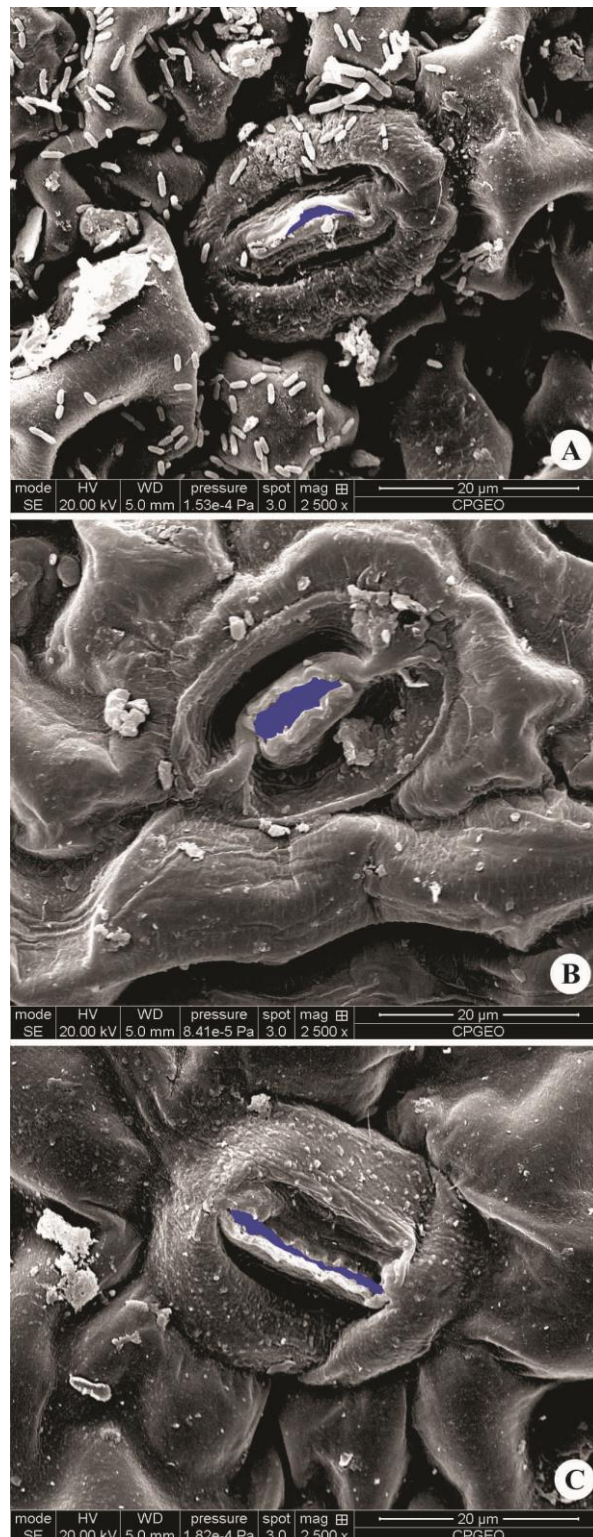


Figura 44 – Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, apresentando os estômatos da face abaxial de *P. vittata* (2500x) após período de contaminação de 10, 30 e 60 dias na concentração máxima ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente, identificadas por A, B e C. Destaque para a área da abertura estomática em azul.

Nas folhas de *I. walleriana*, expostas ao nevoeiro com benzeno, constatou-se a modificação na forma e turgidez das células epidérmicas, crista estomática deformada e ruptura da crista estomática (Campos et al., 2014). Em *P. vittata* os tricomas apresentaram-se flácidos e a célula apical dos tricomas secretores apresentou-se disforme, ao passo que, nos estômatos, houve alteração da turgidez celular (Campos et al., 2014). Em *B. brizantha* o grau de danos foi equivalente para as duas faces foliares, provavelmente, por elas apresentarem características micromorfológicas semelhantes, como a presença de estômatos e tricomas abundantes (Campos et al., 2014). Os principais danos ocasionados pelo benzeno nas folhas foram lesão da crista estomática e perda de turgidez das células epidérmicas (Campos et al., 2014). Entretanto, deve-se destacar que a planta não respondeu com sintomas macroscópicos, ou seja, sem danos aparentes à exposição ao benzeno.

Como foi verificado neste estudo, as espécies comportaram-se de maneira diferente em relação as características estomáticas, ou seja, houve aumento na densidade estomática em *B. brizantha* e *P. vittata* e uma redução na frequência dos estômatos em *I. walleriana*. Estudos realizados por Sharma (1989) e Matyssek et al. (1993) mostraram uma diminuição na densidade estomática das espécies estudadas, já Evans et al. (1996) e Pääkköen et al (1997) registraram um aumento na densidade dos estômatos nas plantas expostas a poluentes atmosféricos.

Fahn e Cutler (1992) afirmam que plantas xeromórficas apresentam estômatos menores e densidades estomáticas maiores.

Segundo Balaganskaya e Kudrjavitseva (1998), o aumento do grau de xeromorfismo em um vegetal pode ser em decorrência de um poluente. *Brachiaria brizantha* e *P. vittata*, de maneira geral, apresentaram aumento na densidade estomática e redução no tamanho dos estômatos. Para Larcher (2000) o aumento da densidade estomática e redução no tamanho dos estômatos, representa uma forma de maximizar a eficiência no fechamento dos estômatos, um importante recurso para plantas sob estresse de contaminantes no ar.

Segundo Godoi et al. (2010) quanto maior a concentração de poluentes orgânicos voláteis, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, menores são os teores de clorofila e espessura do parênquima clorofiliano. A partir disto, pode-se deduzir que *B. brizantha* e *P. vittata* tiveram uma compactação do mesofilo, o que dificultaria a difusão do poluente nos tecidos foliares (Alves, 2008) e reduziria os danos visíveis nas folhas. Para Eleftheriou (1987) a compactação do mesofilo seria uma estratégia de adaptação ambiental quando o vegetal se encontra sob condições atmosféricas desfavoráveis.

*Brachiaria brizantha* e *P. vittata* expostas ao benzeno, apresentaram aumento da densidade estomática e redução no tamanho dos estômatos, estas características conferem a planta um maior controle da interação planta-ar em ambientes poluídos e correspondem a características de plantas xeromórficas, que possuem um mesofilo mais compacto e que dificulta a difusão do contaminante, justificando o menor número de injúrias visíveis nestas espécies. *Impatiens walleriana* comportou-se de maneira diferente, apresentando redução

da densidade estomática e aumento no tamanho dos estômatos, podendo justificar os sintomas visíveis mais intensos nesta espécie.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos realizados podemos concluir que *B. brizantha* e *P. vittata* não apresentam potencial fitorremediador para solo contaminado com benzeno. *Brachiaria brizantha* por não suportar o tratamento com contaminante e morrer após 10 dias. *Pteris vittata* porque apesar de ser tolerante ao benzeno, evitou a absorção e a translocação.

*Impatiens walleriana* é a espécie que agrega mais características desejáveis em plantas fitorremediadoras, pois absorveu grande quantidade de benzeno e translocou preferencialmente para a parte aérea, onde foi possível observar injúrias. Essa espécie apresentou pouco acúmulo de peróxido de hidrogênio e morte celular, provavelmente por possuir um eficiente sistema antioxidante e/ou pela eliminação do contaminante através da fitovolatilização, que possibilitou a sobrevivência da planta.

Nos experimentos com aspersão de benzeno na parte aérea das plantas, todas as espécies apresentaram efeitos fitotóxicos nas folhas com maior ou menor intensidade. As três espécies se mostraram resistentes à concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de benzeno, possivelmente por esta concentração estar dentro do limite de tolerância. *Impatiens walleriana* foi a espécie menos tolerante na concentração máxima, provavelmente por possuir uma abundância maior de estômatos. *Pteris*

*vittata* e *B. brizantha* apresentaram-se mais resistentes. *Pteris vittata* possivelmente estava com os estômatos fechados durante a contaminação minimizando a absorção do benzeno, enquanto que *B. brizantha* provavelmente possui mecanismos internos que minimizam os danos nas folhas.

Este estudo revelou o potencial da utilização de diferentes espécies para a fitorremediação de água subterrânea (zona não saturada) contaminada por benzeno e discute o comportamento das espécies vegetais quando expostas ao benzeno presente na atmosfera.



## 7 REFERÊNCIAS

Abichequer AD, Bohnen H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 1988 Jan/Mar;22(1):21-26.

Accioly AMA, Siqueira JO. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais RF, Alvarez V, Schaefer CEGR, editores. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; 2000. p. 299-352.

Aguiar CRC. Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação e solos contaminados com petróleo [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2006, 109 p.

Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. *Chemosphere*. 2013;91:869-881.

Almeida LP. Germinação, crescimento inicial e anatomia foliar de plantas jovens de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. sob diferentes níveis de radiação [dissertação]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2001. 96 p.

Almeida ILS. Avaliação da capacidade de adsorção da torta de *Moringa oleifera* para BTEX em amostras aquosas [dissertação]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2010. 88 p.

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*. 1998;92:1-20.

Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJA. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*:

alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Revista Brasileira de Botânica*. 2001 Dez;24(4):567-576.

Alves ES, Moura BB, Domingos M. Structural Analysis of *Tillandsia usneoides* L. Exposed to Air Pollutants in São Paulo City–Brazil. *Qualitative Water Air Soil Pollut*. 2008;189:61-68.

Alves ES, Tresmondi F, Longui EL. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 2008;22(1):241-248.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 1994;90(17):7915-7922.

Anderson TA, Walton BT. Fate of <sup>14</sup>C trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environ. Toxicol Chem*. 1995;14(12):2041-2047.

Andrade JCM, Tavares SRL, Mahler CF. Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. São Paulo: Oficina de Textos; 2007. p. 176.

Angelocci LR. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico. Edição do autor. Piracicaba; 2002. 272 p.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004;55:373-399.

Araújo ALL. Complexidade da acumulação de elementos químicos por árvores nativas da Mata Atlântica [dissertação]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2009, 113 p.

Araújo ASA, Luiz Guilherme RG, Lopes G, Campos ML. Fitorremediação de solos contaminados com arsênio (As) utilizando braquiária. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011 Jan/Fev;35(1):84-91.

Armitage AM. Ornamental bedding plants. Wallingford: CAB International; 1994. 175 p.

Atkinson TJ. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2009 Jan;212(1):1-10.

Balaganskaya ED, Kudrjajtseva OV. Change of the morphological structure of leaves of *Vaccinium vitisidaea* caused by heavy metal pollution. *Chemosphere*. 1998;36:721-726.

Baruch Z, Pattison RR, Goldstein G. Responses to light and water availability of four invasive Melastomataceae in the Hawaiian Islands. *International Journal of plant science*. 2000;161(1):107-118.

Benndorf D, Loffhagen N, Babel W. Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress. *FEMS Microbiol Letters*. 2001 Jun;200(2)247-252.

Berti WR, Cunningham SD. Phytostabilization of metals. In: Raskin I, Ensley BD, editors. *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. p. 71-88.

Blaylock MJ, Huang JW. Phytoextraction of metals. In: Raskin I, Ensley BD, editors. *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. p. 53-70.

Boddey RM, Macedo R, Tarre RM, Ferreira E, Oliveira OC, Rezende CP, Cantarutti RB, Pereira JM, Alves BJR, Urquiaga S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2004;103:389-403.

Borelli FP, Castro CEF, Matthes AF, Tombolato AFC, Nagai V. Propagação de Pteridófitas *in vitro* e *in vivo* através de esporos. *Bragantia*. 1990;49(2):205-219.

Bose S, Bhattacharyya AK. Heavy metal accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. *Chemosphere*. 2008;70:1264-1272.

Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*. 2000;5:241-246.

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissen W, Jones RL, editors. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. New York: American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 1158-1203.

Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inzé D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 2001;161:405-414.

Brito CJFA, Rodella RA. Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae). *Revista Brasil. Bot.* 2002;25:221-228.

Brooks RR. Phytoremediation by volatilisation. In: Brooks RR, editors. *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*. New York: CAB International; 1998. p. 380.

Burken JG, Schnoor JL. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J Environ Engin.* 1996;122:958-963.

Campos V. Fitorremediar é preciso. *Multimedios Ambiente Ecológico* (Edição 87), 2003. [citado em 2013 Junho 25]. Disponível em: [http://www.ambiente-ecologico.com/ediciones/2003/087\\_02.2003/087\\_Investigacion\\_ValquiriaCampos\\_Por.php3](http://www.ambiente-ecologico.com/ediciones/2003/087_02.2003/087_Investigacion_ValquiriaCampos_Por.php3).

Campos V, Pires MAF. Phytoremoval of arsenic from soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2004;35(15-16):2137-2146.

Campos V. Influence of redox environments of the solubility of arsenic in soils. *Communications in Soil Science and plant analysis*. 2009;40(9):1590-1603.

Campos V, Souto LS, Medeiros TAM, Toledo SP, Sayeg IJ, Ramos RL, Shinzato MC. Assessment of the Removal Capacity, Tolerance, and Anatomical Adaptation of Different Plant Species to Benzene Contamination. *Water Air Soil Pollut*. 2014;225:2033.

Carmo ML, Procopio SO, Pires FR, Cargnelutti Filho, Barroso ALL, Silva GP, Carmo EL, Braz GBP, Silva WFP, Braz AJBP, Pacheco LP. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com Picloram. *Planta Daninha*. 2008;26(2):301-313.

Carpanezzi OTB. Espécies vegetais exóticas no Parque Estadual de Vila Velha: subsídios para controle e erradicação [monografia]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2007. 56 p.

Cavalcanti GS. Aplicação de biossensor bioluminescente na detecção do HAP naftaleno em solo contaminado com óleo cru [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010, 124 p.

Chaves ALF, Silva EAM, Azevedo AA, Cano MAO, Matsuoka K. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (Colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (Capim-Rhodes) – Poaceae. *Acta Botanica Brasilica*. 2002;16(4):395-406.

Concenço G, Ferreira EA, Ferreira FA, Santos JB. Plasmodesmos: transporte simplástico de herbicidas na planta. *Planta Daninha*. 2007;25(2):423-432.

Cornejo JJ, Muñoz FG, Ma CY, Stewart AJ. Studies on the decontamination of air by plants. *Ecotoxicology*. 1999 Aug;8(4):311-320.

Costa GF, Marengo RA. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). *Acta Amazonica*. 2007 Jun;37(2):229-234.

Courseuil HX, Martins MDM. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*. 1997;2:54.

Courseuil HX, Hunt CS, Santos RCF, Alvarez, PJJ. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Research*. 1998;32:2065-2072.

Courseuil HX, Fernandes M. Co-solvency effect in aquifers contaminated with ethanol-amended gasoline. In: Alleman BC, Leeson A. *Natural Attenuation of Chlorinated Solvents, Petroleum Hydrocarbons, and Other Organic Compounds*. Columbus (Ohio): Battelle Press; 1999. p. 135-140.

Crowley DE, Alvey S, Gilbert ES. Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR. (eds.) *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. Washington: ACS Symposium Series; 1997. p. 20-36.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab AP. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv Agron*. 1996;56:55-114.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab P, Hsu FC. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 1996;56:55.

Cunningham SD, Ow DW. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*. 1996;110(3):715-719.

Dhote S, Dixit S. Water quality improvement through macrophytes – a review. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009;152:149-153.

Dias APS, Rinaldi MCS, Moraes RM. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium*

*guajava* 'Paluma' mantidas em ambiente contaminado por ozônio. *Hoehnea*. 2007;34(2):231-238.

Domínguez MT, Madrid F, Marañón T, Murillo JM. Cadmium availability in soil and retention in oak roots: potential for phytostabilization. *Chemosphere*. 2009;76:480-486.

Dushenkov S, Kapulnik Y. Phytofiltration of metals. In: Raskin I, Ensley BD, editors. *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. p. 89-106.

Eleftheriou EP. A comparative study of the leaf anatomy of olive trees growing in the city and the country. *Environmental and Experimental Botany*. 1987;27:105-117.

EPA - Environmental Protection Agency. (1998). "Carcinogenic Effects of Benzene. [citado em 2013 Jun 10]. Disponível em: <http://www.epa.gov/ncea/pdfs/benzenef.pdf>.

Esau K. *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 293 p.

Esau K. *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 293 p.

Evans LS, Adamski JH, Renfro JR. Relationships between cellular injury, visible injury of leaves, and ozone exposure levels for several dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. *Environmental and Experimental Botany*. 1996;36:229-237.

Fahn A. *Plant anatomy*. Oxford: Pergamon Press; 1982. p. 544.

Fahn A, Cutler D. *Xerophytes*. Berlin: Gebrüder Borntraeger; 1992. 176 p.

Faoro F, Sant S, Iriti M, Maffi D, Appiano A. Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. In:

Muzzarelli RAA, editor. Chitin Enzymology. Atec: Grottamare; 2001. p. 57-62.

Farr AM, Houghtalen RJ, Mcwhorter. Volume estimation of light nonaqueous phase liquids in porous media. *Ground Water*. 1990;28(1):48-56.

Favas PJC, Pratas J, Prasad MNV. Accumulation of arsenic by aquatic plants in largescale field conditions: Opportunities for phytoremediation and bioindication. *Science of the Total Environment*. 2012;433:390-397.

Favas PJC, Pratas, João P, Varun M, D'Souza R, Paul MS. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. In: *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, Maria C. Hernandez Soriano, editors. InTech; 2014. p. 485-517.

Fernandes MF, Alcântara GZ. Biorremediação de Solos – Estado da Arte [citado em 2009 Nov 23]. Disponível em: <http://www.ufsc.br/ccb/PDF/c2.PDF>.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997;43:61-68.

Ferreira CAG, Davide AC, Carvalho LR. Relações hídricas em mudas de *Eucalyptus citriodora* Hook., em tubetes, aclimatadas por tratamentos hídricos. *Cerne*. 1999;5(2): 95-104.

Fitz WJ, Wenzel WW. Arsenic transformations in soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*. 2002;99:259-278.

Fornasiero RB. Phytotoxic effects of fluorides. *Plant Science*. 2001;161:979-985.



Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidante signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*. 2005 Jun;17(17):1866-1875.

Freire SR, Pelegrini R, Kubota LT, Durán N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*. 2000;23:504.

Frers C. El uso de plantas acuáticas en el tratamiento de aguas residuales. Carmen de Areco, Argentina: El Planeta Azul; 2009.

Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Breusegem FV. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2006;141;436-445.

Glass DJ. Economic potential of phytoremediation. In: Raskin I, Ensley BD, editors. *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000. p. 15-31.

Godoi AFL, Godoi RHM; Azevedo R; Maranhão LT. Poluição e a densidade de vegetação: BTEX em algumas áreas públicas de Curitiba - PR, Brasil. *Química Nova*. 2010;33(4)827-833.

Gonçalves JFC, Melo EGF, Ferreira MJ, Silva CEM, Gomes IB. Crescimento, partição de biomassa e fotossíntese em plantas jovens de *Genipa spruceana* submetidas ao alagamento. *Cerne*. 2013 Abr/Jun;19(2):193-200.

Grangeiro MS. Bioprospeção de ação antioxidante de flavonóides em culturas de células gliais tratadas com catecol [dissertação]. Ferreira de Santana (BA): Universidade Estadual de Feira de Santana; 2009, 65 p.

Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 2005 Feb;32(6):481-494.

Griffiths WT. Characterization of the terminal stages of chlorophyll (Ide) synthesis in etioplast membrane preparations. *Biochemical Journal*. 1975;152(3):623-655.

Hernández-Allica J, Becerril JM, Garbisu C. Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environmental Pollution*. 2008;152:32-40.

Hernández-Valencia I, Mager D. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*. 2003 Set;15:149-155.

Hiatt MH. Bioconcentration factors for volatile organic compounds in vegetation. *Analytical Chemistry*. 1998;70:851-856.

Hickey M, King C. *The Cambridge illustrated glossary of botanical terms*. Cambridge: University Press, 2000. 208 p.

Holmgren GGS. A rapid citrate-dithionite extractable iron procedure. *Soil Science Society of America*. 1967;31:210-211.

IARC: International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity evaluation of BTEX, 2006. [citado em 2008 Março 14]. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>.

Inman-Bamber NG, Smith DM. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research*. 2005;92:185-202.

Iriti M, Rabotti G, Ascensão A, Faoro F. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2003;51:4308-4314.

Iriti M, Faoro F. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollution*. 2009;187:285-301.

Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*. 2004;218:721-728.

Janssens SB, Knox EB, Huysmans S, Smets EF, Merckx VSFT. Rapid radiation of *Impatiens* (Balsaminaceae) during Pliocene and Pleistocene: Result of a global climate change. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009;52:806-824.

Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill; 1940. p. 523.

Justo CF, Soares AM, Gavilanes ML, Castro EM. Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopia brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 2005;19(1):111-123.

Kabata-Pendias A, Pendias H. *Trace Elements in Soils and Plants*. United States: Library of Congress Card; 1986. p. 315.

Kaipper AIB. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel [tese]*. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2003. 179 p.

Kämpf N, Schwertmann U. Avaliação da estimativa de substituição de Fe por Al em hematitas de solos. *R Bras Ci Solo*. 1998;22:209-213.

Karban RE, Baldwin IT. *Induced responses to herbivory*. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 330 p.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental Chemistry Letters*. 2009;7:1-19.

Kouwenberg LLR, Kürschner WM, Visscher H. Changes in stomatal frequency and size during elongation of *Tsuga heterophylla* Needles. *Annals of Botany*. 2004;94:561-569.

Kozlowski TT, Kramer PJ, Pallardy, SG. *The physiological ecology of woody plants*. San Diego: Academic Press; 1991. p. 678.

Kozlowski TT, Pallardy SG. *Physiology of woody plants*. San Diego: Academic Press, 1997. 411 p.

Lai HY. Effects of leaf area and transpiration rate on accumulation and compartmentalization of cadmium in *Impatiens walleriana*. *Water, Air & Soil Pollution*. 2015;226(1):2246.

Larcher W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA; 2000. p. 530.

Lee N, Wetzstein HY, Sommer HE. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1988;113:167-171.

Lenhard RJ, Parker JC. Estimation of free product hydrocarbon volume from fluid level in monitoring wells. *Ground Water*. 1990;28:57-67.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 1994;79:583-593.

Lin CC, Lai HY, Chen ZS. Bioavailability assessment and accumulation by five garden flower species grown in artificially cadmium-contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*. 2010 Jul;12(5):454-467.

Lindorf H. Wood and leaf anatomy in *Sessea corymbiflora* from an ecological perspective. *IAWA Journal*. 1997;18(2):157-168.

Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*. 2001;409:579.

Machado EC, Lagôa AMMA. Trocas gasosas e conduância estomática em três espécies de gramíneas. *Bragantia*. 1994;53(2):141-149.

Machado RS. Respostas fisiológicas de genótipos de cana-de-açúcar ao déficit hídrico imposto na fase inicial de desenvolvimento [dissertação]. Campinas (SP): Instituto Agrônomo de Campinas; 2009. 64 p.

Maciel LA. Controle mecânico da herbácea exótica invasora lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium* Koenig) no Parque Estadual Turístico do

Alto Ribeira – PETAR, SP [dissertação]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo; 2011. 99 p.

Maranho LT, Galvão F, Preussler KH, Muñiz GIB, Kuniyoshi YS. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* klotzch ex Endl., Podocarpaceae. *Acta Botanica Brasilica*. 2006;20(3):615-624.

Marinelli F, Dunford DS. LNAPL thickness in monitoring well considering hysteresis and entrapment. *Groundwater*. 1996;34(3):405-414.

Matyssek R, Günthardt-Georg MS, Landolt W, Keller T. Whole-plant growth and leaf formation in ozonated hybrid poplar (*Populus x euramericana*). *Environmental Pollution*. 1993;81:207-212.

Mcgrath SP. Phytoextraction for soil remediation. In: Brooks RR, editor. *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*. New York: CAB International; 1998. p. 261-287.

McGrath SP, Zhao FJ. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003;14:277-282.

Meirelles PRL, Mochiutti S. Formação de pastagens com capim marandú (*Brachiaria brizantha* cv Marandú) nos cerrados do Amapá. Macapá: Embrapa Amapá; 1999. 3 p.

Menezes JPC. Influência do uso e ocupação da terra na qualidade da água subterrânea e sua adequação para consumo humano e uso na agricultura [dissertação]. Alegre (ES): Universidade Federal do Espírito Santo; 2012, 81 p.

Mercer JW, Cohen RM. A review of immiscible fluids in the subsurface: Properties, models, characterization and remediation. *Journal of Contaminant Hydrology*. 1990;6:107-163.

Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2005;165:195-2009.

Miller GW.. The effect of fluoride on higher plants: with especial emphasis on early physiological and biochemical disorders. *Fluoride*. 1993;26:3-22.

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 2002 Set;7(9):405-410.

Mohammed N, Allayla RI. Modeling transport and biodegradation of BTX compounds in saturated sandy soil. *Journal of Hazardous Materials*. 1997;54:155.

Moreno FN, Courseuil HX. Fitorremediação de aquíferos contaminados por benzeno e etanol. *Wat Res*. 2001;35(12):3013-3017.

Moreno FN. Avaliação experimental do potencial do chorão (*Salix babylonica* Linnaeus) na fitorremediação de aquíferos contaminados por nitratos, etanol e benzeno [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 1998, 81 p.

Murphy MRC, Jordan GJ, Brodribb TJ. Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. *Plant, Cell & Environment*. 2012 Aug;35(8):1407-1418.

Nakhla, G. Biokinetic Modeling of in Situ Bioremediation of BTX Compounds – Impact of Process variable and Scaleup Implications. *Water Research*. 2003;37:1296 – 1307.

Nascimento CWA, Xing B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*. 2006;63(3):299-311.

Neto ADA, Prisco JT, Filho JE, Medeiros JVR, Filho EG. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology*. 2005;162:1114-1122.

Newman L, Doty SL, Gery KL, Heilman PE, Muiznieks I, Shang T, Sarah TQ, Siemieniec T, Strand SE, Wang X, Wilson AM, Gordon MP. Phytoremediation of organic contaminants: a review of phytoremediation research at the University of Washington. *J Soil Contamin.* 1988;7:531-542.

Nguyen TH, Sakakibara M, Sano S, Mai TN. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead-zinc mine area, Northern Vietnam. *Journal of Hazardous Materials*, 2011 Feb;186(2-3):1384-1391.

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH Carcinogen List, 2006. [citado em 2013 Abril 05]. Disponível em: <http://0-www.cdc.gov.mil1.sjlibrary.org/niosh/homepage.html>.

Nyer EK, Gattliff EG. Phytoremediation. *GWMMR*, winter; 1996, p. 58-62.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma*. 1964;59(2):368-373.

Oliveira LM. Potencial de samambaias para fitorremediação de arsênio [tese]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2012. 104 p.

Oliveira RSJ, Bacarin MA. Absorção e translocação de herbicidas. In: Oliveira RSJ, Constantin J. *Plantas daninhas e seu manejo*. 1 ed. Guaíba (RS): Livraria e Editora Agropecuária; 2001. p. 261-290.

Pääkköen E, Holopainen T, Kärenlampi L. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth.) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution*. 1997;96:117-127.

Pant P, Allen M, Tansel B. Mercury uptake and translocation in *Impatiens walleriana* plants grown in the contaminated soil from Oak Ridge. *International Journal of Phytoremediation*. 2011 Feb;13(2):168-176.

Parcher MA, Jonhoson JA, Parker JC. Effects of soil type on separate phase hydrocarbon recovery under fluctuating water conditions. In: Proceedings of the 1995 Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Remediation Conference. Houston (Texas): Ground Water; 1995. p. 439-451.

Parsons JJ. Spread of African Pasture Grasses to the American Tropics. *Journal of Range Management*. 1972 Jan;25(1):12-17.

Passioura JB. Water in the soil-plant-atmosphere continuum. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, editors. *Physiological plant ecology II: Water relations and carbon assimilation*. Berlin: Springer-Verlag; 1982. p. 5-33.

Pastore M, Rodrigues RS, Simão-Bianchini, Filgueiras TS. Plantas exóticas invasoras na Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André – SP: guia de campo. São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 46 p. [citado em 2013 Março 10]. Disponível em: [www.ibot.sp.gov.br/publicacoes/virtuais/guia%20de%20campo.pdf](http://www.ibot.sp.gov.br/publicacoes/virtuais/guia%20de%20campo.pdf).

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. Comparison of Mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plants systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 2004 Fev;52(1)199-223.

Pedron F, Petruzzelli G, Barbaferi M, Tassi E. Strategies to use phytoextraction in very acidic soil contaminated by heavy metals. *Chemosphere*. 2009;75:808-814.

Pedrozo MFM, Barbosa EM, Courseuil, HX, Schneider MR, Linhares MM. Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. *Cadernos de Referência Ambiental*. 2002;2:1-229.

Pedroso ANV. Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* “Bel-W3” (Solanaceae) [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente; 2009, 88 p.



Peralta-Zamora P, Leal ES, Tiburtius ERL. Contamination of water by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. *Quim Nova*. 2004;27(3):441-446.

Pergo EM, Ishii-Iwamoto EL. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*. 2011 Mai;37(5):500-13.

Peternelli M. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiarião [*Brachiaria brizantha* (hochst ex a. rich.) stapf cv. Marandu] sob intensidades de pastejo [dissertação]. Pirassununga (SP): Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo; 2003. 79 p.

Pezeshki SR, Hester W, Lin Q, Nyman JA. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf cost marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution*. 2000;108:129-139.

Pierzynski G, Kulakow P, Erickson L, Jackson L. Plant system technologies for environmental management of metals in soils: Educational materials. *Journal of Natural Resources and Life Science Education*. 2002;31:31-37.

Pilon-Smits E, Pilon M. Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup. *Trends in Plant Science*. 2000;5(6):235-236.

Pilon-Smits EAH, Leduc DL. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20:207-212.

Pita-Barbosa A, Sant'Anna-Santos BF, Silva KLF, Azevedo AA, Rocha DI. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta bot bras*. 2009;23(4):1027-1033.

Poschenrieder CH, Barceló J. Estrés por metales pesados. In: Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A. (eds.) *La ecofisiología vegetal: Una ciencia de síntesis*. Madrid: Thomson; 2004. p. 413-442.

Prado J. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Pteridaceae-Adiantoidae e Taenitidoideae. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo. 1997;16:115-118.

Prado, J, Windisch, PG. The genus *Pteris* L. (Pteridaceae) in Brazil. Bol Inst Bot. 2000;13:103-199.

Prasad MNV. Phytoremediation of metals and radionuclides in the environment: the case for natural hyperaccumulators, metal transporters, soil-amending chelators and transgenic plants. In: Prasad MNV, editor. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems, 2<sup>th</sup> Edition. Berlin: Springer; 2004. p. 345-391.

Pratas J, Favas PJC, Paulo C, Rodrigues N, Prasad MNV. Uranium accumulation by aquatic plants from uranium-contaminated water in Central Portugal. International Journal of Phytoremediation. 2012;14:221-234.

Quitério GCM. Estudo das alterações espectrais de três espécies vegetais como indicadores de vazamentos precoces em dutos de transporte de hidrocarbonetos [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2010, 127 p.

Radic S, Babic M, Dragan S, Roje V, Pevalek-Kozlina B. Ecotoxicological effects of aluminum and zinco n growth and antioxidants in *Lemna minor* L. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010 Mar;73(3):336-342.

Rai D, Sass BM, Moore DA. Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. Inorg Chem. 1987;26(3):345-349.

Rai D, Zachara JM, Eary LE, Ainsworth CC, Amonette JE, Cowan CE, Szelmezcza RW, Resch CT, Schmidt RL, Girvin DC, Smith SC. Chromium reactions in Geological Materials. Palo Alto (CA): Electric Power Research Institute; 1988. 287 p.

Ramos DMR, Oliveira JLB. Produção de maria-sem-vergonha por estacas para cultivo hidropônico. In: Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão, 3, Florianópolis, 2003.

Ratnam S, Culligang J, Germaine JT. Geotechnical centrifuge modeling of LNAPL entrapment in sands samples under hydraulic flushing. *Geotechnical News*. 1996;1(3):22-26.

Rebouças AC, Braga B, Tundisi JG. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo: Escrituras; 2006. p. 720.

Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*. 2003;28:123-130.

Ribeiro AC. Potencial da *Acacia holocericca* e *Mimosa caesalpinifolia* em fitorremediador solo tropical contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009. 200 p.

Ribeiro SP, Corrêa TL, Sousa HC. Microscopic variability in mechanical defence and herbivory response in microphyllous leaves of tropical herb species from Serra do Cipó, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. 2010;33(2):237-246.

Rôças G, Barros CF, Scarano FR. Leaf anatomy of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. *Trees*. 1997;11:469-473.

Rossatto DR, Kolb RM. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. *Acta Botanica Brasílica*. 2010;24(3):605-612.

Ruiz ON, Daniell H. Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20:213-219.

Rylott EL, Bruce NC. Plants disarm soil: engineering plants for the phytoremediation of explosives. *Trends in Biotechnology*. 2008;27(2):73-81.

Saifullah, Meers E, Qadir M, Caritat P, Tack FMG, Laing GD, Zia MH. EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere*. 2009;74(10):1279-1291.

Sakakibara M, Ohmori Y, Ha NTH, Sano S, Sera K. Phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *Clean: Soil, Air, Water*. 2011;39:735-741.

Sant'Anna-Santos BF, Duque-Brasil R, Azevedo AA, Silveira AS, Araújo JM, Aguiar R. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). *Revista Árvore, Viçosa-MG*. 2007;31(4):761-771.

Santos JB, Procópio SO, Silva AA, Pires FR, Ribeiro Júnior JI, Santos EA, Ferreira LR. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. *Planta Daninha*, 2004;22(2):323-330.

Santos APM. Biomonitoramento vegetal da qualidade do ar em Ribeirão Preto – SP [tese]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2012, 162 p.

Sass BM, Rai D. Solubility of Amorphous Chromium (III) – Iron (III) Hydroxide Solid Solutions. *Inorg Chem*. 1987;26(14):2228-2232.  
Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. 1993 Jan;101(1):7-12.

Schenato F, Schröder NT, Martins FB. Assessment of contaminated soils by heavy metals in municipal solid waste landfills in southern Brazil. *WSEAS Transactions on Environment and Development*, 2008;4(9):745-755.

Schnoor JL, Licht LA, Mccutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology*. 1995;29:318-323.

Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen, RIL. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*. 2001;3:81-91.

Scramin S, Skorupa LA, Melo IS. Utilização de plantas na remediação de solos contaminados por herbicidas – levantamento da flora existente em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. In: Melo IS, Silva CMMS, Scramin S, Spessoto A. *Biodegradação*, Jaguariúna (SP): EMBRAPA Meio Ambiente; 2001. p. 369-371.

Seefeldt SS, Jensen JE, Fuerst P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*. 1995;9(2):218-225.

Shabani N, Sayadi MH. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *Environmentalist*. 2012;32:91-98.

Sharma KG. (1989). Cuticular and morphological dynamics in *Salix nigra* L. and *Quercus alba* L. in relation to air pollution. In: Bucher JB, Bucher-Wallin I (Eds.). *Air pollution and Forest Decline*. Birmensdorf: Proceedings of the 14th International meeting for specialists in air pollution effects on forest ecosystems, IUFRO. 527–529 p.

Shin H, Kwon O. The simultaneous analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, o,m,p-xylenes and total petroleum hydrocarbons in soil by GC-FID after ultra-Sonication. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2000;21(11):1101-1105.

Silva AA, Silva JF. Fitorremediação de áreas contaminadas com herbicidas. In: Silva AA, Silva JF, editores. *Tópicos de manejo integrado de plantas daninhas*. Viçosa,. 367 p. p. 210-239. 2007.

Silva FLN, Júnior JRS, Neto JMM, Silva RLGNP. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Química Nova*. 2009;32(1):56-60.

Singh BR, Steinnes E. Soil and water contamination by heavy metals. In: Lal R, Stewart BA, editors. Soil Processes and Water Quality. Boca Raton (USA): Lewis Publishers; 1994. p. 233-271.

Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. Plant Science. 2006;170:274-282.

Soares MAS, Machado OLT. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica. 2007;1:9-19.

Sousa RP. Estudo dos fluxos de óleo diesel e água em solos não saturados: desenvolvimento experimental e modelagem matemática [tese]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2012, 283.

Sriprapat W, Thiravetyan P. Phytoremediation of BTEX from indoor air by *Zamioculcas zamiifolia*. Water Air Soil Pollution. 2013;224:1482.

Srivastava M, Ma L, Singh N, Singh S. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. Journal of Experimental Botany. 2005 Mai;56(415):1335-1342.

Stewart R, Grossaman E, McGuire J. Environmental Science in the 21st Century: Groundwater Remediation. Texas: Texas AM University, Department of Geosciences; [atualizado em 2008 Dez 23; citado em 2014 Jul 07]. Disponível em: <http://oceanworld.tamu.edu/resources/environment-book/groundwaterremediation.html>.

Strauss-Debenedetti S, Berlyn GP. Leaf anatomical responses to light in five tropical Moraceae of different successional status. American Journal of Botany. 1994;81(12):1582-1591.

Sun YB, Zhou QX, Wang L, Liu W. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. Journal of Hazardous Materials. 2009;161:808-814.

Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*. 2002;18(5):647-658.

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. 719 p.

Testiati E, Parinet J, Massiani C, Laffont-Schwob I, Rabier J, Pfeifer HR, Lenoble V, Masotti V, Prudent P. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. *Journal of Hazardous Materials*. 2013 Mar;248-249:131-141.

Tiburtius ERL, Peralta-Zamora P. Degradação de btxs via processos oxidativos avançados. *Química Nova*. 2005;28(1):61-64.

Torrecilha JK, Mariano GP, Silva PSC. Study of the “*Impatiens walleriana*” for phytoremediation of chromium, thorium, uranium and zinc soil contamination. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2013, Recife. p. 24-29.

Treesubsuntorn C, Thiravetyan P. Removal of benzene from indoor air by *Dracaena sanderiana*: effect of wax and stomata. *Atmospheric Environment*. 2012;57:317-321.

Tresmondi F. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de *Psidium guajava* ‘Paluma’ expostas em ambiente com ozônio [dissertação]. São Paulo (SP): Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente; 2010, 90 p.

Tu C, Ma LQ. Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Plant and Soil*. 2003;249:373-382.

Turner IM. Sclerophylly: primarily protective? *Functional Ecology*. 1994;8:669-675.

Ugrekheldze D, Korte F, Kvesitadz G. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1997;37:24-29.

Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil*. 2013;362:319-334.

Venkatraman SN, Boland TM, Bossert ID, Kasson DS. *Journal of Soil Contamination*. 1998;7:143.

Vimieiro GV, Silva FVB. Fitorremediação para tratamentos de áreas contaminadas. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 24. 2007, Belo Horizonte, MG. Anais...Belo Horizonte: Associação Brasileira de Engenharia e Sanitária e Ambiental, 2007.

Wang J, Zhao FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann A, McGrath SP. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *pteris vittata*. uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*. 2002 Nov;130(3):1552-1561.

Wang W, Xiao Y, Chen L, Lin P. Leaf anatomical responses to periodical waterlogging in simulated semidiurnal tides in mangrove *Bruguiera gymnorhiza* seedlings. *Aquatic Botany*. 2007;86:223-228.

Wang SL, Liao WB, Yu FQ, Liao B, Shu WS. Hyperaccumulation of lead, zinc, and cadmium in plants growing on a lead/zinc outcrop in Yunnan Province, China. *Environmental Geology*. 2009 Aug;58(3):471-476.

Watts RJ, Haller DR, Jones AP, Teel AL. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. *Journal of Hazardous Materials*. 2000;76:73-89

Wei JL, Lai HY, Chen ZS. Chelator effects on bioconcentration and translocation of cadmium by hyperaccumulators, *Tagetes patula* and *Impatiens walleriana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;84:173-178.



Weiss P, Offenthaler I, Ohlinger R, Wimmer J. Higher plants as accumulative bioindicators In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG. *Bioindicators & Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. Oxford: Elsevier; 2003. p. 465-500.

Woodward FI. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from pre-industrial levels. *Nature*. 1987;327:617-618.

Xie QE, Yan XL, Liao XY, Li X. The arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(22):8488-8495.

Xu JG, Jonhson RL. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil contaminated, remediated an uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant Soil*. 1995;173:3-5.

Yang YY, Jung JY, Song WY, Suh HS, Lee Youngsook. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity lead and characterization of the mechanism tolerance. *Plant Physiology*. 2000 Nov;124(3):1019-1026.

Yuan YM, Song Y, Ge XJ. *Impatiens qingchengshanica* (Balsaminaceae), a unique new species from China and its phylogenetic position. *Botanical Studies*. 2011;52:225-230.

Zhang W, Cai Y, Downum K R, Ma LQ. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environmental Pollution*. 2004;131: 337-345.

Zhao X, et al. Potencial of four forage grasses in remediation od Cd and Zn contaminated soils. *Bioresource Technology*. 2010 Mar;101(6):2063-2066.

Zhao FJ, Lombi E, McGrath SP. Assessing the potential for zinc and cádmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*. 2003;249(1):37-43.

Zhuang P, Yang QW, Wang HB, Shu WS. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2007;184:235-242.