Alterações histoquímicas e micromorfológicas em folhas de plantas expostas ao benzeno

Histochemical and micromorphological changes in leaves of plants exposed to benzene

Ms. Thales Augusto de Miranda Medeiros[1]
Profa. Dra. Valquíria de Campos[2]
Profa. Dra. Letícia Silva Souto[1]

[1] Universidade Federal de São Carlos, tammedeiros@ufscar.br
[2] Universidade Estadual Paulista

Submetido em 09/03/2015
Revisado em 01/04/2015
Aprovado em 15/04/2015

Resumo: O meio mais afetado pela contaminação antrópica é o solo. A evaporação de derivados de petróleo é um importante processo de impacto negativo sobre o ambiente. O objetivo foi avaliar as respostas indicadoras de distúrbios de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf, *Impatiens walleriana* Hook. f. e *Pteris vittata* L. quando expostas ao benzeno. Para avaliar os distúrbios foram efetuados ensaios de injeção direta e nebulização de benzeno sobre as espécies. *Brachiaria brizantha* e *P. vittata* apresentaram intenso acúmulo do peróxido de hidrogênio e morte celular nas folhas, já *I. walleriana* foi a espécie que comportou-se de maneira oposta, possivelmente, por apresentar um eficiente sistema antioxidante. As três espécies apresentaram efeitos fitotóxicos, como alteração na densidade estomática e no tamanho dos estômatos. As características micromorfológicas interferem na sensibilidade e resistência do vegetal, sendo que *I. walleriana* mostrou-se sensível a nebulização de benzeno e *B. brizantha* e *P. vittata* foram mais resistentes, pois evitaram a absorção do benzeno na atmosfera.
Palavras-chave: Análise foliar. *Impatiens walleriana*. *Brachiaria brizantha*. *Pteris vittata*.

Resumen/abstract: The environment most directly affected by human contamination is the soil. Evaporation of oil derived is also an important negative impact on the environment. The aim was to evaluate the indicator responses disorders of *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf, *Impatiens walleriana* Hook. F. and *Pteris vittata* L. when exposed to benzene. To assess to disorders were made direct injection testes and benzene mist on the species. *Brachiaria brizantha* and *P. vittata* showed intense accumulation of hydrogen peroxide and cell death in the leaves, as *I. walleriana* was the species that behaved in the opposite way, possibly by having an efficient antioxidant system. The three species showed phytotoxic effects, such as changes in stomatal density and stomatal size. The micromorphological characteristics influence the sensitivity and plant resistance, and I. walleriana was sensitive to benzene misting and *B. brizantha* and *P. vittata* were more resistant because it avoided the benzene absorption in the atmosphere.
Key-words: Leaf analysis. *Impatiens walleriana*. *Brachiaria brizantha*. *Pteris vittata*.

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 adição de 20 a 25% de etanol na gasolina (Courseuil et al., 1998), que por ser um composto oxigenado, totalmente solúvel em água e também em fase líquida não aquosa, ou seja, solúvel também em substância lipofílica, influencia na magnitude e extensão da solubilidade de hidrocarbonetos tóxicos (cosolvência) em uma contaminação de petróleo (Kaipper, 2003). Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam elevada mobilidade em sistemas solo-água representada pelo menor coeficiente de partição entre octanol-água (K_{ow}), que implica em lenta absorção no solo, e consequentemente, um transporte preferencial via água (Courseuil et al., 1998). As perdas de combustíveis e derivados de petróleo por evaporação também trazem grande preocupação e representam não só prejuízo econômico, mas impacto negativo sobre o ambiente. Dentre os compostos presentes no BTEX, o benzeno é reconhecidamente o mais tóxico e, por isso, pode ser apontado como o agente mais preocupante no tocante à saúde pública (Niosh, 2006). 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 (Burken & Schnoor, 1996; Moreno & Courseuil, 2001; Campos & Pires, 2004).

Assim o objetivo desse trabalho foi analisar as respostas indicadoras de distúrbios, de processos adaptativos ou de mortalidade de *Impatiens walleriana* Hook. f., *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf e *Pteris vittata* L., espécies que já apresentaram indícios de potencial fitorremediador. Campos et al. (2014) verificaram que *Impatiens walleriana* e *Brachiaria brizantha* absorvem e translocam grande quantidade de benzeno para parte aérea da planta, e que *Pteris vittata* restringe a absorção de benzeno e o acumula, principalmente, nas raízes.

Material e Métodos

As espécies vegetais usadas pertencem a grupos taxonômicos distintos, *Pteris vittata* (samambaia), *Brachiaria brizantha* (Monocotiledônea) e *Impatiens walleriana* (Eudicotiledônea). As plantas foram obtidas através de germinação *in vivo* e *in vitro* (*P.* vittata), semeadura (*B. brizantha*) e propagação vegetativa (*I. walleriana*). Após seu estabelecimento foram transplantadas para vasos de plásticos ou de cimento, contendo Latossolo Vermelho distrófico (LVd).

Foram realizadas duas etapas experimentais. Na primeira etapa realizaram-se ensaios de injeção direta de solução de benzeno (20 mg L^{-1}) no solo, próximo ao sistema radicular, com três indivíduos de cada espécie para cada tratamento. Para esta fase utilizou-se de delineamento experimental inteiramente casual, com três repetições com contaminação de benzeno, além de série controle. O experimento foi realizado a temperatura de 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 simulando luz do dia. Para compreender as alterações histoquímicas, nos tecidos foliares, causadas pelo benzeno, verificou-se o acúmulo de peróxido de hidrogênio e indicação e morte celular.

Na segunda etapa foram realizados ensaios de aspersão, com três indivíduos de cada espécie para cada tratamento. As plantas foram submetidas à nebulização com solução aquosa de benzeno, em concentração de 20 mg L^{-1} e de 1600 mg L^{-1}. O nevoeiro foi aplicado no interior da câmara de nebulização e teve duração de 10, 30 e 60 dias. As plantas do tratamento controle foram submetidas ao nevoeiro, utilizando-se apenas água deionizada. As alterações visíveis na superfície foliar ou a morte dos indivíduos foram registradas, diariamente, através de anotações e imagens fotográficas. Ao término da simulação foram efetuadas coletas de amostras foliares para análise micromorfológica.

As coletas das folhas foram realizadas no dia seguinte a última aspersão e injeção de benzeno no solo.

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.

Após a injeção de benzeno no solo, folhas foram coletadas para análise histoquímica para detecção da presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de morte celular. Existem evidências na literatura da participação de peróxido de hidrogênio em resposta ao estresse ambiental (Soares & Machado, 2007). Para o acúmulo de peróxido de hidrogênio foi coletada uma folha por individuo, dos três indivíduos por espécie usados para cada tratamento. De cada folha foi retirado dois fragmentos com cerca de 1 cm^2, totalizando seis fragmentos de cada espécie para cada tratamento. As amostras foram então imersas em solução de 1mg 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.

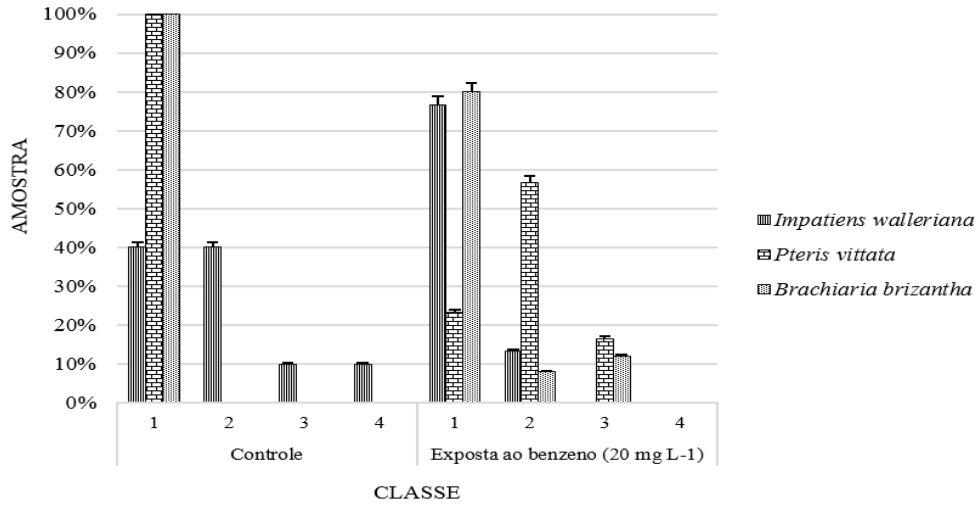
Na determinação da morte celular também foi coletada uma folha por individuo, da qual foi retirado dois fragmentos com cerca de 1 cm^2, totalizando seis fragmentos de cada espécie para cada tratamento. Os fragmentos foram fervidos por um minuto em mistura de ácido lático, fenol, glicerina e água contendo 20 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 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 sadias que se apresentaram transparentes.

As amostras em ambos os testes foram analisadas em microscópio de campo claro equipado com sistema de captura de imagens. Foi realizada uma contagem das células com reação positiva aos testes por fragmento, totalizando seis contagens por espécie e por tratamento. A área da contagem foi de aproximadamente 0,2 mm^2. O número de células que apresentaram reação positiva aos testes foram enquadrados em 4 classes: classe 1 (1-5 células), classe 2 (6-10 células), classe 3 (11-15 células) e classe 4 (16-20 células), metodologia essa proposta por Pedroso (2009).

Resultados e Discussão

A análise histoquímica permite identificar alterações que ocorrem nos tecidos das plantas antes do aparecimento de injúrias visíveis. Todas as três espécies apresentaram acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares, quando expostas ao benzeno através da contaminação no solo. Contudo, este acúmulo ocorreu em diferentes intensidades, conforme mostra a Figura 1.

Figura 01**:** 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).



As três espécies apresentaram acúmulo H_2O_2 em todas plantas do tratamento controle, sendo que todas as amostras foram enquadradas na classe 1 (1 - 5 células) para *P. vittata* e *B brizantha*. Em *I. walleriana* houve distribuição nas

quatro classes, onde 80% das amostras foram classificadas igualmente nas classes 1 e 2, e 20% das amostras foram distribuídas nas classes 3 e 4.

Em *P. vittata* exposta ao benzeno, o acúmulo foi maior, uma vez que as amostras foram enquadradas, predominantemente, na classe 2 (57%) e cerca de 17% na classe 3 (11 - 15 células), reduzindo para 23% o número de amostras na classe 1. *Brachiaria brizantha* também mostrou um acúmulo maior nas plantas expostas ao contaminante, com 80% das amostras enquadradas na classe 1 e 20% das amostras enquadradas na classe 2 (8%) e classe 3 (12%). *Impatiens walleriana* apresentou 77% das amostras na classe I e 13% na classe 2.

A presença de H_2O_2, no tratamento controle, se justifica em decorrência do metabolismo regular das plantas (Apel & Hirt, 2004). Entretanto, em condições normais a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula é baixa, mas quando a planta é submetida a um estresse ambiental há um aumento na geração de EROs, como se observa-se nesta pesquisa, onde o aumento de peróxido de hidrogênio, na contaminação com benzeno, é um indicativo de perturbação da homeostase celular (Foyer & Noctor, 2005).

Neste estudo foi verificado somente a presença de peróxido de hidrogênio e não das outras espécies reativas de oxigênio, entretanto podemos supor que o benzeno induziu a produção de radicais superóxido ($O_2^{\cdot}$), e que a enzima superóxido dismutase (SOD) converteu estes radicais em peróxido de hidrogênio. Este seria um mecanismo de defesa das plantas, pois o H_2O_2 é menos reativo que o radical superóxido e, portanto, menos danoso à planta (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^{2+} ou Cu^{+}), produzir radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) que são altamente reativos, causando a peroxidação proteica e lipídica (Pedroso, 2009).

Brachiaria brizantha, apesar de apresentar uma menor intensidade no acúmulo de peróxido de hidrogênio quando comparado com *P. vittata*, reage de maneira mais sensível a contaminação, pois apresenta sintomas visíveis e morte quando é exposta por dez dias ao benzeno (Campos et al., 2014). A grande quantidade de benzeno absorvido pela raiz e translocado para parte aérea, verificado no estudo de Campos et al. (2014), 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 às células ou mesmo poderia produzir radicais hidroxila, que são mais reativos.

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.

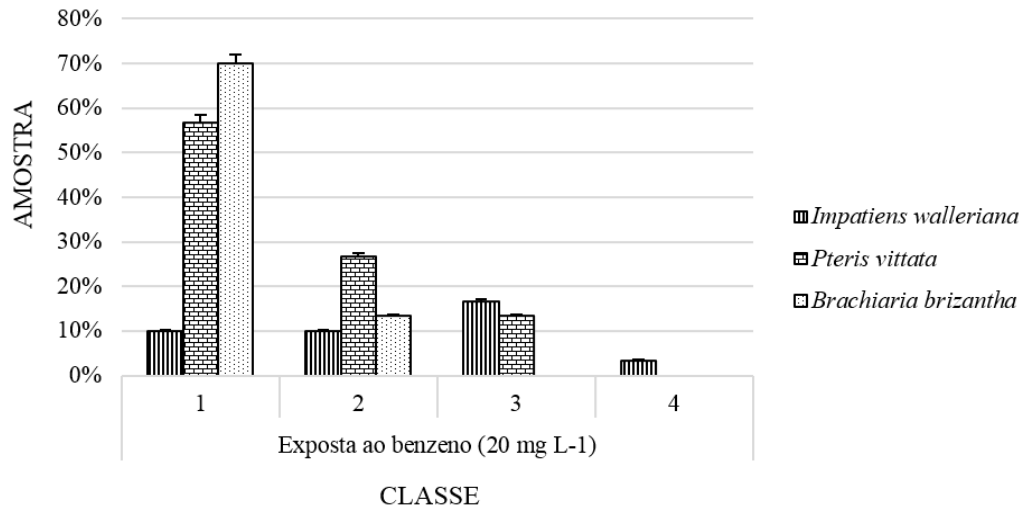
Dentre as três espécies, *I. walleriana* foi a que apresentou menor acúmulo de peróxido de hidrogênio, mesmo sendo capaz de absorver grande quantidade de benzeno e translocar para parte aérea como constatado por Campos et al. (2014).

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 vegetal, 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_2O_2 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.

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.

Em todas as espécies, a morte celular foi maior no tratamento com 20 mg L^{-1} de benzeno (Figura 2).

Figura 02: 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 reação positiva para morte celular em algumas células da epiderme, mas em menor quantidade. 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 Campos et al. (2014) de que a planta metaboliza e volatiliza o benzeno, eliminando-o através dos estômatos.

Além disto, a baixa quantidade de células mortas, mesmo acumulando grande quantidade de benzeno na parte aérea (Campos et al., 2014), indica um sinal de resistência da planta, uma vez que a espécie vegetal reduziu os efeitos danosos que os metabólitos deste poluente podem gerar e sobreviveu à exposição.

Brachiaria brizantha e *P. vittata* apresentaram maior número de células com morte celular por área analisada, sendo qu2e *P. vittata* teve morte celular mais intensa que *B. brizantha*, pois apresentou uma porcentagem maior de amostras na classe 2 e 3.

Segundo Campos et al. (2014) *P. vittata*, dentre as três espécies, é a que menos transloca 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_2O_2 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.

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 contaminação, por aspersão de benzeno na concentração mínima (20 mg L^{-1}), algumas folhas jovens e maduras de *I. walleriana* apresentaram clorose, necrose e abscisão. Observou-se que a partir do 35º dia de contaminação, algumas folhas apresentaram necroses de formas e tamanhos irregulares, mas sem queda das folhas. Assim a planta sobreviveu aos 60 dias de contaminação. Na nebulização com a concentração máxima (1600 mg L^{-1}) de benzeno, 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. No 50º dia de contaminação todas as folhas sofreram clorose e/ou necrose, seguido pela queda da folha e morte da planta.

Pteris vittata, na nebulização com concentração mínima de benzeno, não apresentou sintomas visíveis. Um fato a considerar é a condição ruderal da espécie, bastante adaptada ao meio urbano. 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 translucida destes. Na concentração máxima, algumas folhas necrosaram e folíolos apresentaram pontos de necrose.

Brachiaria brizantha, por sua vez, não apresentou queda de suas folhas e nem injúrias foliares visíveis, 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 fitotoxidade do benzeno depende de diversos fatores como a espécie estudada, o estádio 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^{-1} 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.

Segundo Sriprapat e Thiravetyan (2013) a captura do benzeno pelas plantas ocorre em maior quantidade através dos estômatos, mas existem outras vias não estomáticas, como a cutícula. Assim, a área do estômato pode influenciar fortemente as habilidades de captura dos contaminantes voláteis, mas para Cornejo et al. (1999) é necessário 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_2, temperatura e umidade relativa do ar (Machado & Lagôa, 1994).

Impatiens walleriana, B. brizantha e *P. vittata* demostraram um comportamento parecido quando expostas à concentração de 20 mg L^{-1} 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 Treesubsuntorn (2012) a parte aérea das plantas estudas

continuaram a desenvolver-se durante a aspersão com 20 mg L^{-1} de benzeno. Entretanto, na concentração máxima somente *B. brizantha* e *P. vittata* continuaram desenvolvendo-se, indicando mecanismos de tolerância a altas concentrações do contaminante.

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 (Tabela 1), 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*. *Pteris vittata* não apresentou nenhum estômato aberto no momento da coleta das amostras no tratamento controle. Esta característica pode justificar a baixa quantidade de injúrias aparentes nas folhas desta espécie, pois durante as contaminações com benzeno 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 (Ugrekhelidze et al., 1997).

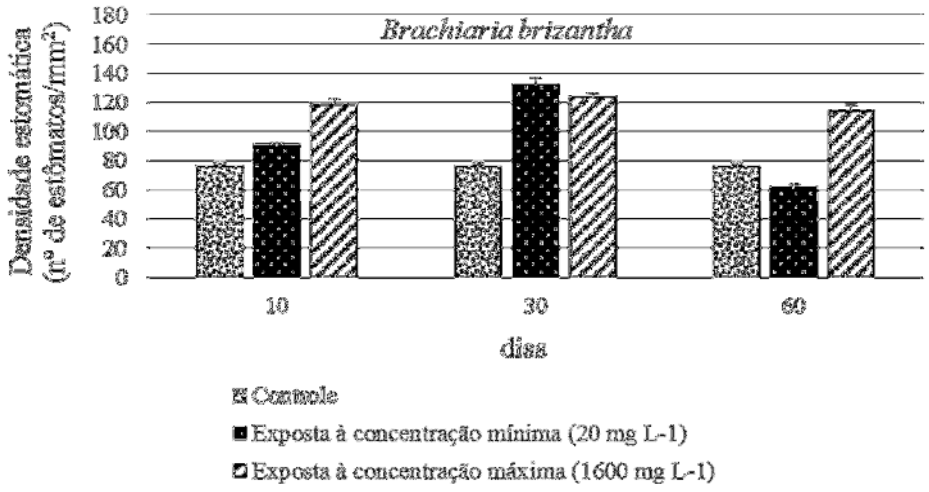
Tabela 1: Valores de área das aberturas estomáticas de *B. brizantha* (adaxial) e *I. walleriana* (abaxial) no tratamento controle.

Espécie	Aumento	Soma das áreas das aberturas estomáticas (µm²)	Área total da eletromicrografia (mm²)	Área relativa das aberturas estomáticas (µm²/mm²)
Brachiaria brizantha	300x	230,0	0,21	1091,35
Impatiens walleriana	500x	112,4	0,08	1486,51

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 aspersão de benzeno nas folhas, pois mesmo na concentração máxima (1600 mg L^{-1}) por 60 dias os indivíduos não morreram. 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.

As dimensões e frequência dos estômatos interferem na quantidade de poluentes gasosos absorvida pela planta e, consequentemente, nos possíveis efeitos causados pela poluição (Alves et al., 2001). Na Figura 4, 5 e 6 estão organizados, respectivamente, os valores de densidade estomática de *B. brizantha*, *I. walleriana* e *P. vittata* na concentração mínima e máxima nos três períodos estabelecidos.

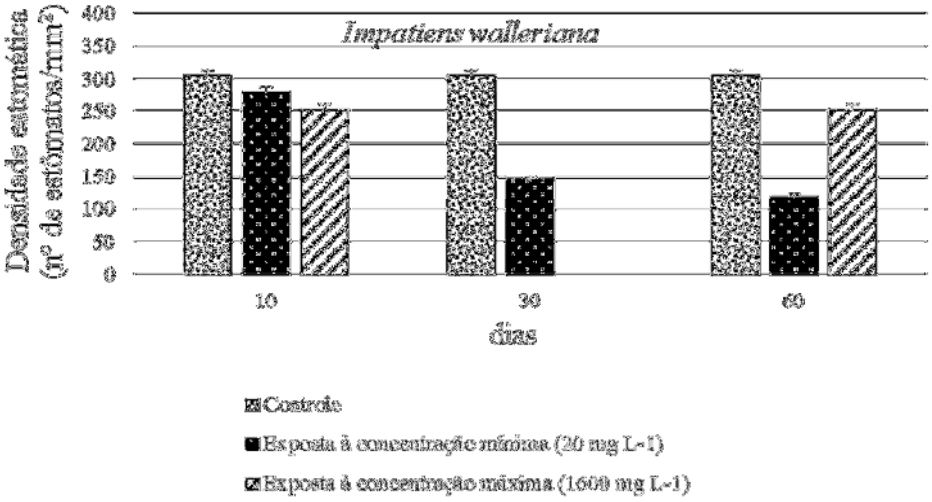
Figura 04: Visualização a partir de gráfico de barras, da densidade estomática da face adaxial de *B. brizantha*, a partir de eletromicrografia de varredura (300x), exposta ao tratamento controle e às concentrações mínima e máxima de benzeno, respectivamente, 20 mg L^{-1} e 1600 mg L^{-1} por 10, 30 e 60 dias.



Brachiaria brizantha na concentração mínima apresentou nos 10, 30 e 60 dias, respectivamente, 90,16, 132,86 e 61,69 estômatos/mm^2. Na concentração máxima

de benzeno os valores de densidade estomática foram mais elevados quando comparados com o controle (75,92 estômatos/mm^2) apresentando 118,63, 123,37 e 113,88 estômatos/mm^2. A média das densidades estomáticas na concentração máxima (118,63 estômatos/mm^2) foi significativamente maior que na concentração mínima (94,90 estômatos/mm^2).

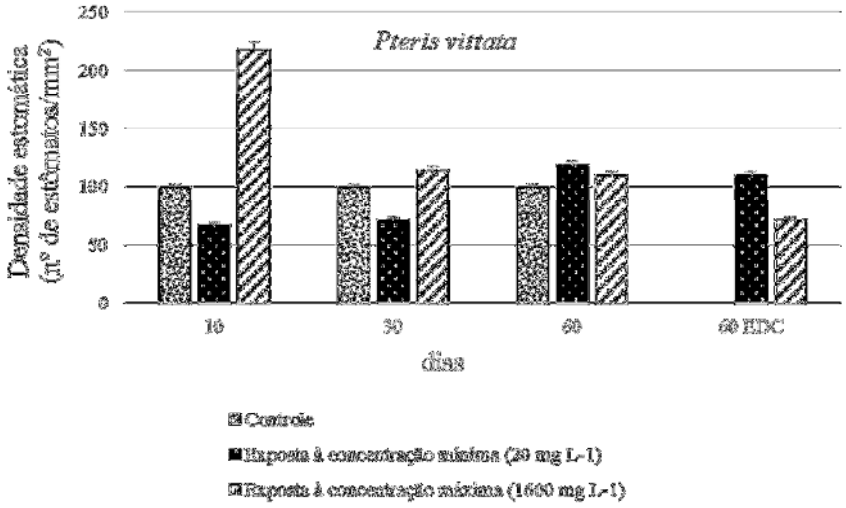
Figura 05: Visualização a partir de gráfico de barras, da densidade estomática da face abaxial de I. *walleriana*, a partir de eletromicrografia de varredura (500x), exposta ao tratamento controle e às concentrações mínima e máxima de benzeno, respectivamente, 20 mg L^{-1} e 1600 mg L^{-1} por 10, 30 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^{-1} de benzeno, apresentou uma redução gradual com valores de 277,73, 145,64 e 119,03 estômatos/mm^2, respectivamente, para 10, 30 e 60 dias.

Na concentração máxima a densidade estomática aos 10 e 50 dias apresentaram os mesmos valores (251,28 estômatos/mm^2) com uma diminuição em relação ao tratamento controle (304,18 estômatos/mm^2).

Figura 06: 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^{-1} e 1600 mg L^{-1} 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 na concentração máxima apresentou valores de densidade estomática (218,27; 113,88; 109,14 estômatos/mm^2 para 10, 30 e 60 dias) superior ao controle (99,65 estômatos/mm^2), já na concentração mínima os valores foram 66,43; 71,18; 118,63 estômatos/mm^2 para 10, 30 e 60 dias.

As folhas que emergiram durante a contaminação nos 60 dias de experimento quando comparadas ao tratamento controle (99,65 estômatos/mm^2), observa-se um leve aumento na densidade estomática das plantas expostas a 20 mg L^{-1} de benzeno (109,14 estômatos/mm^2) e uma grande redução na densidade das plantas expostas a 1600 mg L^{-1} de benzeno (71,18 estômatos/mm^2).

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. 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^{-1} não interfere a ponto de alterar significativamente a densidade estomática, e a baixa concentração de benzeno não é letal para esta espécie.

A densidade estomática de *I. walleriana*, exposta a 20 mg L^{-1} 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 mesofilo foliar, o que poderia levar a morte do indivíduo (Larcher, 2000). Entretanto, a redução da densidade estomática diminui a eficiência nas trocas gasosas e, consequentemente, reduz a assimilação de carbono, comprometendo a capacidade fotossintética da planta (Santos, 2012).

Na concentração máxima 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.

Brachiaria brizantha quando exposta à concentração mínima, apresentou um aumento em sua densidade estomática no 10º e 30º 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. O mesmo ocorreu com a densidade estomática das folhas de *B. brizantha* expostas ao tratamento na concentração máxima de benzeno.

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).

De maneira geral verificou-se uma redução na área dos estômatos de *B. brizantha* em ambas as concentrações com benzeno em relação ao tratamento controle. No tratamento controle os estômatos apresentaram uma área de 230,6 μm^2, já quando a planta foi exposta à concentração mínima de benzeno (20 mg L^{-1}) por 10, 30 e 60 dias, a área dos estômatos foram, respectivamente, 180,1 μm^2, 159,1 μm^2 e 97,25 μm^2. Já na concentração máxima (1600 mg L^{-1}) não se obteve um padrão decrescente de valores, mas em todos períodos os valores de área estavam abaixo do resultado encontrado no tratamento controle.

A área dos estômatos de *I. walleriana* nos dois tratamentos com benzeno, em todos os períodos, apresentou considerável aumento quando comparada com os estômatos do tratamento controle (24,6 μm^2), sendo que a média dos três períodos na concentração mínima foi 59,16 μm^2 e na concentração máxima de 37,5 μm^2.

Pteris vittata dentre as três espécies é a que possui os estômatos de maiores dimensões. No tratamento controle os estômatos apresentaram uma área de 806,33 μm^2. Já as plantas expostas ao tratamento com benzeno tiveram uma redução na área dos estômatos nas concentrações mínima (608,64 μm^2) e máxima (578,79 μm^2), em todos os períodos.

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* e *P. vittata*, 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 2, 3 e 4. 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 02: Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* no tratamento controle

Espécie/Tratamento	Aumento	Área (µm²)	Perímetro (µm)	Diâmetro Maior (µm)	Diâmetro Menor (µm)
Bb/controle	3000x	23,30	55,40	27,10	0,60

Tabela 03: Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* após os três períodos de contaminação na concentração mínima (20 mg L^{-1})

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Área (µm²)	Perímetro (µm)	Diâmetro Maior (µm)	Diâmetro Menor (µm)
Bb/10	3000x	18,70	38,60	19,90	0,70
Bb/30	3000x	18,10	43,20	21,30	0,60
Bb/60	3000x	0,96	6,58	18,00	0,20

Tabela 04: Caracterização da abertura dos estômatos, da face adaxial, de *B. brizantha* após os três períodos de contaminação na concentração máxima (1600 mg L^{-1})

Espécie/Período de exposição (dias)	Aumento	Área (µm²)	Perímetro (µm)	Diâmetro Maior (µm)	Diâmetro Menor (µm)
***Bb*/10**	3000x	17,15	37,1	18,05	0,65
***Bb*/30**	3000x	17,35	51,3	24,75	0,2
***Bb*/60**	3000x	17,60	43,00	20,70	0,6

A área de abertura dos estômatos de *I. walleriana* nos dois tratamentos com benzeno, concentração mínima (18,13 µm², 5,5 µm² e 4,7 µm²) e concentração máxima (6,1 µm², 5,95 µm² e 0,33 µm²), respectivamente, 10, 30 e 60 dias, teve considerável aumento quando comparada com os estômatos do tratamento controle (3,08 µm²). Entretanto, não foi possível estabelecer um padrão dos valores da área de abertura dos estômatos, pois tiveram grande variação entre si no mesmo tratamento. 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.

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^{-1} de benzeno não é letal para esta espécie quando exposta por um período de até 60 dias.

Pteris vittata apesar de possuir grandes estômatos, a espécie comportou-se de maneira a evitar danos mais intensos, que poderiam levar a morte da planta.

Não foi possível quantificar a abertura dos estômatos em todos os tratamentos e períodos, somente na concentração máxima (1600 mg L^{-1}), nos três períodos (10, 30 e 60 dias), os estômatos apresentaram abertura do ostíolo com área de, respectivamente, 4,0 μm^2, 20,4 μm^2 e 13,83 μm^2. Isto justifica a maior intensidade de danos visíveis nas folhas de *P. vittata* na concentração máxima.

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 Kudrjavtseva (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.

Conclusão

Através dos experimentos de injeção de benzeno no solo *B. brizantha* apresentou aumento das espécies reativas de oxigênio mais danosas às células, intensificando a morte celular. *Pteris vittata* priorizou o acúmulo de peróxido de hidrogênio, retardando os sintomas visíveis, entretanto este acúmulo induziu o aumento de morte celular. *Impatiens walleriana* apresentou pouco acúmulo de peróxido de hidrogênio e morte celular, provavelmente, por possuir eficiente sistema antioxidante.

Nos experimentos com aspersão de benzeno na parte aérea das plantas, *B. brizantha* e *P. vittata*, 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.

Agradecimento

Essa pesquisa foi financiada pelo CNPq (Processo n° 470012/2012-9) e pela FAPESP (processos n° 2012/05595-0, 2012/05982-3, 2012/08337-1, 2012/24832-2 and 2012/24832-2). Colaboração do Dr. Isaac Jamil Sayeg, da Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Geociências, pela colaboração em microscopia eletrônica de varredura.

Referências

ALVES, E.S. et al. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 567-576, dez. 2001.

ALVES, E.S.; MOURA, B.B.; DOMINGOS, M. Structural Analysis of *Tillandsia usneoides* L. Exposed to Air Pollutants in São Paulo City–Brazil. **Qualitative Water Air Soil Pollut**, v. 189, p. 61-68, 2008.

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

BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v 161, p. 405-414, 2001.

BURKEN, J.G.; SCHNOOR, J.L. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. **J Environ Engin**, v. 122, p. 958-963, 1996.

CAMPOS, V.; PIRES, M.A.F. Phytoremoval of arsenic from soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, n. 15-16, p. 2137-2146, 2004.

CAMPOS, V. et al. Assessment of the Removal Capacity, Tolerance, and Anatomical Adaptation of Different Plant Species to Benzene Contamination. **Water Air Soil Pollut**, v. 225, p. 2033, 2014.

CORNEJO, J.J. Studies on the decontamination of air by plants. **Ecotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 311-320, ago. 1999.

COURSEUIL, H.X. et al. **The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation**. Water Research, v. 32, p. 2065-2072, 1998.

ELEFTHERIOU, E.P. A comparative study of the leaf anatomy of olive trees growing in the city and the country. **Environ Exp Bot**, v. 27, p. 105-115, 1987.

EVANS, L.S.; ADAMSKI, J.H.; RENFRO, J.R. 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**, v. 36, p. 229-237, 1996.

FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1992. p. 176.

FAORO, F. et al. **Chitosan-elicited resistance to plant viruses:** a histochemical and cytochemical study. In: MUZZARELLI R.A.A. (ed.). Chitin Enzymology. Atec: Grottamare, 2001. p. 57-62.

FORNASIERO, R.B. Phytotoxic effects of fluorides. **Plant Science**, v. 161, p. 979-985, 2001.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidante signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 17, p. 1866-1875, jun. 2005.

GODOI, A.F.L. et al. Poluição e a densidade de vegetação**:** BTEX em algumas áreas públicas de Curitiba - PR, Brasil. **Quím. Nova**, v.33, n. 4, p. 827-833, 2010.

GRATÃO, P.L. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, fev. 2005.

IRITI, M. et al. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 4308-4314, 2003.

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

KAIPPER, A.I.B. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel**. 179p. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2003.

BALAGANSKAYA, E.D.; KUDRJAVTSEVA, O.V. Change of the morphological structure of leaves of Vaccinium vitisidaea caused by heavy metal pollution. **Chemosphere**, v.36, p. 721-726, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000. p. 530.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **JASHS**, v. 113, p. 167-171, 1988.

LEVINE, A. et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, p. 583-593, 1994.

MACHADO, E.C.; LAGÔA, A.M.M.A. Trocas gasosas e conduância estomática em três espécies de gramíneas. **Bragantia**, v. 53, n. 2, p. 141-149, 1994.

MATYSSEK, R. et al. Whole-plant growth and leaf formation in ozonated hybrid poplar (*Populus x euramericana*). **Environmental Pollution**, v. 81, p. 207-212, 1993.

MORENO, F.N.; COURSEUIL, H.X. Fitorremediação de aquíferos contaminados por benzeno e etanol. **Wat Res**, v. 35, n. 12, p. 3013-3017, 2001.

NIOSH: **National Institute for Occupational Safety and Health**. NIOSH Carcinogen List, 2006. Disponível em: http://migre.me/pvKRs. Acessado em 05 abr. 2013.

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. **Environ Pollut**, v. 96, p. 117-127, 1997.

PASSIOURA, J.B. Water in the soil-plant-atmosphere continuum. In: Lange, O.L; Nobel, P.S.; Osmond, C.B.; Ziegler, H. (eds.). **Physiological plant ecology II:** Water relations and carbon assimilation. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p. 5-33.

PATRA, M. et al. Comparison of Mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plants systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n 1. p. 199-223, fev. 2004.

PEDROSO, A.N.V. **Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* "Bel-W3" (Solanaceae)**. 88 p. Tese - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo (SP), 2009.

PERGO, E.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. 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**, v. 37, n. 5, p. 500-513, mai. 2011.

PITA-BARBOSA, A. et al. Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). **Acta bot bras**, v. 24, n. 4, p. 1027-1033, 2009.

SANTOS, A.P.M. **Biomonitoramento vegetal da qualidade do ar em Ribeirão Preto – SP**. 162 p. Tese - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP), 2012.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7-12, jan. 1993.

SHARMA, K.G. (1989). Cuticular and morphological dynamics in *Salix nigra* L. and *Quercus alba* L. in relation to air pollution. In: Bucher, J.B; 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. p. 527–529.

SOARES, M.A.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v. 1, p. 9-19, 2007.

SRIPRAPAT, W.; THIRAVETYAN, P. Phytoremediation of BTEX from indoor air by Zamioculcas zamiifolia. **Water Air Soil Pollution**, v. 224, p. 1484, 2013.

SRIVASTAVA, M. et al. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. **J Exp Bot**, v. 56, n. 415, p. 1335-1342, mai. 2005.

TREESUBSUNTORN, C.; THIRAVETYAN, P. Removal of benzene from indoor air by *Dracaena sanderiana*: effect ofwax and stomata. **Atmos Environ**, v. 57, p. 317-321, 2012.

UGREKHELIDZE, D.; KORTE, F.; KVESITADZ, G. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 37, p. 24-29, 1997.