

ALTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM
Eichhornia crassipes (MART.) SOLMS (AGUAPÉ) NO
RIO PARAÍBA DO SUL E RIO IMBÉ

Frederico Lage Pinto

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes/RJ

2008

ALTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM
Eichhornia crassipes (MART.) SOLMS (AGUAPÉ) NO
RIO PARAÍBA DO SUL E RIO IMBÉ

Frederico Lage Pinto

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense “Darcy
Ribeiro”, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ecologia e
Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Pierre Vitória
Co-orientador: Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira

Campos dos Goytacazes/RJ
Fevereiro de 2008

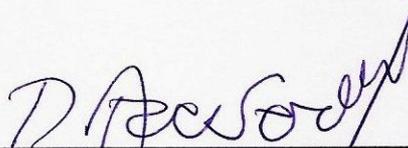
ALTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM
Eichhornia crassipes (MART.) SOLMS (AGUAPÉ) NO
RIO PARAÍBA DO SUL E RIO IMBÉ.

Frederico Lage Pinto

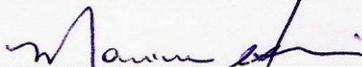
Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologias e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense "Darcy Ribeiro", como parte
das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2008.

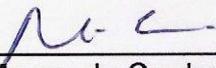
Comissão Examinadora:



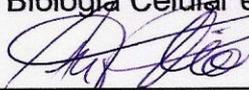
PhD. Ricardo Antunes de Azevedo
Departamento de Genética (ESALQ-USP)



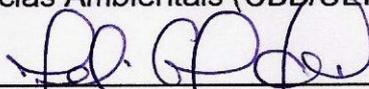
Dra. Marina Satika Suzuki
Laboratório de Ciências Ambientais (CBB/UENF)



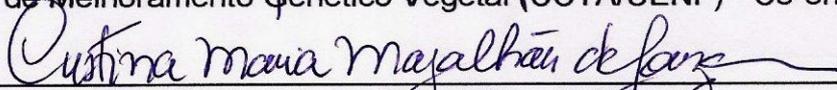
Dra. Maura da Cunha
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (CBB/UENF)



Dra. Angela Pierre Vitória
Laboratório de Ciências Ambientais (CBB/UENF) - Orientadora



Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira
Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (CCTA/UENF) - Co-orientador



Dra. Cristina Maria Magalhães de Souza
Laboratório de Ciências Ambientais (CBB/UENF) - Revisora e suplente

*“A água é como a saúde e a liberdade;
só tem valor quando acaba”.*
(João Guimarães Rosa)

*Aos meus pais,
Joaquim Paulo e Leda Mariza, e irmãos
Glícia e Leandro.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Angela Pierre Vitória, pela orientação, paciência e, sobretudo, pela inquestionável amizade durante todo o Mestrado. O meu sincero obrigado por confiar e acreditar em mim.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por viabilizarem a realização deste trabalho.

Ao professor Ricardo Antunes de Azevedo, pela colaboração.

Aos amigos e professores Jurandi Gonçalves de Oliveira, Marina Satika Suzuki, Maura Da Cunha e Cristina Maria Magalhães (Cristal), pelos bons exemplos e por todos os ensinamentos e oportunidades que contribuíram para minha formação profissional.

Ao pescador Vladimir e amigos Sr. Luís e Sr. Vidal pelo auxílio nas coletas de campo.

Ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) e aos funcionários deste, pela boa convivência e assistência constante durante as coletas e procedimentos laboratoriais, em especial a Marcelo Almeida, Ivanilton, Cristiano, Elmo, Ana Paula, Alcemir, Vanderlei, Alex, Mercadante e Jackson (Setor de transportes).

À todos os colegas e amigos do LCA, em especial a Luísa, Leonardo, Thiago Ribeiro, Elisângela, Juliana, Flávia, Aline, Anandra, Júnior e, principalmente, a Bruno Esteves, Gustavo, Tigrão, Taíse, Willian e Thiago Benevides.

Aos colegas e amigos do LBCT, em especial a Denise, Emílio e Tarsíla e, principalmente às técnicas Bia e Giovana pela amizade, carinho e apoio incondicional nos estudos de microscopia.

À Mateus, Aníbal, André Sarlo, Vinícios, a Bruna e Catarina pela consideração, amizade e, sobretudo pelos bons momentos proporcionados durante o curso.

Em especial quero manifestar minha eterna gratidão a Elaine Bernini, por não medir esforços em ajudar, pelo companheirismo, paciência, estímulo e, sobretudo, pelo carinho sempre presente.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE APÊNDICES	XVII
LISTA DE ANEXOS	XVIII
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
<hr/>	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fontes Poluidoras	1
1.2. Rios Paraíba do Sul e Imbé	1
1.2.1. Rio Paraíba do Sul	1
1.2.2. Rio Imbé	4
1.3. Metais Pesados	5
1.4. Plantas Aquáticas como Filtros Biológicos	6
1.5. Metabolismo Fotossintético	8
1.6. Anatomia e Ultraestrutura	10
<hr/>	
2. HIPÓTESES DE TRABALHO	12
<hr/>	
3. OBJETIVOS	13
<hr/>	
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Área de Estudo	13
4.2. Coleta do Material Vegetal e Dados Físico-Químicos	17
4.3. Fluorescência da Clorofila <i>a</i> e Concentração dos Pigmentos Fotossintéticos	18
4.4. Microscopia	21
4.4.1. Pré-fixação, Fixação e Desidratação	21
4.4.2. Infiltração e Inclusão do Material	21
4.4.3. Microscopia Óptica	21
4.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão	21
4.5. Análise Estatística	22
<hr/>	
5. RESULTADOS	22
5.1. Parâmetros Físico-Químicos	22

5.2. Variáveis da Fluorescência da Clorofila <i>a</i> e Pigmentos Fotossintéticos	25
5.3. Análises Anatômicas e Ultraestruturais	34
5.3.1. Microscopia Óptica (MO)	34
5.3.1.1. Primeiro Ano de Coleta	34
5.3.1.2. Segundo Ano de Coleta	39
5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	41
<hr/>	
6. DISCUSSÃO	48
6.1. Parâmetros Físico-Químicos	48
6.2. Fluorescência da Clorofila <i>a</i> e Pigmentos Fotossintéticos	50
6.3. Análises Anatômicas e Ultraestruturais	58
6.3.1. Microscopia Óptica (MO)	58
6.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
<hr/>	
7. CONCLUSÃO	61
<hr/>	
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
<hr/>	
9. APÊNDICES	75
<hr/>	
10. ANEXOS	77
<hr/>	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CEIVAP = Comitê para integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul

Clo *a* = Clorofila *a*

CSN = Companhia Siderúrgica Nacional

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNAEE = Departamento Nacional de Água e Energia Elétrica

F_0 = Fluorescência mínima

FEEMA = Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente

FFF = Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos

F_m = Fluorescência máxima

FS_{II} = Fotossistema II

F_v = Fluorescência variável

F_v/F_m = Rendimento quântico potencial do fotossistema II

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LBCT = Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

LCA = Laboratório de Ciências Ambientais

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO = Microscopia Óptica

MPS = Material Particulado em Suspensão

$NADP^+(H_2)$ = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada (reduzida)

NPQ = Coeficiente de extinção não-fotoquímico

Q_A = Quinona A

q_N = *Quenching* não-fotoquímico ou dissipação não-fotoquímica

q_P = *Quenching* fotoquímico ou dissipação fotoquímica

RPS = Rio Paraíba do Sul

LISTA DE TABELAS

Pág.

- Tabela 1.** Valores dos parâmetros físico-químicos ambientais e da água para o rio Imbé e três pontos do rio Paraíba do Sul (baixo, médio e alto) no final do período seco (setembro/outubro) de 2005 e 2006 e no final do período chuvoso (março) de 2006 e 2007. MPS - Material Particulado em Suspensão. RPS – rio Paraíba do Sul..... 24
- Tabela 2.** Resultados da ANOVA multifatorial ($*p \leq 0,05$) realizada para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS). IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; F_0 = fluorescência inicial; F_m = fluorescência máxima; F_v = fluorescência variável; F_v/F_m = rendimento quântico do FS_{II}; F_v/F_0 = taxa variável de rendimento; q_N = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica..... 26
- Tabela 3.** Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (média \pm erro padrão) determinados em aguapé no rio Imbé e em três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2005 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (seco 2005 com seco 2006; e chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – multifatorial e teste de Tukey). F_0 = fluorescência inicial; F_m = fluorescência máxima; F_v = fluorescência variável; F_v/F_m = rendimento quântico do FS_{II}; F_v/F_0 = taxa variável de rendimento; q_N = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso..... 27
- Tabela 4.** Resultados da ANOVA *two-way* mostrando diferenças significativas ($*p \leq 0,05$) para as concentrações de pigmentos fotossintéticos determinados em aguapés provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) nos períodos: seco de 2006 e chuvoso de 2007. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS..... 31

Tabela 5. Concentrações de pigmentos fotossintéticos determinados em aguapés (média \pm erro padrão) provenientes do rio Imbé e três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2006 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – *one-way* (1º ano) e *two-way* (2º ano) e teste de Tukey). [Clo *a*] = clorofila *a*; [Clo *b*] = clorofila *b*, [Caro] = carotenóides; Clo *a/b* = relação clorofila *a/b*; Clo (*a + b*)/(Caro) = relação clorofila (*a + b*)/(Caro); [Clo Totais] = clorofilas totais; IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso..... 32

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1 - Bacia do rio Paraíba do Sul. Fonte: http://www.ceivap.org.br	03
Figura 2 - <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms (aguapé).....	07
Figura 3 - Pontos de coleta: 1- rio Imbé, ponto controle, localizado em Campos dos Goytacazes (RJ), 2- Baixo RPS - Campos dos Goytacazes (RJ), 3- Médio RPS - Volta Redonda (RJ), 4- Alto RPS -São José dos Campos (SP).	14
Figura 4 - Local de coleta no rio Imbé (retângulo). A seta indica o sentido do fluxo do rio.....	15
Figura 5 - Local de coleta na porção do baixo RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.....	15
Figura 6 - Local de coleta na porção do médio RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.....	16
Figura 7 - Local de coleta na porção do alto RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.....	17
Figura 8 - Nomenclatura usada para caracterizar os principais parâmetros da fluorescência da clorofila <i>a</i> ; LM = luz modulada e PS = pulso saturante (adaptado de Schreiber <i>et al.</i> , 1994).....	19
Figura 9 - Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> (NPQ e q_N) e concentração de carotenóides ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) período seco de 2005 e chuvoso de 2006. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica. Letras a, b e c comparação entre os locais de coleta. ANOVA Multifatorial e Tukey ($p \leq 0,05$) para NPQ e q_N e ANOVA <i>Two-way</i> e Tukey ($p \leq 0,05$) para carotenóides ($n=10$).....	28

Figura 10 - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (NPQ e q_N) e concentração de carotenóides ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$) determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) período seco de 2006 e chuvoso de 2007. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica. Letras a, b e c comparação entre os locais de coleta. ANOVA Multifatorial e Tukey ($p \leq 0,05$) para NPQ e q_N e ANOVA *Two-way* e Tukey ($p \leq 0,05$) para carotenóides ($n=10$)..... 29

Figura 11 - Correlação de Pearson entre os parâmetros NPQ: $[\text{Caro}] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ e q_N : $[\text{Caro}] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) para os períodos: (a) chuvoso/2006, (b) seco/2006 e (c) chuvoso/2007. NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica e $[\text{Caro}] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ = concentração de carotenóides. Valores significativos para $p \leq 0,05$ ($n=40$)..... 33

Figura 12 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 μm . Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 35

Figura 13 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 μm . Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 35

Figura 14 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando epiderme abaxial (eab), aerênquima (aer) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 μm . Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul 36

- Figura 15** – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando epiderme abaxial (eab) aerênquima (aer) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 37
- Figura 16** – Secção transversal do pecíolo de aguapé evidenciando aerênquima (aer) e epiderme (e). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 37
- Figura 17** – Secção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 38
- Figura 18** – Secção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 38
- Figura 19** – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 39
- Figura 20** – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando idioblastos (setas), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer) e epiderme adaxial (ead). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2007. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto

RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 40

Figura 21 – Secção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 40

Figura 22 – Secção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso 2007. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul..... 41

Figura 23 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no rio Imbé nos períodos seco de 2005 e chuvoso de 2006, mostrando várias organelas. A – aumento 7.000x, B – aumento 12.000x, C e D – aumento 50.000x. ★ – Grãos de amido no cloroplasto. ◆ – núcleo celular. ⇔ – plastoglóbulo . † – mitocôndria..... 42

Figura 24 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período seco de 2005 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A, A1 e A2), médio RPS (B, B1 e B2) e alto RPS (C, C1 e C2). A, B e C – aumento de 12.000 x, A1, B1 e C1 – aumento de 85.000x, A2, B2 e C2 – aumento de 140.000 x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★ - Grão de amido. ⇔ – Plastoglóbulos..... 43

Figura 25 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período chuvoso de 2006 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C), alto RPS (D e G). A, B, C e D – aumento 12.000x. E e F – aumento 50.000x. G – aumento 30.000x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★ - Grãos de amido..... 44

Figura 26 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé

coletadas no final do período seco de 2006 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C e G), alto RPS (D e H). A, B, C e D – aumento 12.000x. E – aumento 30.000x. F, G e H – aumento 20.000x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★ - Grãos de amido. ⇔ - Plastoglóbulos..... 45

Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período chuvoso de 2007 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C e G), alto RPS (D e H). A, B, C e D – aumento 7.000x. E, G e H – aumento 85.000x. F – aumento 50.000x. RPS – rio Paraíba do Sul; ★ - Grãos de amido. ⇔ - Plastoglóbulos 46

Figura 28 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período seco de 2005 mostrando mitocôndrias. Rio Imbé (A), médio RPS (B) e alto RPS (C). Aumento de 50.000 x. RPS - rio Paraíba do Sul..... 47

LISTA DE APÊNDICES

Pág.

Apêndice 1. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (média \pm erro padrão) determinados em aguapé no rio Imbé e em três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2005 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (seco 2005 com seco 2006; e chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – multifatorial e teste de Tukey). q_N = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso..... 75

Apêndice 2. Concentrações de pigmentos carotenóides determinados em aguapé (média \pm erro padrão) provenientes do rio Imbé e três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2006 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – *one-way* (1º ano) e *two-way* (2º ano) e teste de Tukey). [Caro] = carotenóides. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso..... 76

LISTA DE ANEXOS

Pág.

- Anexo 1.** Radiação solar média mensal no período de janeiro de 2005 a maio de 2007 para o município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Fonte dos dados: Estação Evapotranspirométrica do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense, PESAGRO-RIO)..... 77
- Anexo 2.** Temperaturas médias mensais e pluviosidade total mensal no período de janeiro de 2005 a maio de 2007 para o município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Fonte dos dados: Estação Evapotranspirométrica do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense, PESAGRO-RIO)..... 77
- Anexo 3.** Vazão média mensal ($m^3.s^{-1}$) na região do baixo RPS no período de janeiro de 2005 a maio de 2007. (Fonte: Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense)..... 78
- Anexo 4.** Série histórica da vazão ($m^3.s^{-1}$) do baixo RPS nos anos de 1995 a 2007. N = número amostral. (Fonte: Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense)..... 78
- Anexo 5.** Concentrações de Cu (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março)..... 79
- Anexo 6.** Concentrações de Zn (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos

períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março)..... 80

Anexo 7. Concentrações de Mn (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março)..... 81

RESUMO

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* (F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , F_v/F_0 , q_N e NPQ), as concentrações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* (Clo *a*), clorofila *b* (Clo *b*), carotenóides (*Caro*), Clo *a/b*, Clo (*a + b*)/(Caro), clorofilas totais (Clo Totais)) e as alterações anatômicas e ultraestruturais foram estudadas para avaliar condições de estresse em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) ao longo do rio Paraíba do Sul (RPS), no sudeste do Brasil. Os dados foram obtidos no final dos períodos seco e chuvoso durante dois anos em quatro ambientes: 1) rio Imbé (Campos dos Goytacazes – RJ), considerado o controle por apresentar menor aporte antropogênico; 2) baixo RPS (Campos dos Goytacazes – RJ); 3) médio RPS (Volta Redonda – RJ) e 4) alto RPS (São José dos Campos – SP). Os valores de F_0 variaram de 212 a 318; F_m de 979 a 1.736; F_v de 760 a 1.418; F_v/F_m de 0,77 a 0,84; F_v/F_0 de 3,46 a 5,39; q_N de 0,019 a 0,036 e NPQ de 0,025 a 0,045. Os coeficientes de dissipação não-fotoquímicos (q_N e NPQ) das plantas foram mais elevados nas regiões mais industrializadas do RPS (médio e alto) em ambos os períodos. Entretanto, os valores de F_v/F_m indicaram que aguapé não apresentou estresse. A concentração de Clo *a* variou de 0,020 a 0,048 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, Clo *b* de 0,006 a 0,020 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, *Caro* de 0,007 a 0,016 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, - A relação Clo *a/b* de 2,1 a 3,5, Clo (*a + b*)/(Caro) de 3,3 a 4,8 e Clo Totais de 0,026 a 0,068. Foi verificada correlação positiva entre a concentração de pigmentos carotenóides e as variáveis de dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ) no aguapé. Através de microscopia óptica, variações no tamanho das células da epiderme do limbo e pecíolo, além de uma redução no número de camadas de células do córtex interno da zona de absorção da raiz de aguapé, foram observadas nas plantas do médio RPS no segundo ano de estudo. A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que o volume do estroma aumentou nos cloroplastos de aguapé do médio RPS, sendo que esta alteração persistiu independente dos períodos de coleta. Neste local os cloroplastos apresentaram uma desorganização dos tilacóides e ausência de grãos de amido. Apesar de as plantas de aguapé do médio e alto RPS terem apresentado algumas alterações anatômicas e ultraestruturais em comparação com o controle, a integridade das células, cloroplastos e membranas das organelas foram mantidas, o que sugere que estas plantas não estejam submetidas a condições drásticas de estresse.

Palavras Chave: Fluorescência da Clorofila *a*, Macrófitas Aquáticas, Concentração de Pigmentos Fotossintéticos, Microscopia, Estresse Ambiental.

ABSTRACT

Chlorophyll *a* fluorescence parameters (F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , F_v/F_0 , q_N and NPQ), photosynthetic pigments concentration (chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), total carotenoids (*Caro*), Chl *a/b*, Chl (*a + b*)/(*Caro*) and total chlorophylls (Chl total)) and anatomical and ultrastructural alterations were studied to assess the stress conditions in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth) along the Paraíba do Sul river (PSR), an important river in southeastern Brazil. The data were obtained at the end of the dry season and at the end of the wet season by two years in four sites: 1) Imbé river (Campos dos Goytacazes – RJ), the control; 2) lower PSR (Campos dos Goytacazes – RJ); 3) medium PSR (Volta Redonda – RJ) e 4) and upper PSR (São José dos Campos – SP). Values of F_0 ranged of 213 - 318; F_m 979 - 1.736; F_v 760 - 1.418; F_v/F_m 0,77 - 0,84; F_v/F_0 3,46 - 5,39; q_N 0,019 - 0,036 and NPQ 0,025 - 0,045. Non-photochemical dissipation coefficients (q_N and NPQ) from plants were the biggest in the most industrialized region of the PSR (medium and upper) in both seasons. However, F_v/F_m showed a high maximum quantum yield for all samples, suggesting that the plants were not stressed. Values of Chl *a* ranged of 0,020 - 0,048 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$, Chl *b* 0,006 - 0,020 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$, *Caro* 0,007 - 0.016 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$, Chl *a/b* 2,1 - 3,5, Chl (*a + b*)/(*Caro*) 3,3 - 4,8 and Chl total 0,026 - 0,068. Results demonstrated a correlation among total carotenoids concentrations and non-photochemical dissipation parameters (q_N and NPQ) on water hyacinth. Through optical microscopy, variations in the size of the cells of the epidermis of limbo and petiole, and a reduction in the number of layers of cells in the cortex of the internal area of the root absorption of water hyacinth were observed in plants of medium RPS in the second year of study. Transmission electron microscopy showed that volume of the chloroplast stroma increased in the medium of water hyacinth PSR, and this amendment persisted independent periods of collection. In this place the chloroplasts showed non-stacking grana and lack of starch grains. While plants of the medium and upper RPS have made some anatomical and ultrastructural changes compared with control, the integrity of cells, membranes of chloroplasts and organelles were maintained, which suggests that these plants are not subjected to conditions of drastic stress.

Key words: Chlorophyll *a* Fluorescence, Aquatic Macrophytes, Concentration of Photosynthetic Pigments, Microscopy, Environmental stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fontes Poluidoras

As demandas crescentes da população, aliada ao desejo da maioria das pessoas na obtenção de um padrão de vida mais elevado, vêm resultando em uma poluição global em escala massiva (Vörösmarty *et al.*, 2000).

O desenvolvimento econômico e social de qualquer país depende da disponibilidade de água de boa qualidade e da capacidade de conservação e proteção dos mananciais. Uma das causas fundamentais do aumento no consumo de água, e da rápida deterioração da sua qualidade é o aumento da população mundial e da taxa de urbanização. No Brasil, segundo o levantamento do IBGE (Brasil em Síntese – 2006), cerca de 81,25% da população brasileira está localizada em áreas urbanas. Nestas regiões, os principais problemas relacionados aos sistemas hídricos são decorrentes do excesso da carga poluidora, doméstica ou industrial, lançada no meio hídrico, bem como do aumento da demanda de água, o que reduz as vazões e favorece as contaminações (Cunha *et al.*, 2003). Esta combinação provoca o aumento da poluição de origem orgânica e química, contaminando os rios com esgoto doméstico e/ou industrial. Assim, a água retirada dos mananciais retorna aos mesmos poluída, prejudicando o próprio abastecimento e a sustentabilidade da população e do ambiente.

Em ecossistemas aquáticos lóticos, as fontes poluidoras mais importantes incluem os efluentes domésticos, a fundição de metais não-ferrosos, a fabricação de ferro e aço, o descarte de lodo de esgoto e a deposição atmosférica (Guilherme & Marchi, 2004). Alguns insumos agrícolas ou subprodutos usados com finalidade corretiva ou nutricional na agricultura também representam fontes de contaminação (Förstner & Wittmann, 1983, Guilherme & Marchi, 2004).

1.2. Rios Paraíba do Sul e Imbé

1.2.1. Rio Paraíba do Sul

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul (RPS; Fig. 1) possui aproximadamente 1.145 km de extensão e está localizada entre os paralelos 20°26' e 23°38' Sul e os meridianos 41°00' e 46°30' Oeste. Esta bacia possui uma área de 55.400 km², estendendo-se pelos estados de São Paulo (13.900 km²), Rio de Janeiro (20.900 km²) e Minas Gerais (20.700 km²), abrangendo 180 municípios - 88

no estado de Minas Gerais, 53 no estado do Rio de Janeiro e 39 no estado de São Paulo. A área desta bacia corresponde a aproximadamente 0,7 % da área do país e, cerca de 6% da região sudeste do Brasil. Por estarem situadas ao longo do eixo Rio-São Paulo, dois dos estados de maior produção industrial e consumo do país, ao longo de seu trajeto, as águas do RPS são utilizadas para irrigação e abastecimento de várias cidades (dentre elas Rio de Janeiro e Campos dos Goytacazes), que lançam seus dejetos industriais e urbanos no canal fluvial na maioria das vezes, sem tratamento prévio (Bizerril *et al.*, 1998).

Com relação à cobertura vegetal da bacia e uso do solo, 70% de sua área é formada por pastagens; 27% por culturas, reflorestamento e outros; o restante é formado por florestas nativas (Mata Atlântica), remanescentes em regiões como a Serra dos Órgãos e os Parques Nacionais da Serra da Bocaina e do Itatiaia (Bizerril *et al.*, 1998; CEIVAP, 2001).

O regime hidrológico do rio Paraíba do Sul apresenta um período de águas baixas que vai de julho a outubro, com as vazões mínimas ocorrendo com maior frequência em setembro. O período de águas altas do rio vai de dezembro a março, sendo que as maiores vazões ocorrem em fevereiro (Bizerril *et al.*, 1998).

O RPS é dividido em três trechos (Fig. 1) (CEIVAP, 2001):

* Porção Superior (Alto Paraíba) - Localizada exclusivamente no Estado de São Paulo, com destaque para as seguintes cidades: *Cunha, Paraibuna, Jacareí, São José dos Campos, Taubaté, Guaratinguetá*, entre outras;

* Porção Média (Médio Paraíba) - Localizada nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, com destaque para as seguintes cidades: *Resende, Volta Redonda, Barra Mansa, Barra do Piraí, Valença, Petrópolis, Juiz de Fora*, entre outras;

* Porção Inferior (Baixo Paraíba) - Localizada nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, com destaque para as seguintes cidades: *Além Paraíba, Itaocara, Nova Friburgo, Carangola, Ubá, Cataguases, Muriaé, Itaperuna, Campos dos Goytacazes e São João da Barra*, onde o RPS encontra o oceano.

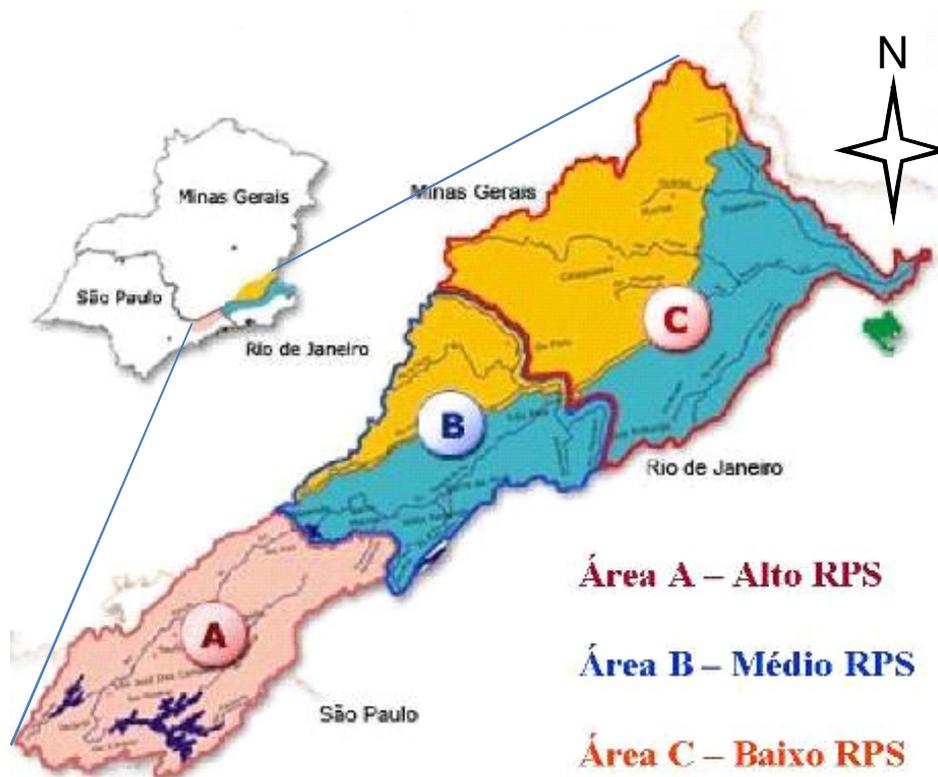


Figura 1. Bacia do rio Paraíba do Sul. Fonte: <http://www.ceivap.org.br>.

Há diversos fatores que contribuem para a degradação da qualidade das águas do RPS, tais como: a disposição inadequada do lixo; desmatamento indiscriminado com a conseqüente erosão e assoreamento do rio; retirada de recursos minerais para a construção civil sem a devida recuperação ambiental; uso indevido e não controlado de agrotóxicos; ocupação desordenada do solo; pesca predatória, entre outros (CEIVAP, 2001).

O setor industrial da bacia do RPS se concentra principalmente no alto RPS (São José dos Campos e Jacareí) e médio RPS (Volta Redonda e Resende), sendo que os principais representantes são os setores metalúrgico, químico, alimentício e de papel (Malm, 1986; FEEMA, 2007). No médio RPS, o quadro é agravado principalmente pelo seu grande parque industrial (siderurgia e metalurgia). Como conseqüência, já foi verificado que essa porção do RPS apresentou concentrações críticas de alguns metais pesados (Pb, Cu, Cr e Zn) no material particulado em suspensão (Malm, 1986). Estudos recentes nesta porção do RPS não são encontrados para se estabelecer comparação ao longo do tempo.

Na sua porção inferior (baixo RPS) a atividade industrial é reduzida, tendo como destaque as indústrias de açúcar e de álcool (Bizerril *et al.*, 1998). Carvalho *et al.* (1999) caracterizam a bacia do baixo RPS como de baixo grau de contaminação por metais pesados quanto à matéria particulada e os sedimentos. O setor agropecuário desta região é dominado pela cultura da cana-de-açúcar e pela pecuária extensiva. Outra forma importante de uso dos solos é a urbanização.

Gimeno-Garcia *et al.* (1996) estudaram a incidência de metais pesados como impurezas de fertilizantes e pesticidas aplicados aos solos agrícolas, tendo encontrado que as adições mais significativas foram de Mn, Zn, Co e Pb. Os fertilizantes minerais e orgânicos, bem como os corretivos de solo contêm Zn, freqüentemente como impureza (Kiekens, 1990). Ovalle *et al.* (1997) sugerem que práticas agrícolas como queima, colheita, aradura, adubação e irrigação nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar são, junto com o esgoto doméstico, importantes fontes antrópicas de nutrientes para os cursos d'água da região do RPS.

1.2.2. Rio Imbé

O rio Imbé nasce na serra que possui o mesmo nome no município de Santa Maria Madalena (RJ), desenvolvendo um percurso total de 70 km até sua desembocadura na Lagoa de Cima a qual está situada no município de Campos dos Goytacazes (RJ) (SEMADS, 2001).

O rio Urubu nasce na Serra do Quimbira tendo seu curso cerca de 40 km de extensão. Juntos, rio Imbé e rio Urubu drenam uma área de 986 km² alimentando a Lagoa de Cima. Por meio do canal Ururaí, a Lagoa de Cima escoas suas águas para a Lagoa Feia. O complexo hídrico rio Imbé-Lagoa de Cima-rio Ururaí compõe a bacia hidrográfica da Lagoa Feia (SEMADS, 2001).

A região drenada pelo rio Imbé situa-se no município de Santa Maria Madalena (cerca de 10.500 habitantes) e abrange uma porção rural (pouco habitada) do município de Campos dos Goytacazes. Ao contrário do rio Paraíba do Sul, as águas do rio Imbé e de seus afluentes apresentam um aporte reduzido de dejetos antropogênicos (Pedrosa *et al.*, 1999).

1.3. Metais Pesados

Em uma bacia de drenagem, a dispersão do material sólido eventualmente contaminado por metais pesados (grupo de elementos químicos que apresentam: alta densidade, e relativa toxicidade – Baird, 2002) se dá geralmente em função das condições hidráulicas que controlam diferentes processos: (1) distribuição de acordo com o tamanho e densidade da partícula; (2) processo de mistura, no qual sedimentos são adicionados ao sistema fluvial e (3) estocagem e armazenamento em planícies inundáveis, leito do rio, lagos, reservatórios e estuários (Foster & Charlesworth, 1996). Assim, a poluição de um rio pode ser gradativamente reduzida devido às chuvas e à entrada de afluentes menos contaminados. Carvalho *et al.* (1999) estudando a variação sazonal de metais pesados no baixo RPS encontraram uma variabilidade temporal que permitiu agrupar os metais pesados estudados em dois grupos distintos quanto à sua concentração: (1) metais que aumentam a sua concentração com o aumento do fluxo d'água (Fe e Cu); (2) metais pesados que diminuem a sua concentração com o aumento do fluxo d'água (Zn, Cr, Mn).

Do ponto de vista biológico, alguns elementos-traço (ex.: Cu, Zn, Co e Mn) são considerados essenciais. Entretanto, mesmo os elementos essenciais podem, sob condições específicas, causar impactos negativos em ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se, assim, em contaminantes ou poluentes de solo e da água (Guilherme & Marchi, 2004).

Estudos realizados na região do baixo RPS indicaram sazonalidade nas concentrações de metais pesados nas frações dissolvidas e particuladas, observando-se concentrações mais elevadas nas frações dissolvidas durante o período seca. Uma relação direta entre estas concentrações e a concentração de carbono também foi estabelecida, indicando ser a matéria orgânica um importante fator na dinâmica dos metais pesados na referida região de estudo (Salomão, 1999).

Gonçalves (2003) verificou que existe diferença na concentração de metais pesados (Al, Mn, Fe, Cd, Cr, Cu e Pb) nas frações dissolvida e particulada do estuário do RPS. Cerca de 99% das concentrações desses metais estiveram associadas à fração particulada. Foi possível observar também algumas variações temporais em relação aos dois períodos de vazão fluvial (alta e baixa), bem como o fluxo destes metais nas referidas frações. Os elementos Cr, Cd e Pb apresentaram uma distribuição sazonal, com concentrações médias mais elevadas no período de baixa vazão do rio. Por outro lado, Al, Fe e Mn tiveram suas concentrações

aumentadas no período de cheia. Durante a alta vazão as concentrações de Cr, Cd e Pb no particulado estiveram abaixo do limite de detecção médio utilizado no estudo.

1.4. Plantas Aquáticas como Filtros Biológicos

Algumas espécies de plantas desenvolveram diferentes estratégias de tolerância para crescer em ambientes ricos em metais pesados. Muitas plantas absorvem e acumulam metais pesados em concentrações relativamente altas sem sofrer danos (Gupta & Goldsbrough, 1991; Neumann *et al.*, 1994). Alguns desses mecanismos estratégicos têm sido sugeridos: 1) produção de compostos que se ligam facilmente a íons metálicos como aminoácidos (Reilly, 1972), ácido cítrico (Thurman & Ranking, 1982), ácido málico (Brookes *et al.*, 1981) e fitoquelatinas (Ruegsegger & Brunold, 1992); 2) deposição de metais em vacúolos ou excreção por glândulas específicas (Fernando & Fernando, 1994); 3) síntese de metabólitos associados à estresse (Neumann *et al.*, 1994).

Estas estratégias têm conduzido cientistas, engenheiros e gestores a se interessarem pela toxicidade e tolerância de plantas a metais. Desta forma, vem sendo avaliado o papel das plantas aquáticas no fluxo biogeoquímico de metais, bem como o uso dessas plantas como filtros biológicos para despoluição das águas e biomonitoramento dos níveis de metais no ambiente (Chua, 1998; Soltan, 1999; Vesik *et al.*, 1999; Soltan & Rashed, 2003).

Eichhornia crassipes (Mart.) Solms (aguapé) (Fig. 2) é uma das plantas que atrai considerável interesse pela sua habilidade de crescer em águas poluídas e ser capaz de tolerar e acumular íons de metais pesados (Gopal, 1987; Soltan, 1999; Vesik *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004). Esta estratégia é conhecida como hiperacumulação, um termo criado por Brooks *et al.* (1977) para descrever plantas que acumulam mais que $1.000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ em massa seca de suas partes aéreas.



Foto: Jardim Botânico Nacional da Bélgica

Figura 2. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé).

Aguapé é uma monocotiledônea pertencente à família Pontederiaceae, uma pequena família de ampla distribuição pantropical, incluindo cerca de 10 gêneros e cerca de 30 espécies. No Brasil, ocorrem 5 gêneros e cerca de 20 espécies, sendo um grupo bem representado no Pantanal Matogrossense (Souza & Lorenzi, 2005). Encontradas apenas em ambientes aquáticos, os gêneros presentes no Brasil são *Eichhornia*, *Hydrothrix*, *Reussia*, *Pontederia* e *Heteranthera*. Esta família apresenta características como: folhas pecioladas, com bainha larga que envolve o caule na base, formato sagitado ou ovalado e em certos casos com pecíolo inflado; inflorescência em geral em um racemo simples, espiciforme, protegida na base por uma bainha foliar espatácea; apresentam flores azuis, roxas ou brancas, vistosas, radiais ou zigomorfas, hermafroditas e perianto composto por seis elementos, todos corolinos; androceu composto de 6 estames (também 3 ou 1), epipétalos, freqüentemente de tamanhos diferentes; ovário súpero, tricarpetal, trilocular ou unilocular, óvulos numerosos ou apenas um, fruto seco, capsular, semente com abundante endosperma (Souza & Lorenzi, 2005).

As plantas de aguapé são utilizadas para diferentes fins: produção de álcool, metano, e também como biofertilizante; é usada como planta ornamental, com potencial para confecção de seda sintética (rayon); é usada na Índia para fabricação de papel e papelão; a inflorescência nova e o broto tenro são usados como alimento humano; e o amido tem potencial para biscoitos, bolos, etc. (Pott & Pott, 2000; Lhano, 2002). Segundo Gopal (1987) o cultivo deve ser realizado em água rica em

nutrientes a sol pleno e em águas rasas, pois suas raízes podem retirar nutrientes do fundo.

1.5. Metabolismo Fotossintético

Caso os mecanismos de tolerância a metais pesados não sejam prontamente eficientes, a planta pode ter seu metabolismo comprometido, como pode ser verificado no caso específico do metabolismo fotossintético. As moléculas de clorofila quando absorvem a energia luminosa (fótons) alteram, temporariamente, as suas configurações eletrônicas passando do estado basal ($Cl\ o\ a$) para o estado excitado ($Cl\ o\ a^*$). Este estado excitado é muito instável e de curta duração. Desta maneira, estes pigmentos fotossintéticos, necessitam dissipar a energia proveniente da luz, podendo fazê-lo por meio de três vias principais (Maxwell & Johnson, 2000):

- Dissipação Fotoquímica (Ph): é a utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese (doação do elétron proveniente da molécula de água para um acceptor denominado $NADP^+$ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado oxidado)).
- Fluorescência (F): emissão de radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante).
- Dissipação Não-Fotoquímica (D): é a produção de calor na forma de radiação infravermelha.

Estes processos ocorrem em competição, o aumento na eficiência de um, resultará no decréscimo no rendimento dos outros dois (Maxwell & Johnson, 2000). Condições de estresse, como a presença de metais pesados na planta, alteram a eficiência destes processos. Uma medida eficaz para se avaliar as condições de estresse é a medida do rendimento quântico do FS_{II} . Assim, alterações na fluorescência emitida pela clorofila a podem mostrar a ausência ou a presença de comprometimentos no processo fotossintético (Maxwell & Johnson, 2000).

A avaliação da eficiência fotoquímica do fotossistema (FS_{II}) é obtida por meio dos parâmetros da fluorescência da clorofila a . O rendimento da fluorescência da clorofila a revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons do FS_{II} (Bolhàr- Nordenkampf *et al.*, 1989). Além disso, é uma técnica rápida, não-destrutiva e sensível,

constituindo importante avanço em estudos fisiológicos e relacionados à ecologia de plantas (Krause & Weis, 1991).

Existe um consenso geral de que o FS_{II} é susceptível a alguns tipos de estresse, incluindo os metais pesados (Ouzounidou *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1999). A fotossíntese é tipicamente diminuída pelos níveis elevados de metais pesados, mas efeitos específicos de um dado metal na fotossíntese variam entre as espécies (Heckathorn *et al.*, 2004).

A substituição dos íons de Mg²⁺ nas moléculas de clorofila por certos metais pesados tóxicos, tais como Cu, Zn, Cd ou Hg têm sido observada em fanerógamas submetidas a estresse por metais pesados, resultando em queda da taxa fotossintética (Küpper *et al.*, 1996). Entretanto, em baixas concentrações alguns metais pesados, como Fe, Zn e Cu, são essenciais para as plantas, pois fazem parte de uma série de reações catalisadas por enzimas e reações redox de transferência de elétrons (Zenk, 1996).

Condições extremas de estresse causadas por metais pesados, podem afetar os eventos no sistema tilacóide, além do conteúdo de clorofila (Mocquot *et al.*, 1996; Pääsikkä *et al.*, 2002) e as reações de fixação do carbono (Angelov *et al.*, 1993), interferindo na eficiência da fotossíntese e inativando o FS_{II} e a cadeia de transporte de elétrons que daria origem ao ATP e NADPH₂ (Krause & Weis, 1991; Krupa *et al.*, 1993). Deste modo podem-se aplicar os sinais de fluorescência emitidos pela clorofila *a in vivo*, como forma de contribuir para desvendar e monitorar os efeitos de estresses ambientais na fotossíntese (Andrews *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003).

Os principais parâmetros observados nas medições da fluorescência da clorofila *a* são: fluorescência mínima (F₀), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v), rendimento quântico máximo do FS_{II} (F_v/F_m), quenching fotoquímico (q_P) e quenching não-fotoquímico (q_N).

O F₀ representa a fluorescência com todos os centros de reação “abertos” e refere-se à emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* do complexo coletor de luz do FS_{II} (Krause & Weiss, 1991). O F_m indica o momento da completa redução da quinona A (Q_A) a partir da incidência de um pulso de luz saturante. A diferença entre F_m e F₀ resulta na fluorescência variável (F_v). Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão F_v/F_m deve variar entre 0,75 e 0,85, e a queda nesta razão reflete a presença de dano no centro de reação do FS_{II}

(Björkman & Demming, 1987; Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). O *quenching* fotoquímico (q_P) indica a proporção dos centros de reação do FS_{II} que estão abertos, enquanto o *quenching* não-fotoquímico (q_N) refere-se ao nível de fluorescência máxima (F_m) no qual a eficiência fotoquímica está no máximo e a dissipação térmica está no mínimo (Maxwell & Johnson, 2000).

De acordo com Hendry & Price (1993), variações na taxa total de clorofila e de carotenóides são bons indicadores de estresse em plantas superiores. Mishra *et al.* (2007) verificaram que plantas de aguapé intoxicadas com Cd diminuíram o conteúdo de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais com o aumento das concentrações de Cd. Porter & Sheridan (1981) documentaram a diminuição do conteúdo de clorofila e a queda na taxa de fotossíntese como sintomas da toxicidade por Zn em alfafa (*Medicago sativa*). Eleferiou & Karataglis (1989) observaram que o excesso de Cu promove a redução da concentração de clorofila e modificações ultraestruturais nos cloroplastos de folhas de trigo.

1.6. Anatomia e Ultraestrutura

Aliados aos dados de fluorescência e quantificação de pigmentos, estudos anatômicos e ultraestruturais podem ser empregados como parte das investigações das alterações causadas por metais pesados em plantas. Vitória *et al.* (2004), em experimentos realizados com plântulas de rabanetes submetidas a estresse por Cd, observaram uma proliferação das células do câmbio vascular da radícula com 24 horas de exposição a 0,5 mM de $CdCl_2$. Após 72 horas, sob mesma concentração, houve uma intensa proliferação celular e perda da organização das células da região do câmbio. Quando a concentração de $CdCl_2$ foi aumentada (1 mM), foi observado por estes mesmos autores mais camadas de células corticais. Também foi constatado um aumento de pêlos radiculares nas plântulas de rabanete expostas ao $CdCl_2$. Ainda de acordo com Vitória *et al.* (2004), no mesofilo das folhas de plântulas de rabanete tratadas com $CdCl_2$ (1 mM/24h), foi observado que o formato dos cloroplastos se apresentavam de forma alterada e as paredes celulares se apresentavam mais finas que o controle. Em microscopia eletrônica de varredura as células da epiderme das plântulas de rabanete expostas ao $CdCl_2$ (1 mM/48h) se apresentavam plasmolisadas e os estômatos fechados em relação ao controle (Vitória *et al.*, 2004).

Mahmood *et al.* (2005), estudando a anatomia de aguapé submetida a estresse por despejos de uma indústria têxtil, observaram que houve uma significativa redução do crescimento e tamanho das células das plantas, supostamente devido às condições estressantes do meio, por este conter metais pesados e outros materiais tóxicos. Foram observados também uma grande quantidade de cristais de ráfide (oxalato de cálcio) acumulados no parênquima das células das raízes, rizoma, pecíolo e folhas. O papel dos cristais de oxalato de cálcio também foi estudado por Mazen & Maghraby (1998) em um experimento que avaliou a tolerância de plantas de aguapé aos seguintes metais: Cd, Pb e Sr. Os resultados mostraram que estes metais podem ser complexados nos cristais, impedindo que um dano maior seja causado às plantas.

Algumas modificações ultraestruturais também podem ser observadas em plantas submetidas a estresse por metais pesados, tais como: condensação do citoplasma devido ao aumento da densidade da matriz, redução das cristas mitocondriais, aumento dos vacúolos, plasmólise severa, alta condensação de cromatina (Liu & Kottoke, 2004), rompimento do envelope nuclear, plasmalema e membrana mitocondrial (Stoyanova & Chakalova, 1990), e desorganização da estrutura dos cloroplastos (Molas, 2002). Vitória *et al.* (2006) verificaram que plantas de rabanete crescidas em 0,25 ou 1mM de CdCl₂ exibiam alterações nas suas organelas. Observou-se também a desorganização dos tilacóides e estroma quando comparadas com as plantas controle, que exibiram cloroplastos com formato elíptico e arranjo típico dos grana e estroma. Entretanto, algumas plantas podem ser tolerantes e acumular metais pesados em seus tecidos.

No RPS vários estudos vêm sendo desenvolvidos pelos pesquisadores do LCA (Laboratório de Ciências Ambientais – UENF) quanto a análises de sedimentos, material particulado em suspensão (MPS) e ecotoxicologia (contaminações em fígado e músculo de peixes). Entretanto, estudos que avaliam os efeitos da poluição na vegetação ainda são incipientes. Apesar da existência de trabalhos relacionando aguapé a poluentes ambientais, a maioria dos estudos é conduzida em laboratório e visa principalmente avaliar a capacidade de acumulação de metais pesados nesta espécie. É indiscutível a contribuição de tais estudos. Porém, são necessárias avaliações sobre as condições fotossintéticas e celulares destas plantas em condições naturais. Além disso, o RPS, por sua importante função sócio-econômica e pela antropização que sofre, representa um importante sistema a ser estudado.

Desta forma, este estudo contribui com informações ecofisiológicas, anatômicas e ultraestruturais de aguapé em condições naturais no RPS e rio Imbé. Estas informações poderão auxiliar na compreensão da situação atual dos rios, assim como poderão dar indicativos de situações de risco para a biota associada, haja vista que esta pode acumular metais pesados em seus tecidos e estes, tornarem-se uma via importante desses elementos na cadeia alimentar.

2. HIPÓTESES DE TRABALHO

- 1- Plantas de aguapé que se desenvolvem em regiões sujeitas a descargas de diferentes poluentes ambientais ao longo do RPS (baixo, médio e alto RPS) apresentam estresse quanto ao seu rendimento fotossintético (ecofisiologia) quando comparadas com as do rio Imbé (controle);
- 2- O efeito dos poluentes ao longo do RPS (baixo, médio e alto RPS) promove alterações anatômicas e ultraestruturais nas plantas de aguapé comparado ao rio Imbé;
- 3- Alterações anatômicas e ultraestruturais nos cloroplastos se refletem na diminuição da eficiência fotoquímica em aguapé ou vice-versa;
- 4- Há efeito temporal e espacial no rendimento fotossintético nesta espécie.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente estudo foram investigar as respostas ecofisiológicas, modificações anatômicas e ultraestruturais em plantas de aguapé provenientes de ambientes sujeitos a descargas de diferentes contaminantes ambientais (baixo, médio e alto RPS), quando comparadas às amostras procedentes de um ambiente com menor aporte de material antropogênico (do rio Imbé).

Os objetivos específicos foram:

- 1) Determinar os parâmetros físico-químicos da água dos diferentes ambientes de estudo;
- 2) Determinar as variações ecofisiológicas (emissão de fluorescência da clorofila *a* e concentração dos pigmentos fotossintéticos) em plantas de aguapé do baixo, médio e alto RPS nos períodos seco e chuvoso durante 2 anos;
- 3) Verificar possíveis alterações anatômicas de tecidos da folha foliar, pecíolo e da raiz (zona de absorção) e ultraestruturais do limbo foliar em plantas de aguapé, no estágio fenológico jovem, provenientes do baixo, médio e alto RPS, quando comparadas ao rio Imbé nos períodos seco e chuvoso durante 2 anos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

O presente estudo foi conduzido em quatro pontos: rio Imbé (21°47.75"S; 41°33.37"W - município de Campos dos Goytacazes - RJ); baixo RPS (21°45.28"S; 41°19.34"W - município de Campos dos Goytacazes - RJ); médio RPS (22°28.93"S; 44°04.70"W - município de Volta Redonda - RJ) e alto RPS (23°11.22"S; 45°55.49"W - município de São Jose dos Campos - SP) (Fig. 3).

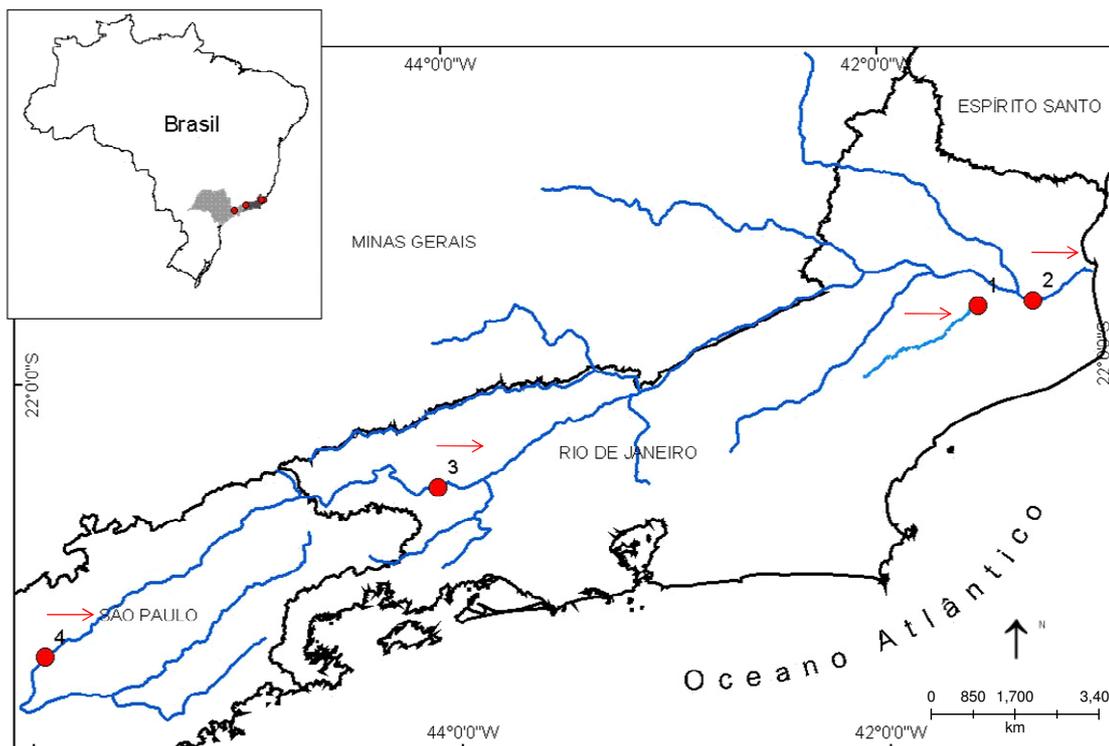


Figura 3. Pontos de coleta: 1- rio Imbé, ponto controle, localizado em Campos dos Goytacazes (RJ), 2- Baixo RPS - Campos dos Goytacazes (RJ), 3- Médio RPS - Volta Redonda (RJ), 4- Alto RPS - São José dos Campos (SP). Seta = sentido do fluxo dos rios.

O rio Imbé se situa às margens da serra do Imbé e seu entorno é ocupado por vegetação ciliar e áreas de criação de gado em pequena escala. O aporte de esgoto doméstico é muito reduzido se comparado as demais regiões. O ponto de coleta foi próximo a foz da Lagoa de Cima (Fig. 4).

O município de Campos dos Goytacazes possui área total de 4.032 km² e seu principal acesso é pela BR-101. Apresenta uma população em torno de 426.000 habitantes e densidade populacional de 105 hab./km² (IBGE, 2006). Sua atividade industrial é reduzida, tendo como destaque as indústrias de açúcar e de álcool (Bizerril *et al.*, 1998). Ao longo de sua costa, no Oceano Atlântico, há um forte pólo de exploração de petróleo e gás natural, na plataforma continental, pela Petrobras. O local de coleta das plantas de aguapé no baixo RPS foi na região central do município (Fig. 5). Pequenas indústrias, residências e um tráfico intenso de veículos compõem esse trecho do RPS.



Figura 4. Local de coleta no rio Imbé (retângulo). A seta indica o sentido do fluxo do rio.



Figura 5. Local de coleta na porção do baixo RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.

Conhecida como a "Cidade do Aço", Volta Redonda apresenta sua economia baseada principalmente na indústria, com destaque para a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), a maior siderúrgica da América Latina. Apresenta uma população de aproximadamente 255.000 habitantes e densidade populacional de 1.404 hab./km². Volta Redonda é hoje a maior cidade da região Sul Fluminense e a terceira

maior do interior do estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2006). O local onde foram realizadas as coletas se situa no bairro Volta Grande III (Fig. 6). O acesso ao rio se deu por uma horta cultivada por aposentados da CSN, as margens do RPS. O seu entorno é margeado por bairros residenciais e uma área de descarte de rejeitos da CSN.

A cidade de São José dos Campos é um importante tecnopólo de material bélico, metalúrgico e sede do maior complexo aeroespacial da América Latina. Importantes multinacionais e centros de ensino e pesquisas também estão instalados nesta cidade. Sua população é de aproximadamente 595.000 habitantes, apresentando uma densidade populacional de 540 hab./km². São José dos Campos é a sétima maior cidade do estado de São Paulo e 30^a do Brasil (IBGE, 2006). O local onde foram realizadas as coletas se situa no bairro Urbanova I próximo a uma vila de pescadores (Fig. 7). Seu entorno é margeado por bairros residenciais, campos de golfe, futebol e uma universidade privada.



Figura 6. Local de coleta na porção do médio RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.



Figura 7. Local de coleta na porção do alto RPS. A seta indica o sentido do fluxo do rio.

4.2. Coleta do Material Vegetal e Dados Físico-Químicos

A macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) foi coletada no final dos períodos seco (setembro/outubro) e chuvoso (março) por dois anos (1ª coleta - seco 2005; 2ª coleta - chuvoso 2006; 3ª coleta - seco 2006 e 4ª coleta - chuvoso 2007) em quatro ambientes distintos: 1) no rio Imbé (Campos dos Goytacazes – RJ), considerado o controle por apresentar menor aporte antropogênico; 2) a região do baixo RPS (Campos dos Goytacazes – RJ); 3) médio RPS (Volta Redonda – RJ) e 4) alto RPS (São José dos Campos – SP) (Fig. 3).

Para a coleta das plantas foi utilizado canoa ou barco (dependendo da região de coleta). As plantas foram acondicionadas em bacias com água do próprio rio ainda na embarcação e posteriormente, na margem do rio, foram efetuadas as tomadas dos dados na planta. No local delimitado para a coleta foi montado um laboratório de campo onde foram obtidos os seguintes dados físico-químicos: temperatura ambiente (°C), temperatura da água (°C), oxigênio dissolvido na água (mg/L) (Oxímetro - Horiba), condutividade elétrica da água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ - Condutivímetro - WTW), pH da água (pHmetro Instrutherm pH -720). Amostras de água do rio foram coletadas em duas garrafas de 2 litros nos mesmos locais onde as plantas de aguapé foram coletadas. Estas foram armazenadas ainda no campo em caixa de isopor com gelo durante o transporte ao laboratório, onde então foram analisadas

quanto à alcalinidade (Mettler DL 21 - Titrator) e o material particulado em suspensão (MPS) foi determinado e expresso em g (Balança analítica - Sartorius Basic).

4.3. Fluorescência da Clorofila *a* e Concentração dos Pigmentos Fotossintéticos

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas no campo entre 8h30min – 9h30min utilizando-se um fluorímetro modulado portátil (MINI-PAM - Walz, Alemanha). As medições foram feitas após 30 minutos de adaptação (com auxílio de pinças) das folhas (intactas e completamente expandidas, n=10) ao escuro e posteriormente expostas a uma luz vermelha modulada de baixa intensidade (aproximadamente $6 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ no comprimento de 660 nm) seguida de um pulso de 0,8 segundos de luz actínica saturante ($10\ 000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), adaptado de Genty *et al.* (1989) e van Kooten & Snel (1990).

Foram registrados e submetidos à análise os seguintes parâmetros da emissão de fluorescência: F_0 (fluorescência mínima), F_m (fluorescência máxima), F_v (fluorescência variável), F_v/F_m (rendimento quântico potencial do fotossistema II), q_p (dissipação fotoquímica), q_N (dissipação não-fotoquímica) e NPQ (dissipação não-fotoquímica). Na figura 8 é possível verificar as principais variáveis utilizadas na determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

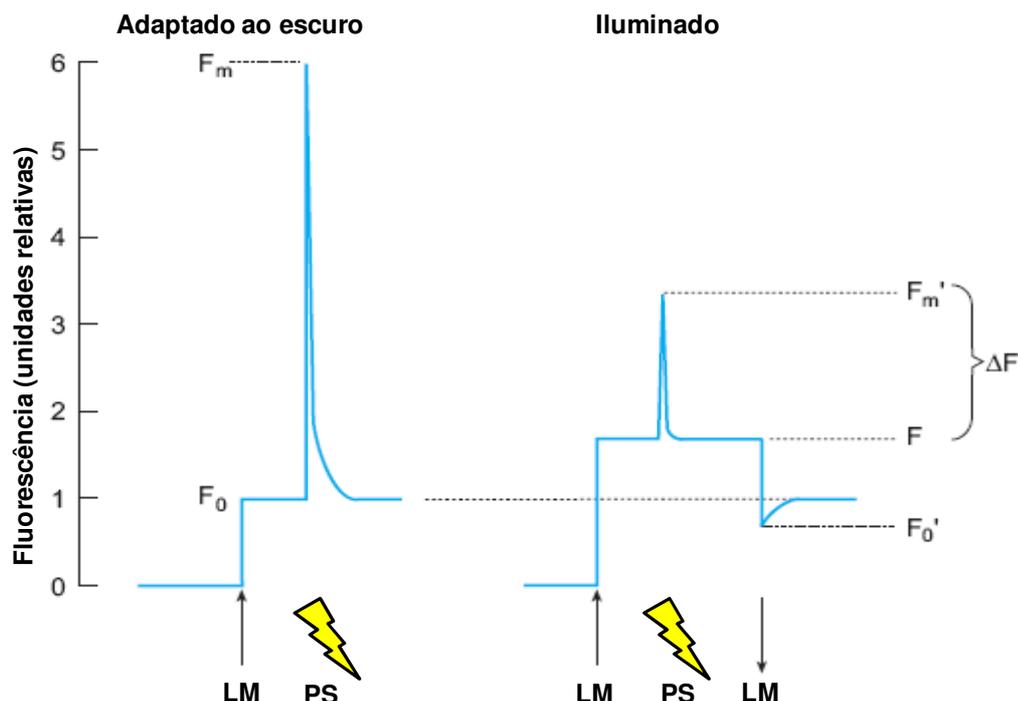


Figura 8. Nomenclatura usada para caracterizar os principais parâmetros da fluorescência da clorofila *a*; LM = luz modulada e PS = pulso saturante (adaptado de Schreiber *et al.*, 1994).

O rendimento quântico potencial do fotossistema II (FS_{II}) foi determinado e calculado após 30 minutos de adaptação das folhas ao escuro, como $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, onde F_0 é a fluorescência mínima, excitada pela luz vermelha modulada de baixa intensidade, e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação do pulso de luz actínica saturante. No modelo MINI-PAM (Walz, Alemanha), estes coeficientes de dissipação são assim expressos:

$$q_P = (F'_m - F)/(F'_m - F_0)$$

$$\text{Se } q_N = 1 - q_P$$

$$q_N = (F_m - F'_m)/(F_m - F_0)$$

Onde:

F é a fluorescência monitorada pelo aparelho;

F'_m é a fluorescência máxima (adaptado a luz)

O coeficiente de dissipação não-fotoquímica de Stern-Volmer foi calculado pelo aparelho como $NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$ (Bilger e Björkman, 1990), neste não é incluído o parâmetro F'_0 (fluorescência mínima - adaptada a luz) para a realização do cálculo.

A taxa variável da fluorescência representada por F_v/F_0 foi calculada posteriormente ($F_v/F_0 = F_v/F'_m/[1 - F_v/F_m]$).

No terço médio das mesmas folhas utilizadas para a realização das medidas de emissão da fluorescência da clorofila *a* foram retirados dois discos (0,95 cm² de área total) para determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos, utilizando o método de extração com o solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO) como proposto por Hiscox & Israelstam (1979). Os discos foliares foram fatiados em pequenos pedaços, colocados em tubos plásticos com rosca de capacidade para 15 mL contendo 5,0 mL de DMSO. Os mesmos foram transportados em caixa abrigados da luz, para o Laboratório (LCA)

Após 5 dias em contato com os discos foliares, uma alíquota de 1,0 mL do DMSO foi submetida a leitura em um espectrofotômetro (UV-160A ; UV – Visible Recording Spectrophotometer – Shimadzu - LCA), nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm (Wellburn, 1994). Os valores obtidos nas leituras foram utilizados para a determinação do conteúdo dos pigmentos.

Foram utilizadas as seguintes equações, de acordo com o proposto por Wellburn (1994):

$$[\text{Clorofila } a] (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 12,19A_{665} - 3,45A_{649}$$

$$[\text{Clorofila } b] (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 21,99A_{649} - 5,32A_{665}$$

$$[\text{Carotenóides}] (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (1000A_{480} - 2,14 [\text{Clorofila } a] - 70,16 [\text{Clorofila } b])/220$$

$$[\text{Clorofila } a] / [\text{Clorofila } b]$$

$$[\text{Clorofilas totais}] / [\text{Carotenóides}]$$

Todo o procedimento de leitura em laboratório foi realizado em ambiente com baixa luminosidade. A concentração dos pigmentos foi convertida em $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ como proposto por Hendry & Price (1993). Os dados de pigmentos são referentes às seguintes coletas: 2^a (chuvoso 2006); 3^a (seco 2006) e 4^a (chuvoso 2007). Problemas logísticos impossibilitaram a determinação das concentrações dos pigmentos fotossintéticos referentes à 1^a coleta (período seco de 2005).

4.4. Microscopia

4.4.1. Pré-fixação, Fixação e Desidratação

Fragmentos de lâmina foliar (3 mm x 5 mm), pecíolo (2 mm x 3 mm) e zona de absorção da raiz (7 mm de comprimento) foram coletadas em triplicata e pré-fixadas ainda no campo em temperatura ambiente, em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão cacodilato 0,05 M em pH 7,2. O material foi trazido ao laboratório (LBCT) onde as amostras foram lavadas três vezes no mesmo tampão e o material foi pós-fixado por 1 h em uma solução de tetróxido de ósmio 1 % com tampão cacodilato 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após três lavagens de 45 min no mesmo tampão procedeu-se a série crescente de desidratação com acetona: 50 %, 70 %, 90 %, 100 % e duas vezes em acetona super seca 100 %, por 1 h cada etapa (Bozzola & Russel, 1992).

4.4.2. Infiltração e Inclusão do Material

Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à etapa de infiltração na qual a acetona foi substituída gradualmente pela resina epóxi (Epon 812). As amostras em resina pura foram colocadas em formas e levadas à estufa (60° C) por 48 horas para a polimerização e obtenção dos blocos (Bozzola & Russel, 1992).

4.4.3. Microscopia Óptica

Com um ultramicrotomo (Reichert Ultracut S) foram retirados cortes semifinos com aproximadamente 0,7 µm de espessura, com auxílio de faca de diamante, no sentido transversal. As seções foram coradas com azul de toluidina 1,0 % por 1 minuto. As lâminas foram seladas com Entelan® e observadas em microscopia de campo claro (Axioplan ZEISS).

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a infiltração e inclusão do material descritas no item 4.4.2, foram retirados cortes ultrafinos (70 – 90nm) em ultramicrotomo Reichert, com auxílio de faca de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh*.

A contrastação de rotina foi realizada com acetato de uranila 5,0 % por 20 min e solução de citrato de chumbo por 5 min em temperatura ambiente. O material foi

observado e fotografado com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão ZEISS – TEM 900, a uma aceleração de voltagem de 80 KV.

4.5. Análise Estatística

Primeiramente, foi feita uma análise descritiva (média e erro padrão) dos dados referentes à fluorescência da clorofila *a* e às concentrações dos pigmentos fotossintéticos. A normalidade e homogeneidade das amostras foram testadas.

Para os dados de fluorescência da clorofila *a* (F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , F_v/F_0 , q_P , q_N e NPQ) foi realizada uma ANOVA multifatorial onde se avaliou os efeitos isolados dos fatores: local (rio Imbé, baixo RPS, médio RPS e alto RPS), período de coleta (seco e chuvoso) e ano de estudo (1º e 2º ano), além das interações entre fatores através do teste F e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (Zar, 1996).

Os dados analisados para as concentrações de pigmentos fotossintéticos foram submetidos à ANOVA *two-way* e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para detectar diferenças entre os locais (rio Imbé, baixo RPS, médio RPS e alto RPS) e períodos (seco e chuvoso).

Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros NPQ: [Caro] (Carotenóides) para os períodos: chuvoso/2006, seco/2006 e chuvoso/2007. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Toda a análise estatística e confecção dos gráficos foram realizadas através do programa Statistica 6.0.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Físico-Químicos

A tabela 1 mostra as variações nos parâmetros físico-químicos nos locais de coleta durante os dois anos de avaliações. Para a grande maioria dos parâmetros o padrão se manteve em função do período para os dois anos. Como exemplo, é possível citar as temperaturas do ar e da água, que em geral estiveram mais elevadas no período chuvoso. A máxima temperatura do ar obtida foi de 32,6°C no baixo RPS no período chuvoso de 2007 e a mínima (20,4°C) no período seco de 2005 no rio Imbé.

A condutividade elétrica e pH em geral foram maiores nos períodos secos, apesar de existirem exceções. Em relação à condutividade da água, observou-se

uma ampla variação entre os locais e períodos estudados, sendo o menor valor encontrado no período chuvoso de 2006 no rio Imbé ($21,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$) e o maior no período seco de 2005 no alto RPS ($151,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$). É importante ressaltar que no RPS a condutividade elétrica sempre foi em média três vezes superior ao valor da condutividade para o rio Imbé.

Assim como observado na condutividade elétrica, as variações de pH também indicaram um menor valor no rio Imbé (variando entre 6,53 e 5,59) quando em comparação com RPS, cuja variação obtida foi de 6,32 (alto RPS) a 7,76 (baixo RPS). Apesar de alguns valores de pH superior a 7,0, a grande maioria dos valores de pH mostrou-se levemente ácido.

Para o parâmetro oxigênio dissolvido não foi possível observar um padrão de comportamento em função da época de coleta, apesar das variações não terem sido tão acentuadas entre os locais e períodos de coleta. A máxima variação esteve entre $3,93 \text{ mg.L}^{-1}$ (alto RPS no período chuvoso de 2007) e $11,80 \text{ mg.L}^{-1}$ (médio RPS no período chuvoso de 2006). Quando se compara o oxigênio dissolvido no alto e médio RPS nos períodos chuvosos de 2006 e 2007, observa-se que no ano de 2006 os valores estiveram mais elevados.

A alcalinidade foi maior no período seco do primeiro ano de coleta e no período chuvoso do segundo ano. O rio Imbé apresentou valores cerca de 4 vezes menores de alcalinidade do que os pontos de coleta no RPS.

Para o MPS foi encontrado um comportamento inverso ao observado para alcalinidade; os maiores valores no primeiro ano de coleta foram no período chuvoso e no segundo ano, no período seco. O MPS teve seu valor máximo evidenciado no médio RPS no período chuvoso de 2006 ($50,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e o mínimo no rio Imbé no período chuvoso de 2007 ($6,9 \text{ mg.L}^{-1}$).

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos ambientais e da água para o rio Imbé e três pontos do rio Paraíba do Sul (baixo, médio e alto) no final do período seco (setembro/outubro) de 2005 e 2006 e no final do período chuvoso (março) de 2006 e 2007. MPS – Material Particulado em Suspensão, RPS – rio Paraíba do Sul.

		rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
Parâmetros físico-químicos		período seco 2005	período chuvoso 2006						
1º ano de coleta	Temperatura do ar (°C)	23,0	28,1	20,4	31,5	24,3	30,0	21,0	31,2
	Temperatura da água (°C)	20,4	26,1	22,8	29,6	25,4	27,7	22,5	27,6
	Condutividade elétrica da água ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	27,4	21,5	76,0	53,4	102,0	126,4	151,0	120,3
	pH da água	6,25	5,59	7,76	7,00	6,86	6,84	6,72	6,47
	Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	5,74	4,82	6,87	5,53	5,40	11,80	5,40	11,60
	Alcalinidade (mEq.L^{-1})	0,108	0,082	0,407	0,337	0,395	0,349	0,544	0,411
	Concentração de MPS (mg.L^{-1})	8,8	22,0	13,2	38,0	11,6	50,0	7,2	29,0
		rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
Parâmetros físico-químicos		período seco 2006	período chuvoso 2007						
2º ano de coleta	Temperatura do ar (°C)	24,8	32,6	26,0	25,0	23,0	25,9	21,0	22,0
	Temperatura da água (°C)	22,5	33,4	24,0	25,0	23,0	25,0	21,8	22,0
	Condutividade elétrica da água ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	28,5	23,0	86,3	50,5	81,0	57,2	98,0	103,0
	pH da água	6,30	6,53	7,10	6,46	6,40	7,02	6,32	6,95
	Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1})	6,50	7,72	6,55	6,20	4,60	5,69	4,50	3,93
	Alcalinidade (mEq.L^{-1})	0,071	0,161	0,372	0,427	0,240	0,348	0,299	0,475
	Concentração de MPS (mg.L^{-1})	26,6	6,9	8,5	36,0	32,0	8,3	30,9	15,8

5.2. Parâmetros da Fluorescência da Clorofila *a* e Pigmentos Fotossintéticos

Os resultados da ANOVA Multifatorial (Tab. 2) indicaram que os parâmetros F_0 , F_m , F_v , q_N e NPQ da fluorescência da clorofila *a* exibiram interação entre os fatores ano e local e entre os fatores período e local (exceto F_v). Quanto as razões F_v/F_m e F_v/F_0 , estas foram as únicas onde se encontrou interação entre os três fatores estudados (ano x período x local).

A tabela 3 apresenta as médias encontradas para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Considerando todo o período de estudo, os valores de F_0 variaram de 212 a 318; F_m de 979 a 1.736; F_v de 760 a 1.418; F_v/F_m de 0,77 a 0,84; F_v/F_0 de 3,46 a 5,39. Para q_N de 0,019 a 0,036 e NPQ de 0,025 a 0,045 (Apêndice 1). Em linhas gerais, no primeiro ano de coleta não houve diferenças significativas entre os diversos locais para os dois períodos de coleta (exceto NPQ – Fig. 9 A). Entretanto, no segundo ano de coleta, de forma geral, os parâmetros F_m , F_v , F_v/F_m e F_v/F_0 exibiram valores mais elevados no alto e médio RPS.

Os parâmetros NPQ e q_N foram superiores no alto RPS durante o período seco do segundo ano de estudo (Fig. 10 A e B). No período chuvoso, q_N foi inferior para o baixo RPS, enquanto que NPQ não diferiu entre os pontos de coleta (Fig. 10 E e D). De modo geral os valores de F_0 no segundo ano foram inferiores no alto RPS.

Em geral, não houve variação temporal para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* no primeiro ano de coleta. No segundo ano, o baixo RPS exibiu maiores valores de F_v , F_v/F_m , F_v/F_0 no período chuvoso (Tab. 3). O rio Imbé apresentou valores mais elevados de q_N no período chuvoso (Fig. 10 E) e o médio RPS exibiu maior média de F_0 no período seco (Tab. 3).

Quando se comparou o mesmo período entre os dois anos de coleta para cada local (ex.: período seco 2005 x período seco 2006) não se constatou diferenças significativas para F_v/F_m , q_N , e NPQ (Tab. 3 e Apênd. 1). Os parâmetros F_0 , F_m e F_v , por sua vez, mostraram maiores valores no segundo ano, tanto para o período seco quanto para o chuvoso em todos os locais. Com relação ao parâmetro F_v/F_0 , observou-se maiores médias no período chuvoso do segundo ano de coleta para o médio e alto RPS, assim como no período seco para o alto RPS (Tab. 3).

Tabela 2. Resultados da ANOVA multifatorial (* $p \leq 0,05$) realizada para os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS). IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; F_0 = fluorescência inicial; F_m = fluorescência máxima; F_v = fluorescência variável; F_v/F_m = rendimento quântico potencial do FS_{II}; F_v/F_0 = taxa variável de rendimento; q_N = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica.

Efeito	F_0		F_m		F_v		F_v/F_m		F_v/F_0		q_N		NPQ	
	F	p	F	P	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Ano (05/06 x 06/07)	341,21	≤ 0,05*	781,15	≤ 0,05*	547,26	≤ 0,05*	15,2	≤ 0,05*	23,88	≤ 0,05*	1,516	0,220	0,653	0,420
Período (Seco x Chuvoso)	20,26	≤ 0,05*	0,02	0,885	1,35	0,248	13,4	≤ 0,05*	15,989	≤ 0,05*	0,887	0,348	0,025	0,874
Local (IM, BP, MP e AP)	3,50	≤ 0,05*	42,43	≤ 0,05*	42,37	≤ 0,05*	22,0	≤ 0,05*	24,331	≤ 0,05*	5,720	≤ 0,05*	7,404	≤ 0,05*
Ano*Período	0,00	0,984	0,00	0,952	0,00	0,949	0,4	0,541	0,173	0,678	4,500	≤ 0,05*	0,486	0,487
Ano*Local	5,31	≤ 0,05*	4,22	≤ 0,05*	5,94	≤ 0,05*	4,8	≤ 0,05*	5,909	≤ 0,05*	5,387	≤ 0,05*	4,869	≤ 0,05*
Período*Local	6,95	≤ 0,05*	3,98	≤ 0,05*	2,37	0,074	1,3	0,264	1,702	0,169	7,993	≤ 0,05*	5,054	≤ 0,05*
Ano*Período*Local	1,76	0,157	1,90	0,133	2,59	0,056	4,2	≤ 0,05*	3,070	≤ 0,05*	0,557	0,644	0,101	0,959

Tabela 3. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (média \pm erro padrão) determinados em aguapé no rio Imbé e em três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2005 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (seco 2005 com seco 2006; e chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – multifatorial e teste de Tukey). F_0 = fluorescência inicial; F_m = fluorescência máxima; F_v = fluorescência variável; F_v/F_m = rendimento quântico potencial do FS_{II}; F_v/F_0 = taxa variável de rendimento. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso.

		Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>					
Local	Período	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	F_v/F_0	
1° ano de coleta	IB	SE/2005	218,6 \pm 5,33 AaZ	979,0 \pm 34,19 BaZ	760,0 \pm 29,81 AaZ	0,78 \pm 0,004 AaY	3,47 \pm 0,1 AaY
		CH/2006	219,7 \pm 3,95 AaZ	1060,8 \pm 19,31 AaZ	841,1 \pm 21,45 AaZ	0,79 \pm 0,006 AaY	3,85 \pm 0,2 AaY
	BP	SE/2005	222,0 \pm 5,13 AaZ	1053,6 \pm 27,00 ABaZ	831,6 \pm 23,41 AaZ	0,79 \pm 0,003 AaY	3,74 \pm 0,1 AaY
		CH/2006	224,4 \pm 6,71 AaZ	1062,4 \pm 20,55 AaZ	838,0 \pm 22,75 AaZ	0,79 \pm 0,008 AaY	3,78 \pm 0,2 AaY
	MP	SE/2005	252,8 \pm 7,47 AaZ	1181,8 \pm 47,39 AaZ	929,0 \pm 53,57 AaZ	0,78 \pm 0,014 AaY	3,71 \pm 0,3 AaY
		CH/2006	215,4 \pm 4,79 AaZ	1129,2 \pm 25,50 AaZ	913,8 \pm 23,15 AaZ	0,80 \pm 0,003 AaY	4,25 \pm 0,1 AaZ
AP	SE/2005	245,4 \pm 4,43 AaZ	1187,4 \pm 6,68 AaZ	942,0 \pm 3,91 AaZ	0,79 \pm 0,002 AaY	3,84 \pm 0,1 AaZ	
	CH/2006	212,0 \pm 7,00 AaZ	1154,6 \pm 24,45 AaZ	942,7 \pm 23,67 AaZ	0,82 \pm 0,006 AaY	4,49 \pm 0,2 AaZ	
2° ano de coleta	IB	SE/2006	291,7 \pm 10,50 ABaY	1398,9 \pm 35,08 BaY	1107,2 \pm 38,68 BaY	0,79 \pm 0,010 BCaY	3,86 \pm 0,2 BCaY
		CH/2007	308,20 \pm 4,40 AaY	1398,2 \pm 27,55 BaY	1090,0 \pm 28,26 CaY	0,77 \pm 0,006 BaY	3,55 \pm 0,1 CaY
	BP	SE/2006	320,8 \pm 6,56 AaY	1425,6 \pm 43,94 BaY	1104,8 \pm 44,39 BbY	0,77 \pm 0,008 CbY	3,46 \pm 0,2 CbY
		CH/2007	294,1 \pm 8,08 ABaY	1546,2 \pm 25,58 AaY	1252,1 \pm 26,63 BaY	0,81 \pm 0,005 AaY	4,29 \pm 0,2 BCaY
	MP	SE/2006	318,0 \pm 10,35 ABaY	1736,1 \pm 40,90 AaY	1418,0 \pm 38,91 AaY	0,82 \pm 0,006 ABaY	4,50 \pm 0,2 ABaY
		CH/2007	283,5 \pm 5,25 ABbY	1623,1 \pm 38,39 AaY	1339,6 \pm 42,10 ABaY	0,82 \pm 0,007 AaY	4,76 \pm 0,2 ABaY
	AP	SE/2006	286,4 \pm 8,47 BaY	1671,6 \pm 31,47 AaY	1385,2 \pm 27,84 AaY	0,83 \pm 0,004 AaY	4,86 \pm 0,1 AaY
		CH/2007	263,1 \pm 4,08 BaY	1678,1 \pm 13,76 AaY	1415,0 \pm 11,55 AaY	0,84 \pm 0,001 AaY	5,39 \pm 0,1 AaY

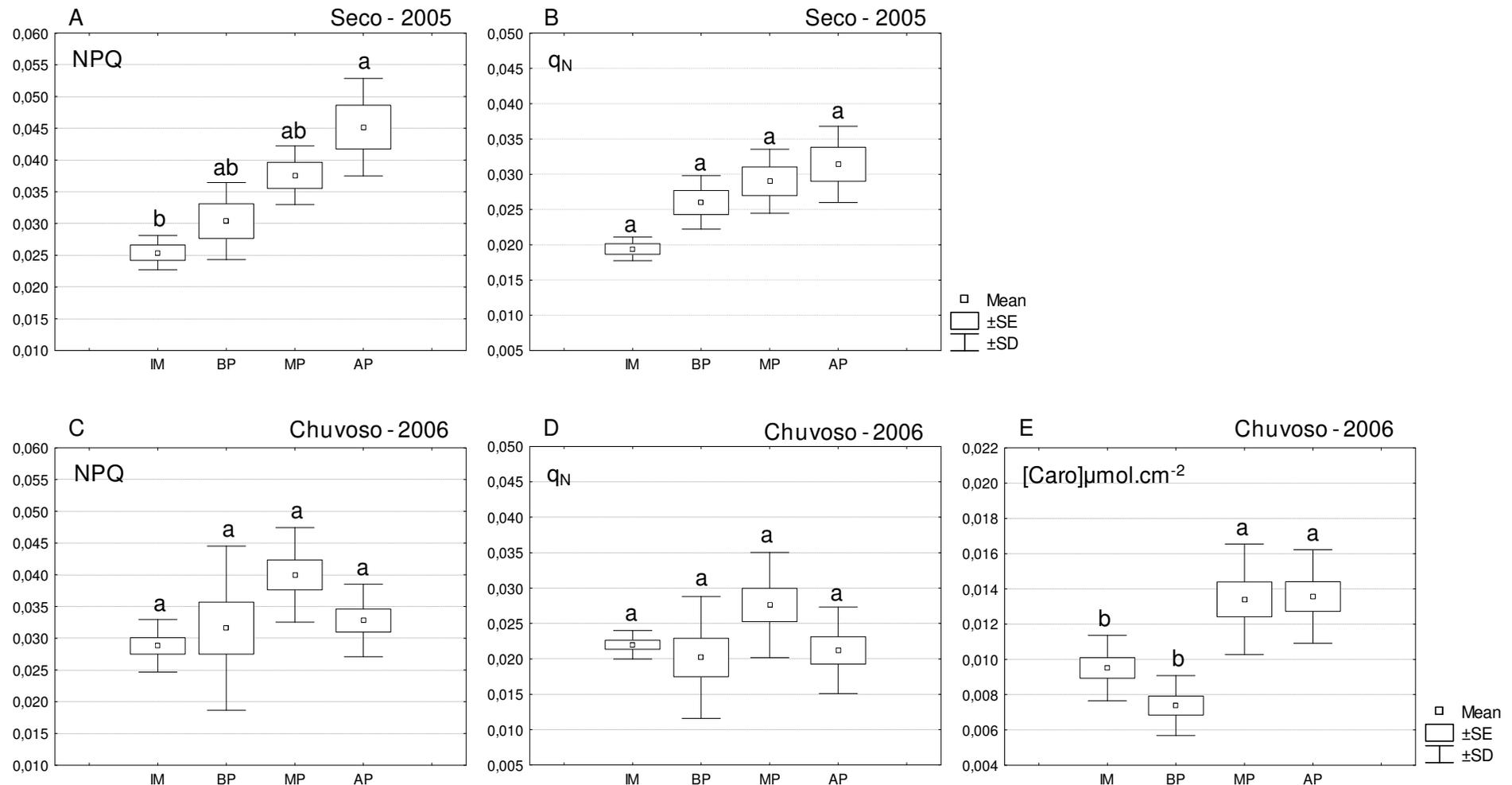


Figura 9 - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (NPQ e q_N) e concentração de carotenóides ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) período seco de 2005 e chuvoso de 2006. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica. Letras a, b e c comparação entre os locais de coleta. ANOVA Multifatorial e Tukey ($p \leq 0,05$) para NPQ e q_N e ANOVA *Two-way* e Tukey ($p \leq 0,05$) para carotenóides ($n=10$).

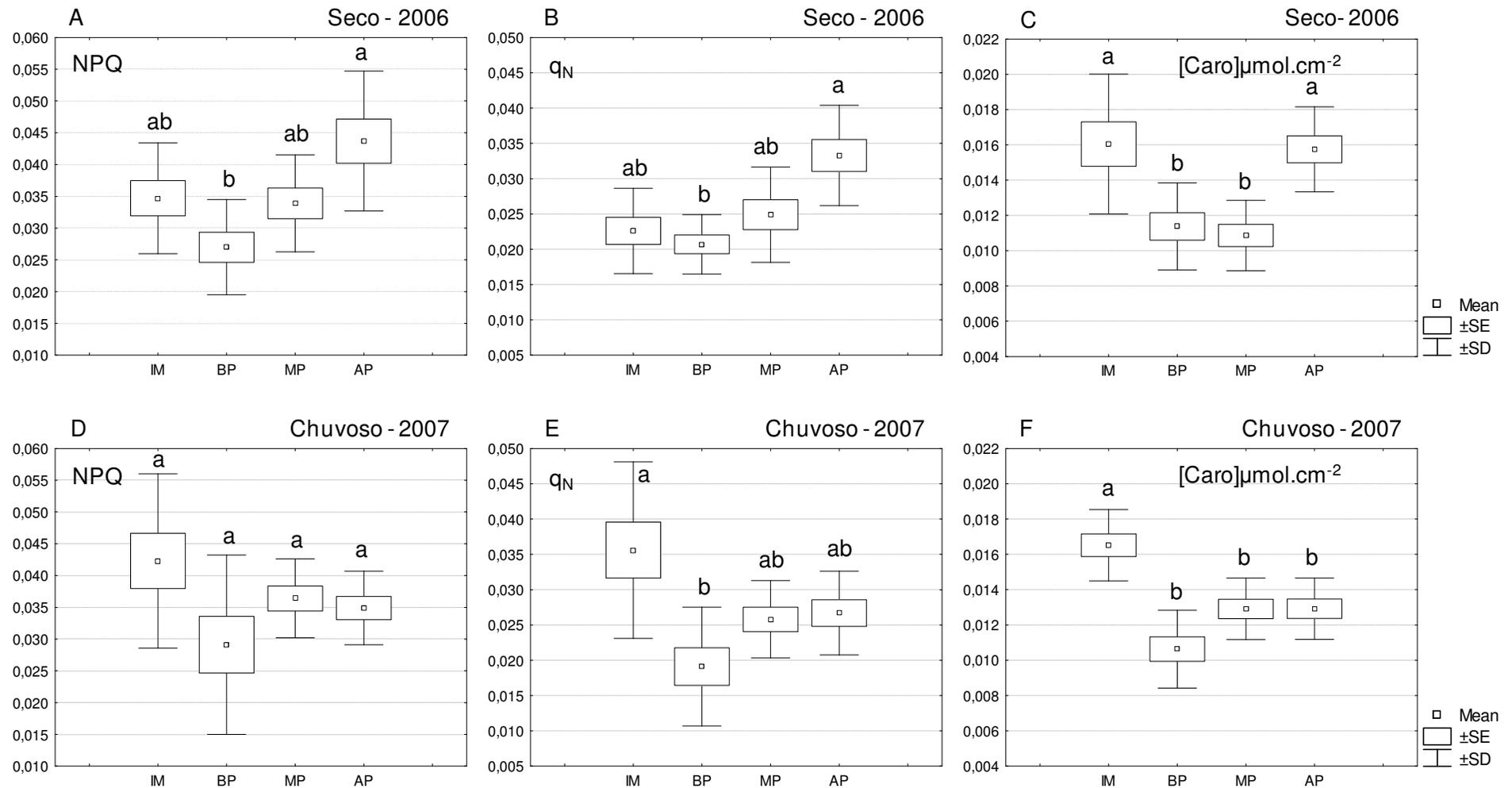


Figura 10 - Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (NPQ e q_N) e concentração de carotenóides ($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) período seco de 2006 e chuvoso de 2007. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica. Letras a, b e c comparação entre os locais de coleta. ANOVA Multifatorial e Tukey ($p \leq 0,05$) para NPQ e q_N e ANOVA *Two-way* e Tukey ($p \leq 0,05$) para carotenóides ($n=10$).

A tabela 4 apresenta os resultados da ANOVA *two-way* realizada para os parâmetros de pigmentos fotossintéticos analisados no segundo ano de coleta. Houve interação significativa dos fatores período e local para [Clo b], [Caro], clo a/b e Clo (a + b)/(caro). Verificou-se efeito isolado dos fatores período e local para [Clo a] e [Clo Totais].

As concentrações de pigmentos fotossintéticos determinados em aguapé e suas relações são apresentadas na tabela 5. Considerando todo o período de estudo, os valores de [Clo a] variaram de 0,020 a 0,048 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$, [Clo b] de 0,006 a 0,020 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$, clo a/b de 2,1 a 3,5, Clo (a + b)/(caro) de 3,3 a 4,8 e [Clo Totais] de 0,026 a 0,068 [Caro] de 0,007 a 0,016 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ (Apêndice 2).

No primeiro ano de coleta todos os parâmetros apresentaram maiores valores no alto e médio RPS, com exceção da razão Clo (a + b)/(caro) que não diferiu significativamente entre os diferentes ambientes. No segundo ano, os parâmetros [Clo a], [Clo b], [Caro] e [Clo Totais] exibiram maiores concentrações no rio Imbé e valores intermediários no alto RPS. Com relação à razão clo a/b, no período seco os valores foram mais elevados no médio e alto RPS e no período chuvoso os valores foram menores no baixo RPS. No período chuvoso, a razão Clo (a + b)/(caro) mostrou maiores e menores valores no alto RPS e rio Imbé, respectivamente. No período seco, os valores desta razão foram superiores no baixo RPS.

Não foi observada variação temporal para [Clo a], [Caro] (carotenóides – Apêndice 2) e [Clo Totais]. No rio Imbé e baixo RPS, verificaram-se maiores valores de [Clo b] e Clo (a + b)/(caro) no período seco. A razão clo a/b foi superior no período chuvoso no rio Imbé e baixo RPS. Quando se comparou o período chuvoso entre os dois anos de coleta constataram-se maiores valores de [Clo a], [Clo b], [Caro] e [Clo Totais] no segundo ano para o rio Imbé e baixo RPS. No baixo RPS, houve maior razão clo a/b no primeiro ano de coleta. Não se verificou diferença significativa para Clo (a + b)/(caro) entre os anos (Tab. 5).

Na figura 11 são mostrados os resultados da correlação de Pearson entre os parâmetros de dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ) e as concentrações de pigmentos carotenóides nos períodos: chuvoso/2006, seco/2006 e chuvoso/2007. Apenas a correlação entre NPQ e carotenóides durante o período seco/2006 não foi significativa ($p > 0,05$). Para as demais correlações os valores de r foram superiores a 0,40, com os maiores valores de correlação ocorrendo no período chuvoso do segundo ano de coleta ($r = 0,51$).

Tabela 4. Resultados da ANOVA *two-way* mostrando diferenças significativas ($*p \leq 0,05$) para as concentrações de pigmentos fotossintéticos determinados em aguapés provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) nos períodos: seco de 2006 e chuvoso de 2007. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS

Efeito	[Clo a] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$		[Clo b] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$		[Caro] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$		Clo a/b		Clo (a + b) (Caro)		[Clo Totais] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Período (Seco x Chuvoso)	5,158	$\leq 0,05^*$	28,041	$\leq 0,05^*$	0,231	0,632	71,34	$\leq 0,05^*$	33,716	$\leq 0,05^*$	10,763	$\leq 0,05^*$
Local (IM, BP, MP e AP)	10,888	$\leq 0,05^*$	9,468	$\leq 0,05^*$	19,661	$\leq 0,05^*$	28,83	$\leq 0,05^*$	12,014	$\leq 0,05^*$	10,108	$\leq 0,05^*$
Período*Local	1,842	0,147	4,741	$\leq 0,05^*$	3,623	$\leq 0,05^*$	9,80	$\leq 0,05^*$	8,928	$\leq 0,05^*$	2,582	0,059

Tabela 5. Concentrações de pigmentos fotossintéticos determinados em aguapé (média \pm erro padrão) provenientes do rio Imbé e três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2006 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – *one-way* (1º ano) e *two-way* (2º ano) e teste de Tukey). [Clo a] = clorofila a; [Clo b] = clorofila b; Clo a/b = relação clorofila a/b; Clo (a + b)/(Caro) = relação clorofila (a + b)/(Caro), [Clo Totais] = clorofilas totais; IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso.

		Concentração de Pigmentos Fotossintéticos					
1º ano de coleta	Local	Período	[Clo a] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$	[Clo b] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$	Clo a/b	Clo $\frac{(a+b)}{(Caro)}$	[Clo Totais] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$
		IB	CH/2006	0,025 \pm 0,002 BZ	0,008 \pm 0,001 BCZ	3,1 \pm 0,06 BY	3,4 \pm 0,10 AY
	BP	CH/2006	0,020 \pm 0,002 BZ	0,006 \pm 0,001 CZ	3,1 \pm 0,08 BY	3,6 \pm 0,12 AY	0,026 \pm 0,002 BZ
	MP	CH/2006	0,034 \pm 0,002 AY	0,009 \pm 0,001 ABY	3,5 \pm 0,05 AY	3,3 \pm 0,15 AY	0,043 \pm 0,003 AY
	AP	CH/2006	0,037 \pm 0,003 AY	0,011 \pm 0,001 AY	3,3 \pm 0,09 ABY	3,6 \pm 0,11 AY	0,048 \pm 0,003 AY
2º ano de coleta	Local	Período	[Clo a] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$	[Clo b] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$	Clo a/b	Clo $\frac{(a+b)}{(Caro)}$	[Clo Totais] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$
		IB	SE/2006	0,048 \pm 0,005 Aa	0,020 \pm 0,002 Aa	2,4 \pm 0,10 Bb	4,2 \pm 0,12 ABa
		CH/2007	0,041 \pm 0,001 AaY	0,013 \pm 0,001 AbY	3,2 \pm 0,02 AaY	3,3 \pm 0,07 BbY	0,054 \pm 0,002 AaY
	BP	SE/2006	0,036 \pm 0,002 BCa	0,017 \pm 0,002 ABa	2,1 \pm 0,10 Bb	4,8 \pm 0,19 Aa	0,053 \pm 0,003 ABa
		CH/2007	0,030 \pm 0,002AaY	0,011 \pm 0,001 AbY	2,9 \pm 0,04 BaZ	3,9 \pm 0,08 AbY	0,041 \pm 0,002 AaY
	MP	SE/2006	0,031 \pm 0,002 Ca	0,010 \pm 0,001 Ca	3,2 \pm 0,11 Aa	3,8 \pm 0,15 Ba	0,041 \pm 0,003 Ba
		CH/2007	0,034 \pm 0,001 AaY	0,011 \pm 0,001 AaY	3,3 \pm 0,04 AaY	3,5 \pm 0,12 ABaY	0,045 \pm 0,001 AaY
	AP	SE/2006	0,045 \pm 0,003ABa	0,016 \pm 0,002 ABa	2,9 \pm 0,10 Aa	3,8 \pm 0,13 Ba	0,061 \pm 0,004 Aa
		CH/2007	0,038 \pm 0,002AaY	0,012 \pm 0,001 AaY	3,1 \pm 0,06 ABaY	3,9 \pm 0,07 AaY	0,050 \pm 0,002 AaY

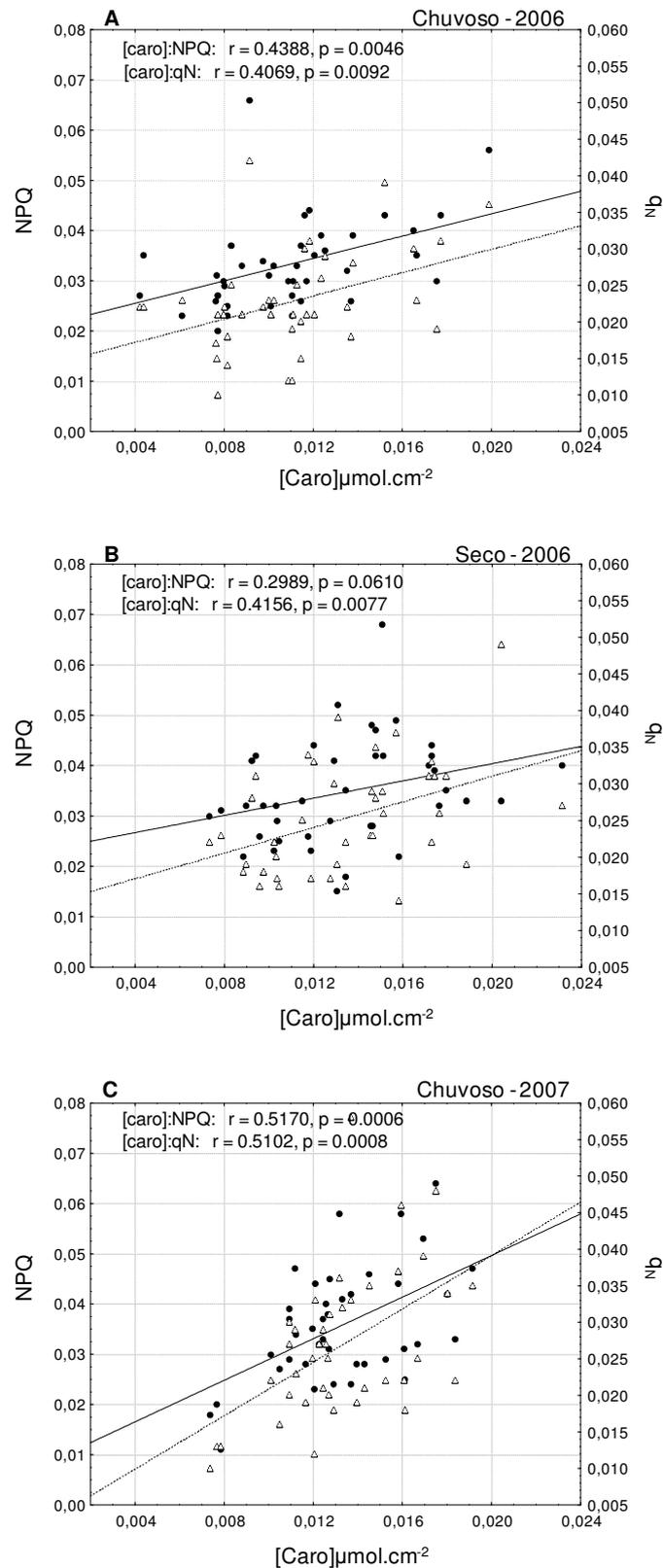


Figura 11. Correlação de Pearson entre os parâmetros NPQ: $[Caro] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ e q_N : $[Caro] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ determinados em aguapé provenientes do rio Imbé e de três pontos do rio Paraíba do Sul (RPS) para os períodos: (A) chuvoso/2006, (B) seco/2006 e (C) chuvoso/2007. NPQ = dissipação não-fotoquímica; q_N = dissipação não-fotoquímica e $[Caro] \mu\text{mol.cm}^{-2}$ = concentração de carotenóides. Valores significativos para $p \leq 0,05$ ($n=40$).

5.3. Análises Anatômicas e Ultraestruturais

5.3.1 – Microscopia Óptica (MO)

Observações ao microscópio óptico foram conduzidas em plantas de aguapé (limbo, pecíolo e raiz) provenientes de todas as quatro coletas durante o período de estudo. Abaixo são apresentados os resultados por ano de coleta (primeiro ano – períodos: seco de 2005 e chuvoso de 2006; e segundo ano de coleta – períodos: seco de 2006 e chuvoso de 2007).

5.3.1.1 Primeiro Ano de Coleta

As imagens mostraram que a epiderme adaxial da folha é unisseriada, com células retangulares constituídas de paredes delgadas (Fig. 12 e 13). Observou-se a presença de estômatos com câmara sub-estomática tanto na epiderme adaxial (Fig. 12 e 13) quanto na epiderme abaxial (Fig. 14 e 15), indicando que esta espécie é anfiestomática. O mesofilo de aguapé apresenta-se composto por feixes vasculares colaterais que são intercalados por regiões de parênquima lacunoso, com aerênquima (Fig. 12 e 13). No período seco de 2005 registrou-se maior turgidez das células do parênquima e localização periférica dos cloroplastos de plantas coletadas na porção do médio RPS (Fig. 12C, 14C). Entretanto, as células epidérmicas mantiveram a turgidez, independente do local de coleta. Na coleta seguinte (período chuvoso de 2006) as células parenquimáticas provenientes do médio RPS não apresentaram alterações morfológicas quanto à turgescência. O que pôde ser verificado foi um padrão similar de células levemente plasmolisadas em todas as amostras (Fig. 13C).

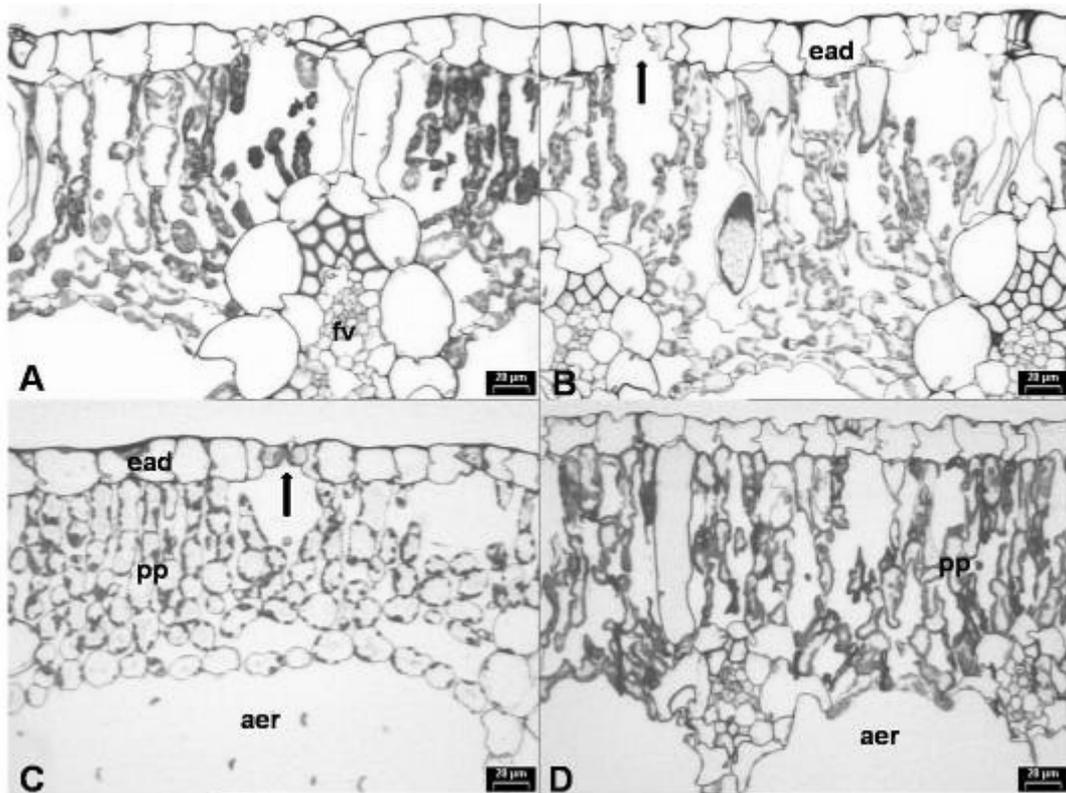


Figura 12 – Seção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

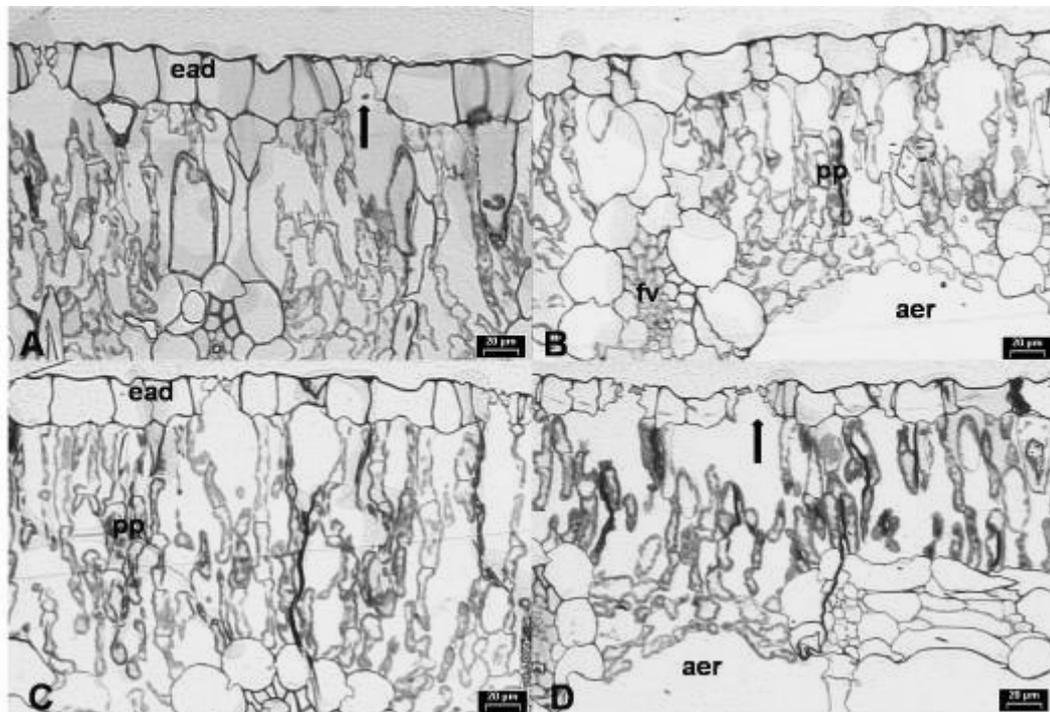


Figura 13 – Seção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

Da mesma forma que o limbo foliar, os pecíolos mostraram apenas uma camada de células epidérmicas (unisseriada) retangulares com parede celular delgada. Esta parte da folha não exibiu variações quanto à turgidez das células nos sistemas fundamental e vascular. Entretanto, foi possível verificar que as plantas provenientes do médio e alto RPS apresentaram redução no tamanho das células epidérmicas do pecíolo (Fig. 16).

Na zona de absorção da raiz de aguapé evidenciou-se a medula, vasos metaxilemáticos, córtex interno (4 a 5 camadas de células), trabéculas e amplos espaços de ar (Fig. 17 e 18). Não houve diferenças nítidas entre os diferentes ambientes analisados nos dois períodos de coleta. É possível observar a presença de cristais de oxalato de cálcio no feixe vascular das raízes (Fig. 17 e 18).

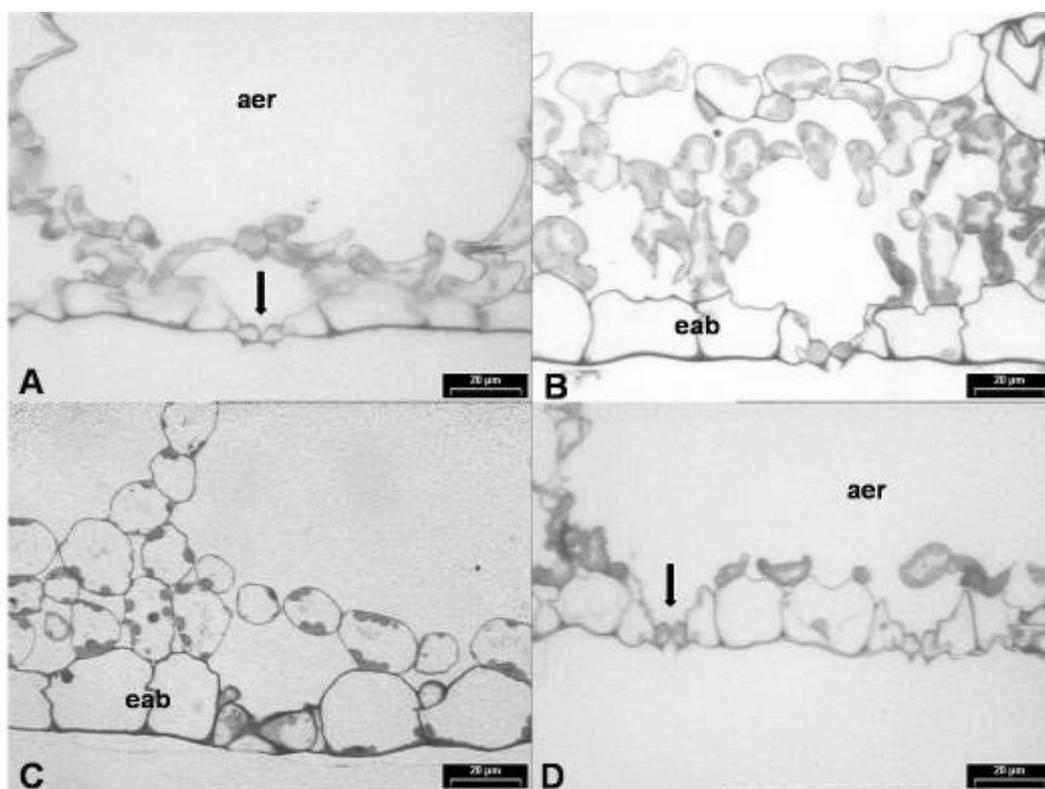


Figura 14 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando epiderme abaxial (eab), aerênquima (aer) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

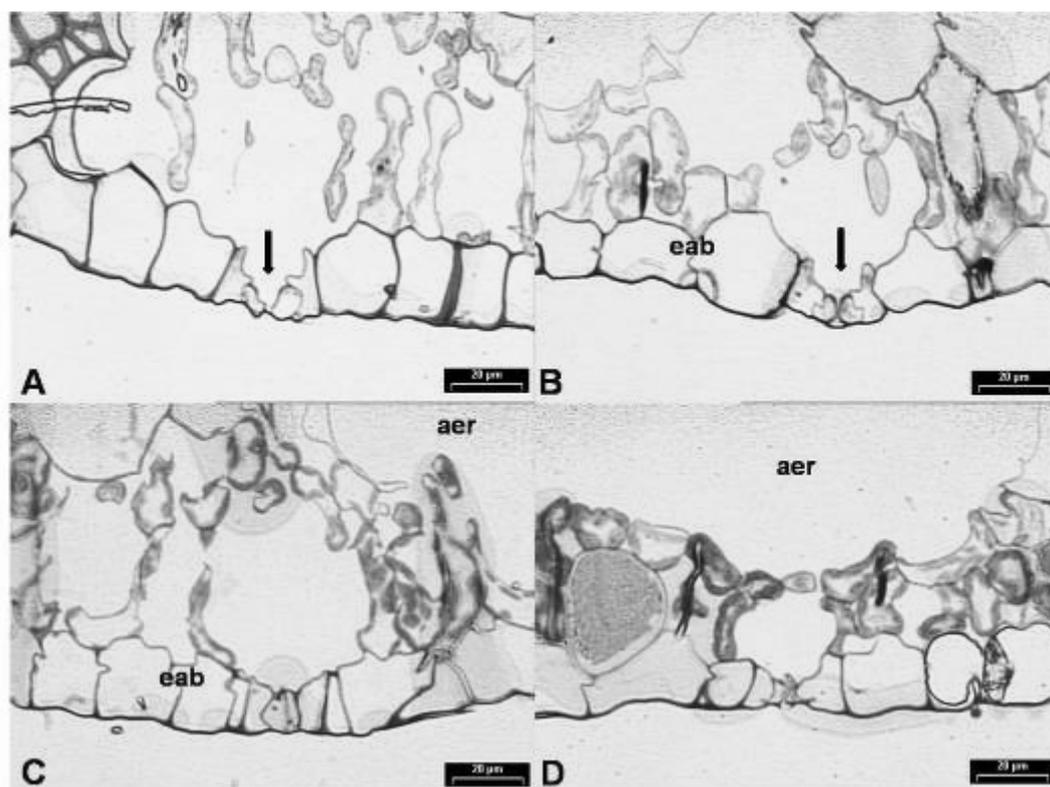


Figura 15 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando epiderme abaxial (eab) aerênquima (aer) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

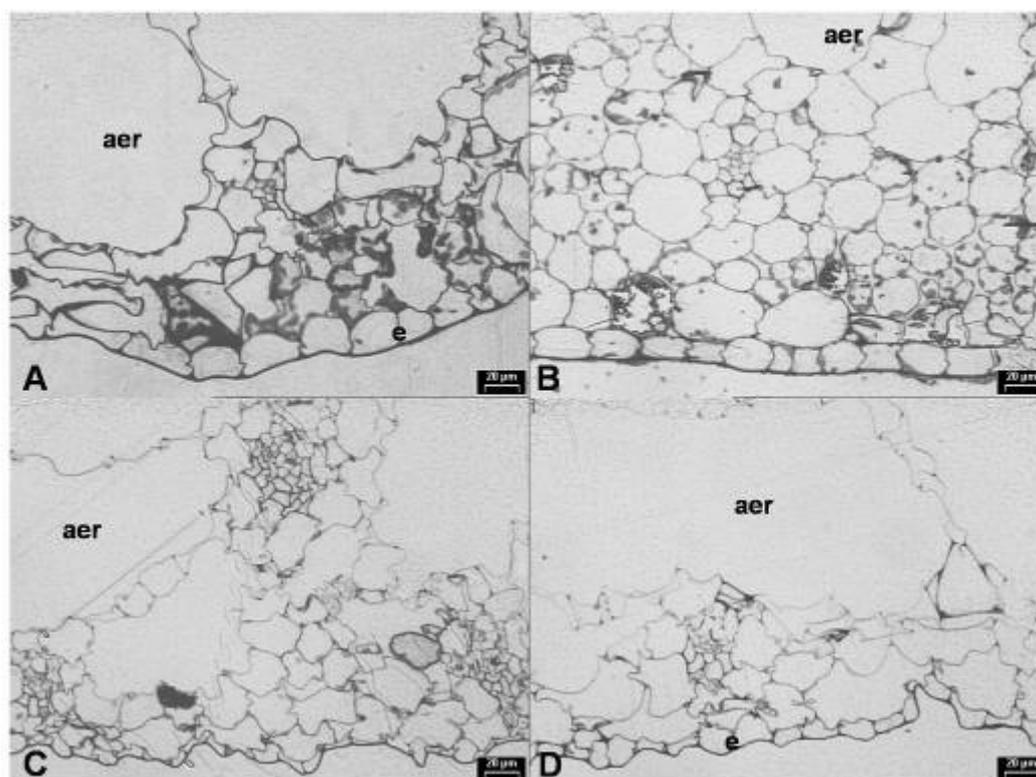


Figura 16 – Secção transversal do pecíolo de aguapé evidenciando aerênquima (aer) e epiderme (e). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

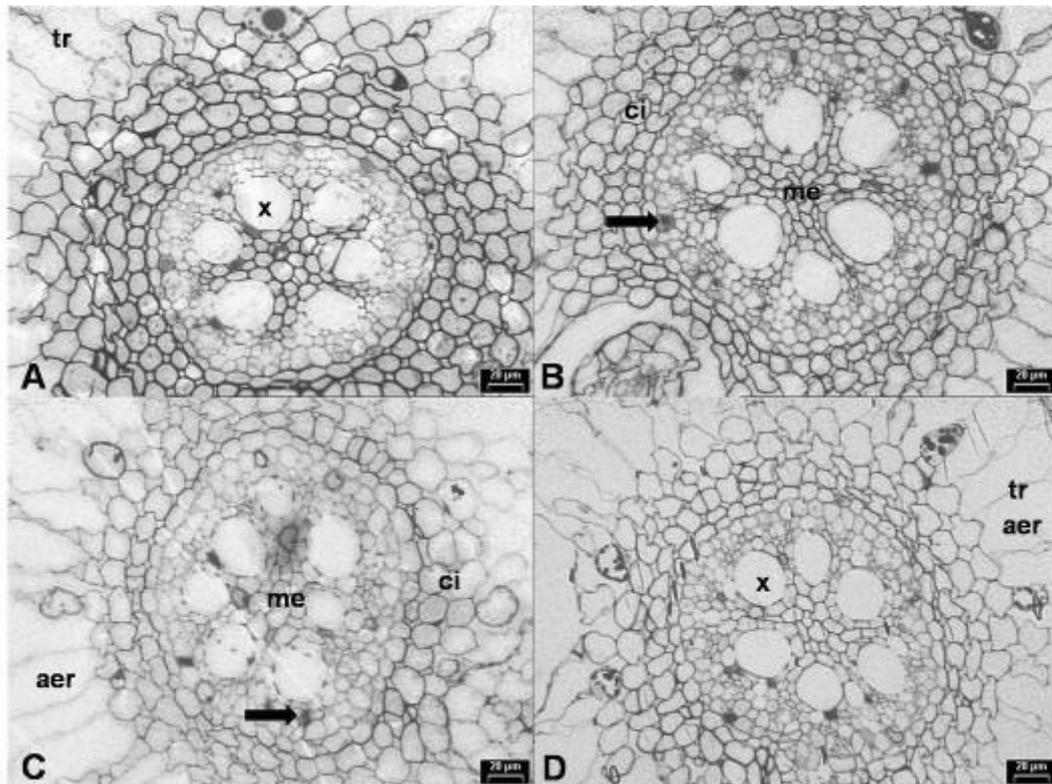


Figura 17 – Seção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2005. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

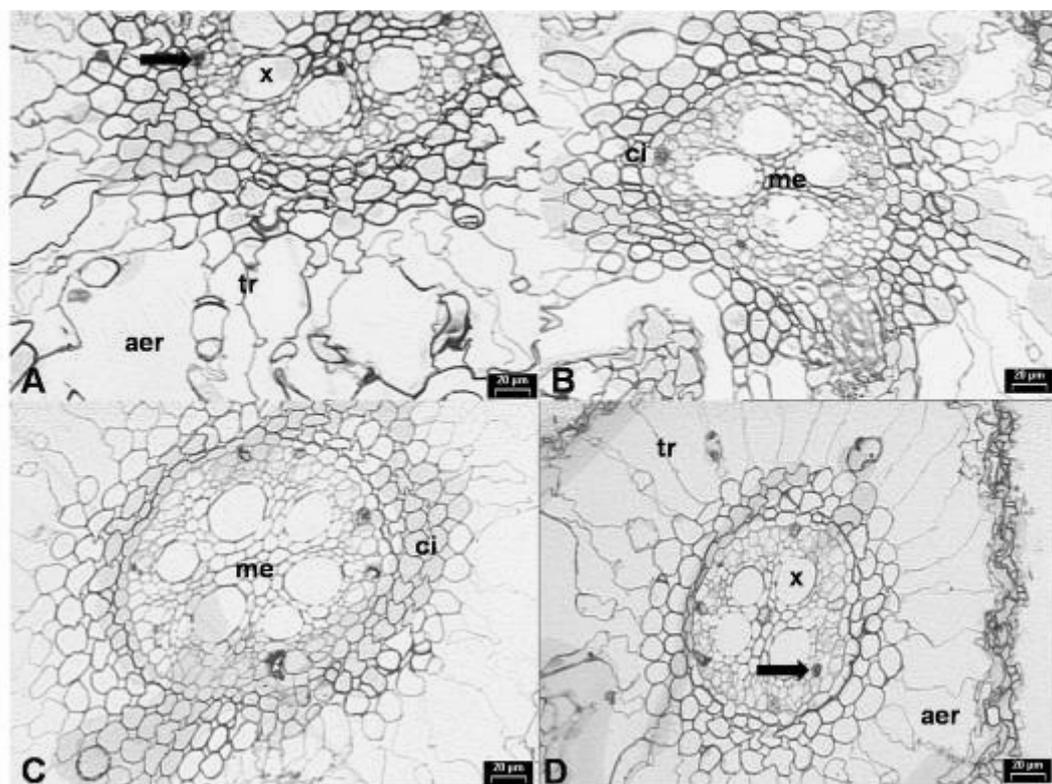


Figura 18 – Seção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

5.3.1.2. Segundo Ano de Coleta

A turgidez nas amostras do médio RPS encontradas no período seco de 2005 (Fig. 12) não se repetiu no período seco de 2006 (Fig. 19). Células levemente plasmolizadas foram observadas no parênquima paliçádico. A epiderme, no entanto, apresentou células mais delgadas quando comparadas as plantas provenientes do médio RPS (Fig. 19C) com os demais ambientes estudados no período seco de 2006. O mesmo foi observado para limbo de aguapé proveniente do alto RPS no período chuvoso de 2007 (Fig. 19 e 20). Verificou-se que o limbo de aguapé do rio Imbé do período chuvoso de 2007 apresentou acúmulo de compostos fenólicos em células globosas (Fig. 20 A, setas).

As figuras 21 e 22 apresentam cortes transversais da zona não-meristemática das raízes de aguapé coletadas no período seco de 2006 e chuvoso de 2007. Observa-se a presença de vasos do metaxilema, córtex interno e as trabéculas que delimitam os espaços de ar. A presença de cristais de oxalato de cálcio e/ou polímeros de natureza fenólica foi evidente no feixe vascular. No período seco de 2006 constatou-se redução do número de camadas de células do córtex interno de aguapé proveniente do médio RPS (Fig. 21C).

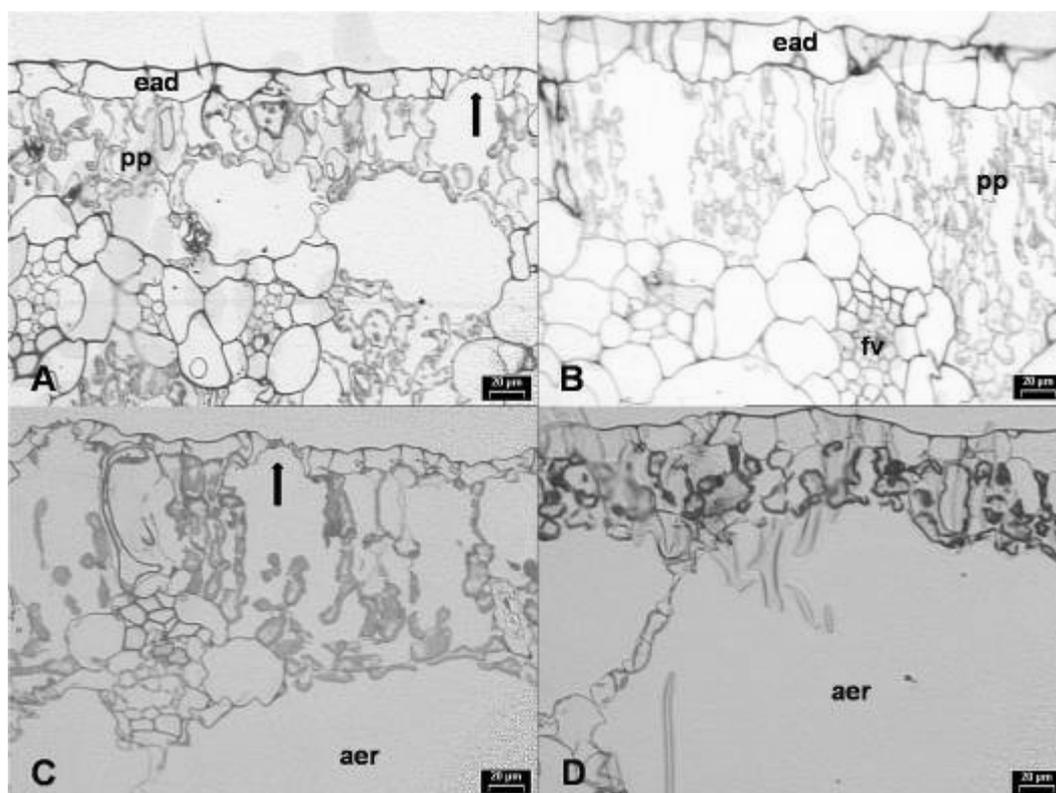


Figura 19 – Secção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando o feixe vascular (fv), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), epiderme adaxial (ead) e estômato (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco de 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

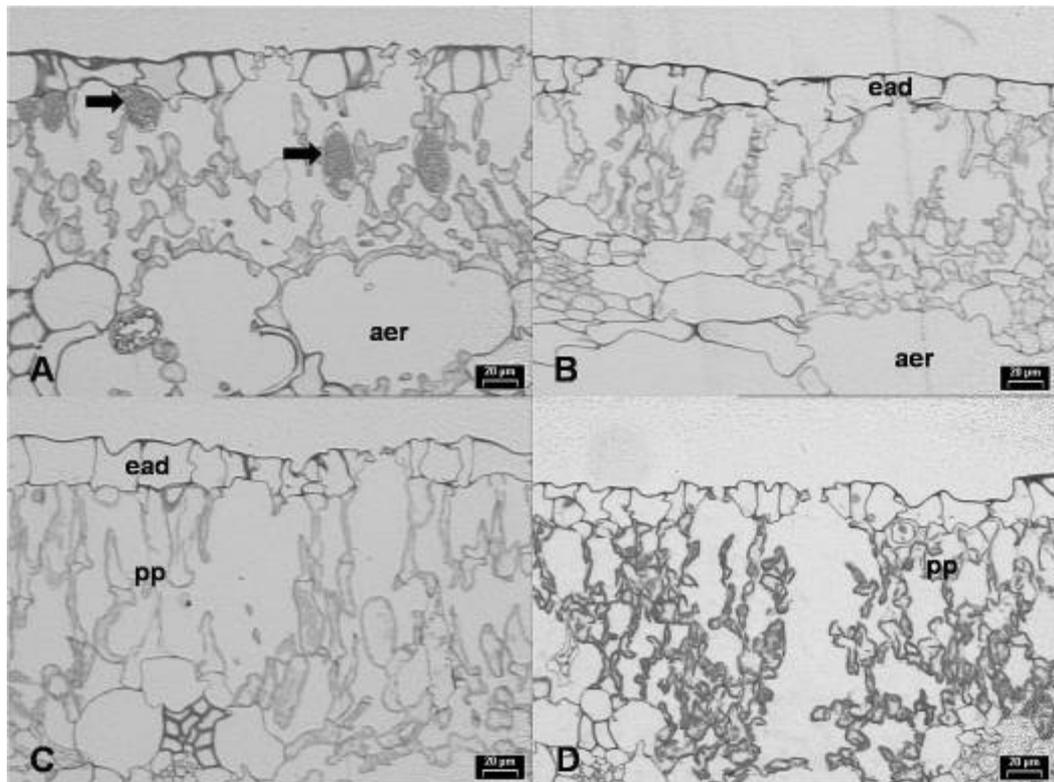


Figura 20 – Seção transversal do limbo foliar de aguapé evidenciando idioblastos (setas), parênquima paliçádico (pp), aerênquima (aer), e epiderme adaxial (ead). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso de 2007. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

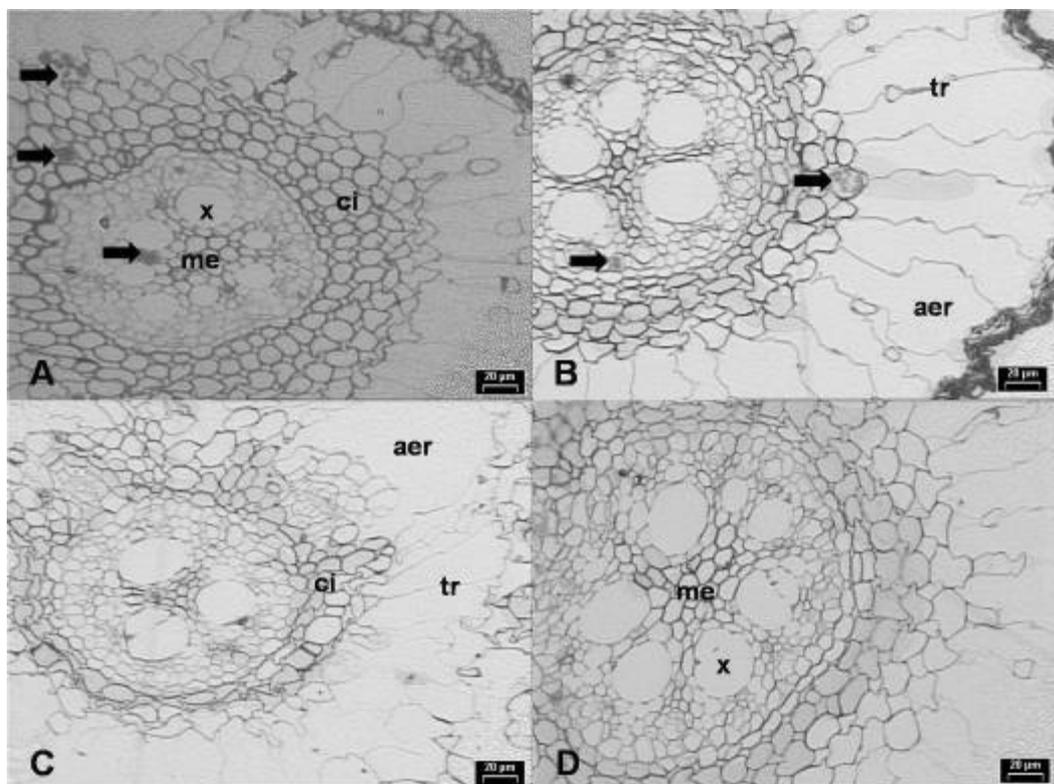


Figura 21 – Seção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período seco 2006. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

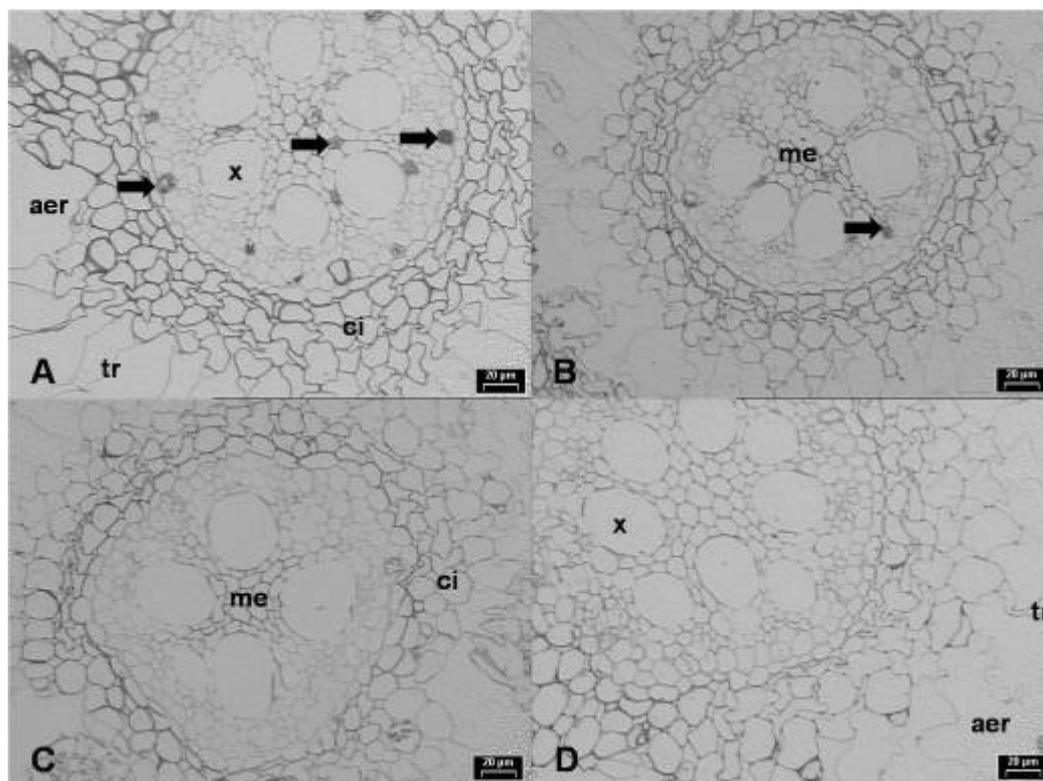


Figura 22 – Secção transversal da zona de absorção da raiz de aguapé evidenciando aerênquima (aer), trabécula (tr), xilema (x), medula (me), córtex interno (ci) e cristais de oxalato de cálcio (seta). Microscopia óptica. Barra = 20 µm. Coleta realizada no final do período chuvoso 2007. A - rio Imbé, B - baixo RPS, C - médio RPS, D - alto RPS. RPS: rio Paraíba do Sul.

5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A figura 23 apresenta a MET das células do limbo foliar de aguapé do rio Imbé coletadas nos períodos seco e chuvoso do primeiro ano de coleta. As organelas ocuparam posição marginal e os cloroplastos exibiram estrutura típica, com formato de elipse. Observa-se a integridade das membranas dos tilacóides, com o empilhamento característico dos mesmos. Foi possível visualizar abundante presença de grãos de amido.

No período seco de 2005, a MET dos cloroplastos de aguapé revelou uma desorganização da membrana interna para o médio e alto RPS (Fig. 24 B, B1, B2, C, C1 e C2). As células de aguapé proveniente do médio RPS mostraram uma diminuição do empilhamento dos tilacóides, não se formando os granum. O que se observou foi a disposição dos tilacóides de forma linear e alongada indo de um extremo ao outro da organela. Apesar desta alteração na disposição, pode ser verificado que os sistemas de membranas permaneceram íntegros. As imagens de ultra-estrutura das células de aguapé coletado no alto RPS evidenciam uma situação intermediária entre as imagens do rio Imbé e do médio RPS. Nestas plantas, as pilhas tilacoidais são mantidas, assim como no rio Imbé. Porém, pode

ser observado um afrouxamento entre os sistemas de membrana do granum, sendo que os tilacóides estão mais espaçados entre eles do que em uma situação normal (plantas do rio Imbé). Os cloroplastos do baixo RPS se assemelham aos do rio Imbé (foto não mostrada). Nos cloroplastos das plantas do médio RPS observou-se um volume maior de estroma (Fig. 24 B, B1 e B2).

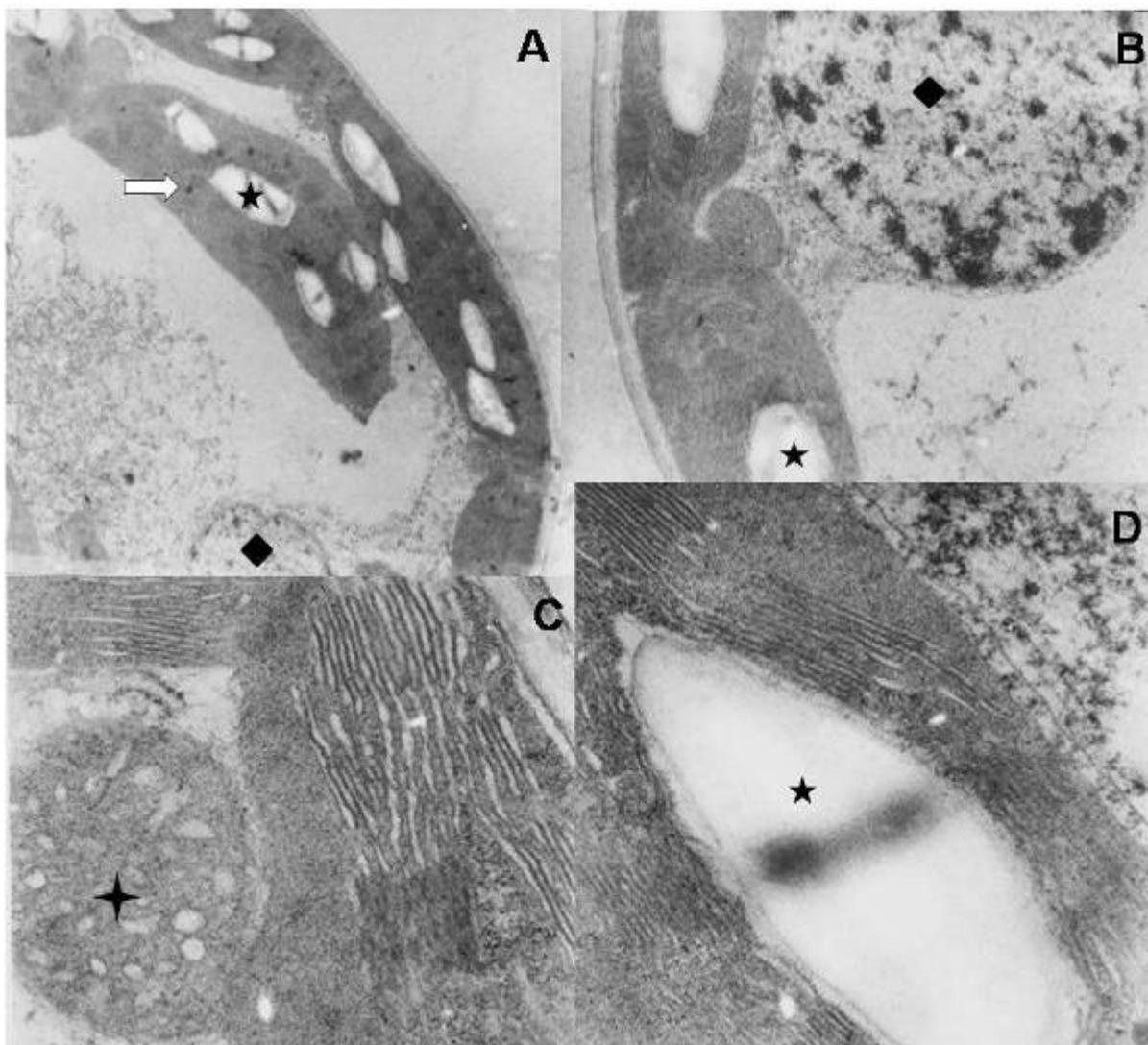


Figura 23 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no rio Imbé nos períodos seco de 2005 e chuvoso de 2006, mostrando várias organelas. A – aumento 7.000x, B – aumento 12.000x, C e D – aumento 50.000x. ★ – Grãos de amido no cloroplasto. ◆ – núcleo celular. ⇨ – plastoglóbulo. † – mitocôndria.

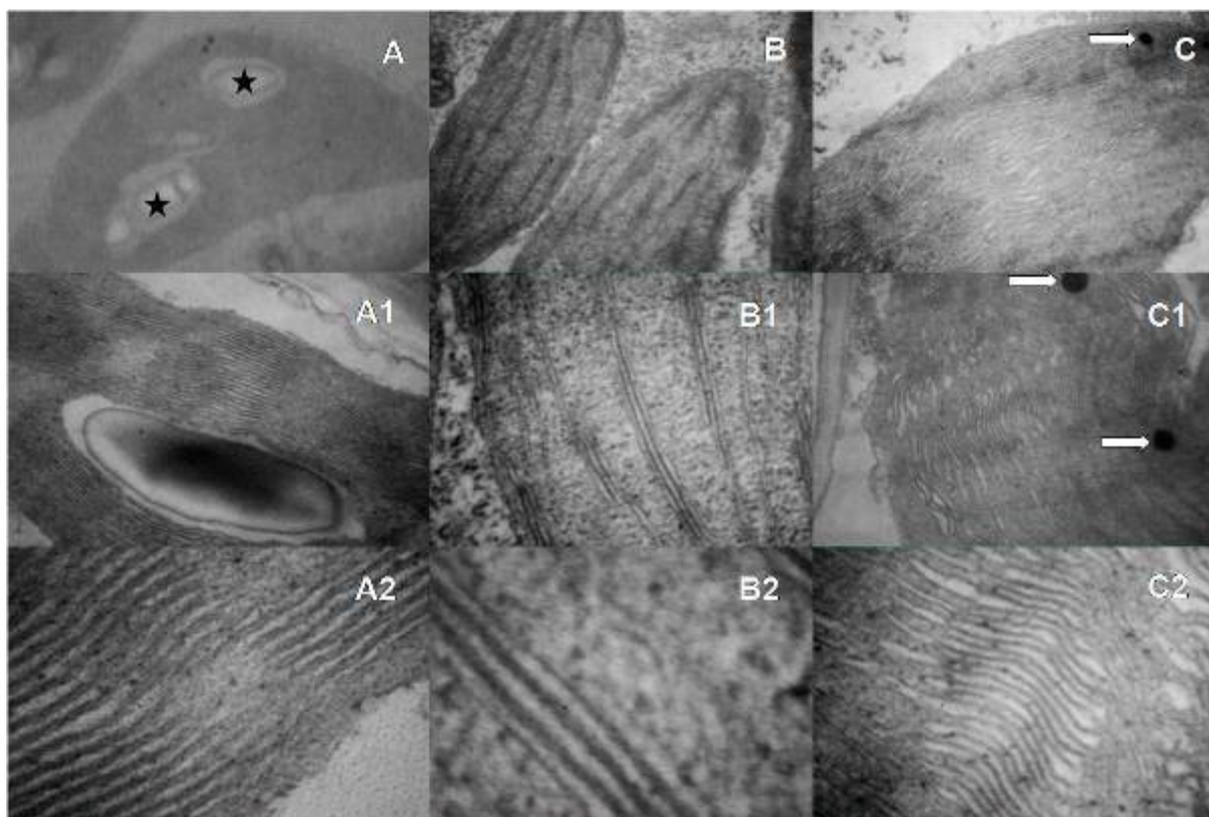


Figura 24 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período seco de 2005 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A, A1 e A2), médio RPS (B, B1 e B2) e alto RPS (C, C1 e C2). A, B e C – aumento de 12.000 x, A1, B1 e C1 – aumento de 85.000x, A2, B2 e C2 – aumento de 140.000 x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★ - Grão de amido. ⇒ – Plastoglóbulos.

Na figura 25 são mostradas as imagens da segunda coleta (período chuvoso de 2006) evidenciando cloroplastos com grãos de amido para plantas provenientes de todos os locais amostrados. Apenas nesta coleta foram visualizados grãos de amido nas amostras do médio RPS (Fig. 25 C). A integridade das membranas internas dos cloroplastos (tilacóides – Fig. 25 F) das amostras do baixo RPS foi mantida, assim como pôde ser visualizado para as plantas do rio Imbé (Fig. 25 E).

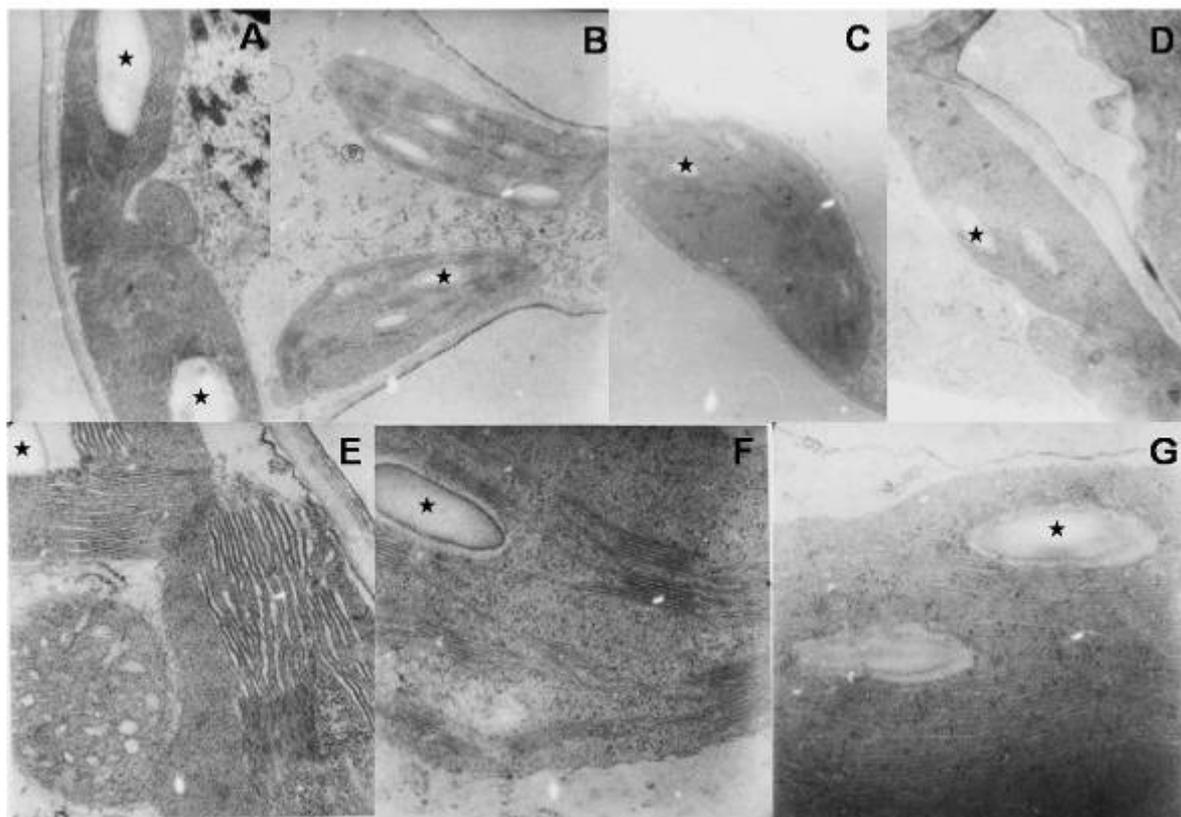


Figura 25 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período chuvoso de 2006 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C), alto RPS (D e G). A, B, C e D – aumento 12.000x. E e F – aumento 50.000x. G – aumento 30.000x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★- Grãos de amido.

A figura 26 mostra as imagens da terceira coleta (período seco de 2006). Nos cloroplastos das plantas do alto RPS é grande a presença de plastoglóbulos, possivelmente corpúsculos de lipídeos (Fig. 26 D, setas). Em todas as imagens os cloroplastos apresentaram os tilacóides íntegros. Grãos de amido foram evidenciados na maioria das amostras, com exceção das folhas provenientes do médio RPS (Fig. 26 C e G), que também apresentaram o estroma mais inchado que os cloroplastos de plantas coletadas nos demais locais.

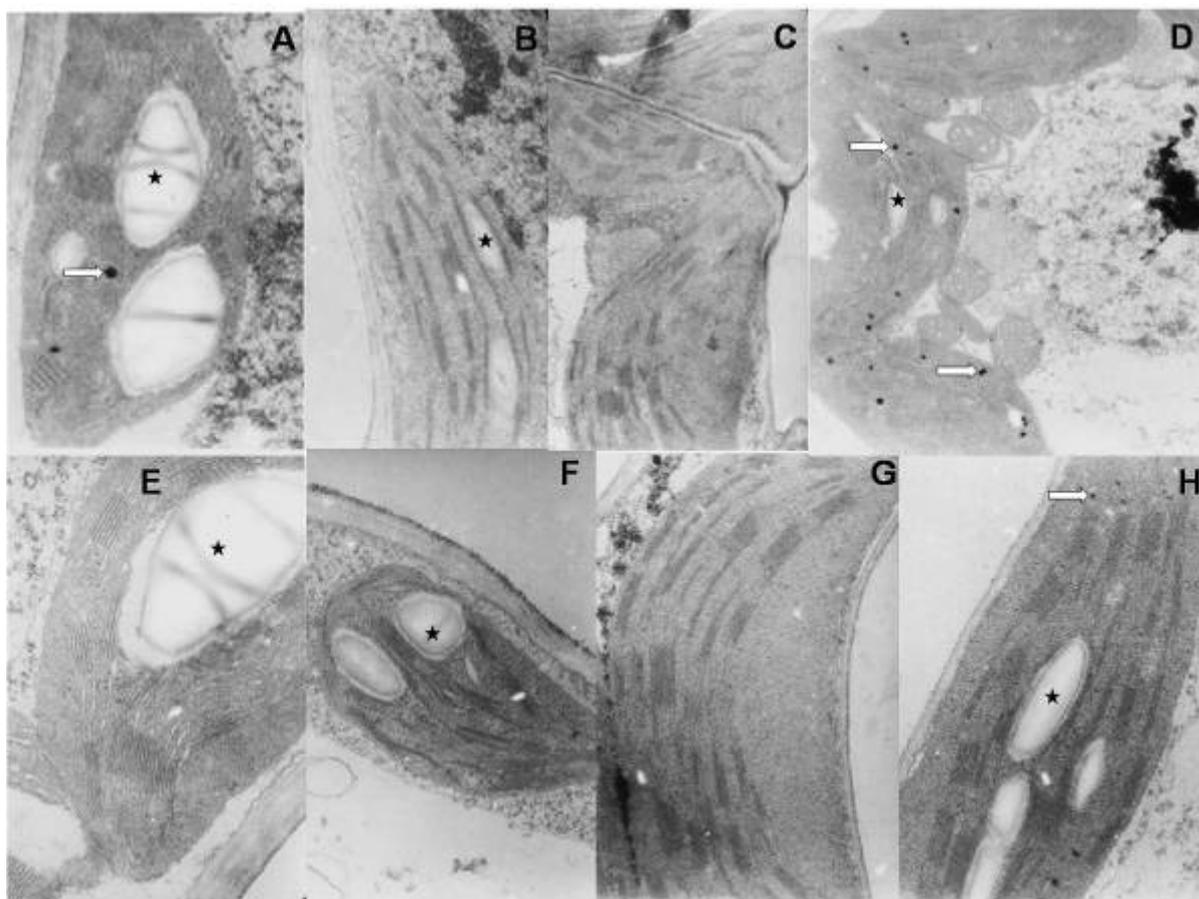


Figura 26 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período seco de 2006 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C e G), alto RPS (D e H). A, B, C e D – aumento 12.000x. E – aumento 30.000x. F, G e H – aumento 20.000x. RPS – rio Paraíba do Sul. ★ - Grãos de amido. ⇨ - Plastoglóbulos.

Na figura 27 (A e E) pode ser observado que as plantas de aguapé do rio Imbé apresentaram um acúmulo de plastoglóbulos (Fig. 27 E). Plastoglóbulos também foram observados em plantas provenientes do médio e alto RPS. Além da presença dos plastoglóbulos foi verificado também o aumento do volume de estroma e afrouxamento dos tilacóides nas plantas provenientes do rio Imbé, médio e alto RPS. As plantas do rio Imbé apresentaram grande quantidade de grãos de amido.

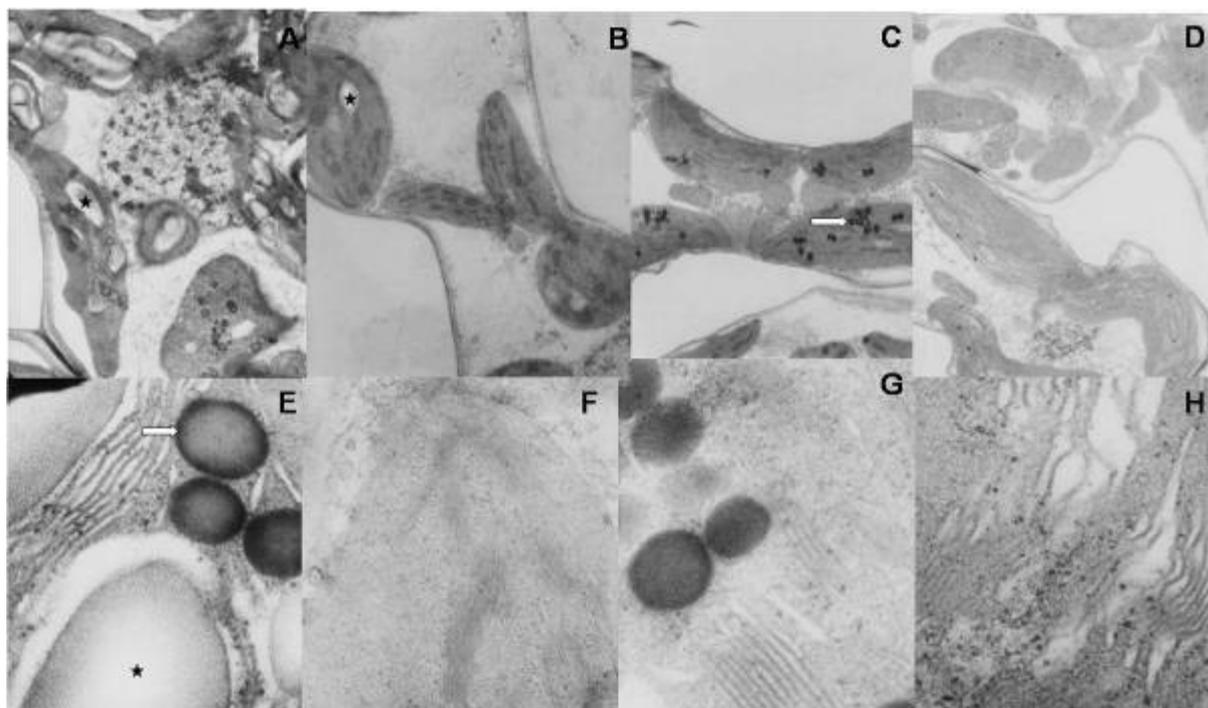


Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período chuvoso de 2007 evidenciando os cloroplastos. Rio Imbé (A e E), baixo RPS (B e F), médio RPS (C e G), alto RPS (D e H). A, B, C e D – aumento 7.000x. E, G e H – aumento 85.000x. F – aumento 50.000x. RPS – rio Paraíba do Sul; ★ - Grãos de amido. ⇨ - Plastoglóbulos.

A figura 28 ilustra a ultraestrutura das mitocôndrias de folhas de aguapé (período seco de 2005). Aparentemente não há diferença ultraestrutural entre as organelas encontradas em plantas do rio Imbé e do médio RPS, sendo possível visualizar as cristas com formato normal (mais elíptico) e íntegras (Fig. 28 A e B). Já nas amostras do alto RPS (Fig. 28 C), as cristas se mostram mais alongadas, mais arredondadas e a membrana da organela, apesar de íntegra, apresenta um distanciamento entre a membrana interna e externa. Entretanto, nas análises das demais coletas não foram observadas variações nas mitocôndrias (imagens não mostradas).

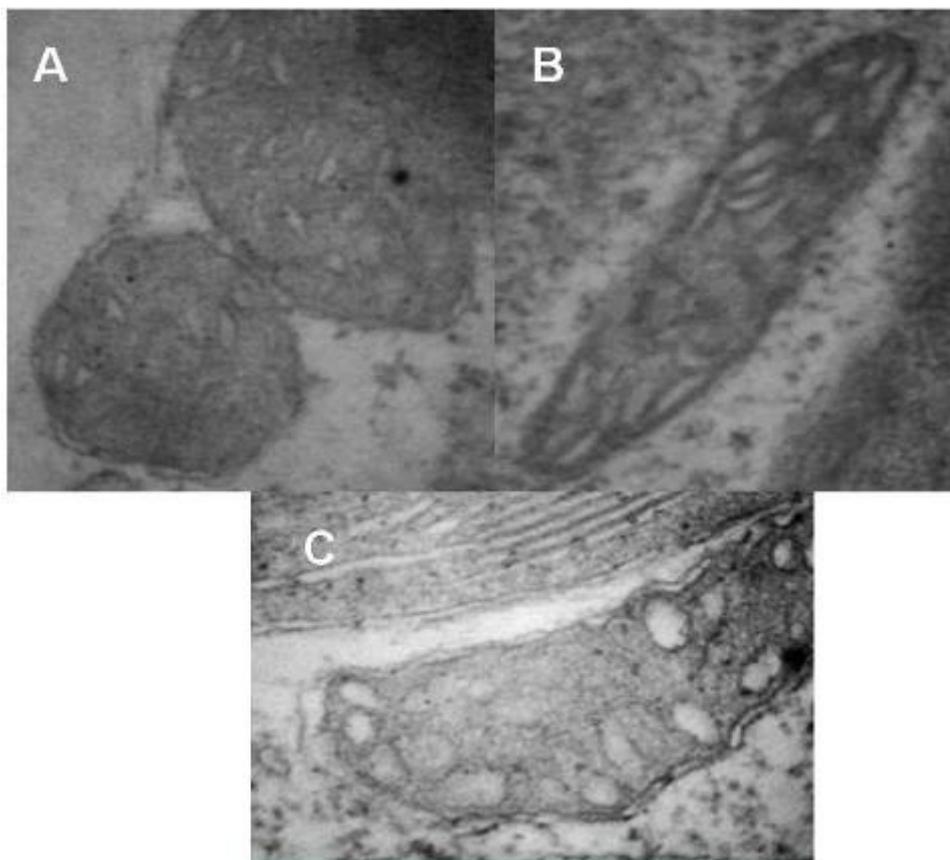


Figura 28 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de aguapé coletadas no final do período seco de 2005 mostrando mitocôndrias. Rio Imbé (A), médio RPS (B) e alto RPS (C). Aumento de 50.000 x. RPS - rio Paraíba do Sul.

6. DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os valores encontrados para as temperaturas do ar e da água neste estudo, refletem a variação temporal que ocorre durante o ano. Estes dados podem ser explicados em parte pelo fenômeno do ciclo hidrológico, que é um fenômeno global de circulação fechada da água entre a superfície terrestre e a atmosfera, impulsionado fundamentalmente pela energia solar associada à gravidade e à rotação da terra. A título de exemplo, durante todo o período de estudo, as médias mensais da radiação solar ($W.m^{-2}$) incidente no município de Campos dos Goytacazes (Anexo 1) atingiram os valores mais elevados no período de novembro a março, ao passo que os menores valores ocorreram de abril a setembro. Estes dados acompanhados das médias mensais de temperatura e vazão do RPS na sua porção inferior (Anexos 2 e 3) reforçam a variação temporal encontrada para este município. Barbosa *et al.* (2005) verificaram que o alto RPS mostrou um comportamento climatológico esperado durante o período de 1962 a 1992, apresentando os meses mais quentes e chuvosos entre dezembro e fevereiro, enquanto que de junho a agosto ocorreram as temperaturas mais baixas, assim como as pluviosidades médias.

De acordo com estudos publicados pela FEEMA (1991), na cidade de Volta Redonda o período chuvoso ocorre de outubro a março com a umidade relativa do ar inferior a 77% nos meses de agosto e setembro (período seco).

A temperatura mínima registrada no período seco de 2005 no rio Imbé foi possivelmente devida ao dia nublado quando a coleta de dados foi realizada, uma vez que, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (InMet), dos pontos de coleta, este é o de temperatura média anual mais elevada. Nos demais dias de coleta ao longo dos dois anos, o tempo sempre esteve ensolarado. Sendo assim, as temperaturas no alto RPS no período seco de 2005 e 2007 (21 °C) estão de acordo com o esperado, uma vez que este é o ponto de coleta com menor média anual de temperatura.

Os maiores valores de condutividade elétrica foram observados no período seco no RPS e estes se apresentaram em média três vezes superior ao valor da condutividade para o rio Imbé. Isto pode ser explicado pela geologia do local nos trechos do RPS. O maior valor de condutividade elétrica no período seco se deve à maior disponibilidade de íons na água em função da menor entrada de água pelos

afluentes e chuvas nesta época do ano. Salomão (1999) em estudos realizados na região do baixo RPS verificou sazonalidade nas concentrações de metais pesados nas frações dissolvidas e particuladas, sendo que as concentrações mais elevadas nas frações dissolvidas foram encontradas no período seco.

Os menores valores de pH encontrados no rio Imbé podem ser explicados pelo aporte de ácidos húmicos e fúlvicos provenientes da vegetação que se desenvolve no seu entorno.

Apesar do parâmetro oxigênio dissolvido não ter apresentado um padrão de comportamento temporal, quando se compara o oxigênio dissolvido no alto e médio RPS no período chuvoso de 2006 e 2007, observa-se que no ano de 2006 os valores foram mais elevados. Como os valores encontrados em ambos os pontos no período chuvoso de 2006 não se repetiram em nenhuma outra situação, é possível que isto tenha sido devido a alguma alteração pontual e que esta não seja a realidade destas porções do RPS quanto à solubilidade de oxigênio. Dois fatores poderiam levar ao aumento do oxigênio dissolvido: aumento na convecção das correntes do RPS e aumento na quantidade de fitoplâncton. A primeira possibilidade é a menos provável, uma vez que o volume de água é relativamente grande e não ocorre repetibilidade do fenômeno no mesmo período do ano no ano seguinte. O aumento da quantidade de fitoplâncton pode ocorrer em função do aumento da quantidade de nutrientes disponível no rio. Isto pode ocorrer através de maior aporte de esgoto, resíduos industriais não tóxicos ou maior lixiviação, fenômenos possíveis de terem ocorrido em uma determinada época no trecho alto-médio RPS. Valores de oxigênio dissolvido acima de 4,0 são indicativos de condições ideais para organismos aeróbicos. Em apenas uma coleta (período chuvoso de 2007 no alto RPS) o valor esteve abaixo do limite supracitado (3,93). Durante esta coleta foi relatado a presença de peixes mortos trazidos pelo RPS (pescador Vladimir, comunicação pessoal), possivelmente devido também a diminuição do oxigênio dissolvido disponível na água. Sugerimos que esta diminuição pode ter sido ocasionada por um aporte de esgoto doméstico maior que o habitual, ou ainda, pela manutenção do gramado de campos de golfe e futebol que margeiam esta região do alto RPS.

Os dados de MPS revelaram variação temporal esperada durante o primeiro ano de coleta. Carvalho *et al.* (1999) verificaram que os valores de MPS tendem a aumentar no período chuvoso, quando maior volume de águas revolve o fundo dos

rios permanentemente e o escoamento superficial carrega maior quantidade de materiais para a calha fluvial. O mesmo não foi observado no segundo ano (exceto o baixo RPS), provavelmente devido às intervenções promovidas nas barragens que podem ter causado redução na vazão durante o período chuvoso.

De acordo com Marengo & Alves (2005), a redução sistemática nas vazões e cotas do Paraíba do Sul podem ser causadas por: (a) efeitos antropogênicos de uso da água para abastecimento e geração de energia (barragens e açudes), (b) desvio de rios para usos na agricultura e que pode aumentar a evaporação, (c) mudanças gradativas no regime e distribuição de chuvas na bacia decorrentes de mudanças climáticas regionais. Nas regiões do alto e médio RPS as vazões do rio são controladas pelas barragens Paraibuna, Paraitinga, Santa Branca, Jaguari, Funil e Santa Cecília, que estão localizadas nos Estados de São Paulo e Rio Janeiro. A derivação das águas do sistema Light-Guandu na Barragem de Santa Cecília, situada a 382 km à montante da foz, abastece aproximadamente 80% da população metropolitana do Rio de Janeiro e causa uma redução significativa na vazão média local, que no período de 1988 a 1993 caiu de $292 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ para $175 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Na região do baixo RPS a vazão apresenta grande variação. No período de 1995 a 2006 as vazões mínima e máxima foram de 115 e $4.624 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente, com valor médio variando de 438 a $968 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Anexo 4) (Muehe & Valentini, 1998; Figueiredo, 1999; LCA – Base de Dados).

6.2. Fluorescência da Clorofila *a* e Pigmentos Fotossintéticos

As plantas avaliadas em todos os locais exibiram variações quanto aos parâmetros ecofisiológicos analisados. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* apresentaram interações significativas entre os diferentes fatores analisados, indicando que as tendências não foram as mesmas durante o período de estudo. Dessa forma, as diferenças entre os distintos locais para os parâmetros F_0 , F_m , F_v , q_N e NPQ dependeram do período ou ano de coleta, enquanto que para as razões F_v/F_m e F_v/F_0 as diferenças dependeram do período e ano de coleta.

Quando analisados os dados de fluorescência da clorofila *a* quanto à variação espacial constatou-se que no primeiro ano de coleta não houve diferenças significativas entre os distintos ambientes de estudo. Também não foi observada variação temporal. Contudo, algumas tendências foram evidenciadas, apesar da ausência de diferenças estatisticamente significantes. No que diz respeito à resposta

fotoquímica, os valores de F_0 encontrados no rio Imbé e baixo RPS foram similares entre os períodos analisados. Estes ambientes apresentam menor aporte de material antropogênico e são geograficamente mais próximos (ambos em Campos dos Goytacazes). Entretanto, quando se observa os valores médios encontrados para F_0 verifica-se que há uma tendência de aumento desses valores nas regiões do médio e alto RPS no período seco.

Os valores de F_0 representam a emissão de fluorescência da clorofila *a* produzida pela excitação do complexo coletor de luz (LHC_{II}), antes da transferência da energia até o centro de reação do FS_{II} (Krause & Weiss, 1991). Há um consenso ao considerar que F_0 é obtida quando os centros de reação do FS_{II} encontram-se “abertos”, o que significa dizer que o acceptor primário de elétrons, Quinona A (Q_A), está completamente oxidado (Krause & Weiss, 1991; Baker & Rosenqvist, 2004). O aumento nos valores de F_0 pode resultar de algum dano no centro de reação do FS_{II} (Ouzounidou, 1997), que reduz a habilidade para transferir energia do LHC_{II} para o centro de reação. Deste modo, a tendência de aumento observada nos valores de F_0 nas regiões mais industrializadas no período seco pode ser indicativa de uma maior concentração de poluentes no rio neste período do primeiro ano de coleta.

Campaneli *et al.* (submetido) trabalhando com essa planta no mesmo período e localidades, encontraram maiores concentrações de Cu e Zn (Anexos 5 e 6) em raízes provenientes do médio e alto RPS no período seco. Ralph & Burchett (1998) detectaram um aumento dos valores de F_0 em condições controladas quando *Halophila ovalis* foi exposta a altas concentrações de Cu e Zn, mas observaram uma diminuição nos valores de F_m nestas condições. No presente estudo, houve tendência de aumento de F_0 nos locais com maiores concentrações de metais no período seco do primeiro ano, entretanto, não se verificou redução de F_m como foi observado por Ralph & Burchett (1998). O parâmetro F_m sinaliza o momento de completa redução do *pool* de plastoquinona e é considerado proporcional ao conteúdo de clorofila total das amostras (Miranda *et al.*, 1981). Entretanto, os resultados deste trabalho não apresentaram relação de F_m com o conteúdo de clorofilas totais das amostras.

Em geral, os parâmetros q_N e NPQ apresentaram uma tendência de aumento nas plantas de aguapé provenientes do médio e alto RPS. Os *quencher*s da fluorescência, q_N e NPQ, representam a fração de energia absorvida, tais como a excitação de pigmentos fotossintéticos, que é dissipada como calor ou energia

térmica (infra-vermelho). Deste modo, sugere-se que o aumento destes parâmetros nos ambientes sujeitos a maior contaminação ambiental poderia manter o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) das plantas dentro de uma faixa ótima. Segundo Bolhàr-Nordenkampf *et al.* (1989), quando uma planta não está submetida a estresse, a razão F_v/F_m deve estar entre 0,75 e 0,85. Como as médias de F_v/F_m variaram entre 0,78 e 0,82 no primeiro ano de estudo, assumimos que as plantas de aguapé não sofreram estresse no primeiro ano de coleta. Este fato é corroborado pelos valores de dissipação de energia na forma fotoquímica (q_p), que no geral ficou em torno de 1 (dados não apresentados).

No segundo ano de coleta, de maneira geral, as variações espaciais ocorreram para os parâmetros F_m , F_v , F_v/F_m e F_v/F_0 , sendo que, os valores mais elevados foram obtidos no médio e alto RPS. A fluorescência variável (F_v) representa o fluxo de elétrons do centro de reação do FS_{II} até a plastoquinona (PQH₂). Os valores mais elevados de F_v nestes ambientes são em função dos elevados valores de F_m , visto que $F_v = F_m - F_0$. Os valores da razão F_v/F_m expressam a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FS_{II} (Krause & Weiss, 1991; Baker, 1991; Bacarin & Mosquin, 2002), ou seja, indica a eficiência fisiológica do aparelho fotossintético (Gonçalves *et al.*, 2001) e a atividade dos cloroplastos (Bacarin & Mosquin, 2002; Sayed, 2003; Bron *et al.*, 2004), sendo usados como indicador do desempenho fotossintético. Apesar de o médio e alto RPS estarem sujeitos a um maior aporte de dejetos e rejeitos industriais, as plantas de aguapé não apresentaram queda no rendimento quântico potencial (F_v/F_m). No que se refere a razão F_v/F_0 , esta se mostrou mais sensível que a razão F_v/F_m uma vez que detectou pequenas diferenças entre os ambientes estudados. Mallick & Mohn (2003) estudando o efeito de metais pesados na microalga *Scenedesmus obliquus* concluíram que a razão F_v/F_0 pode ser usada como uma poderosa ferramenta em pesquisas que relacionam estresse a metais. Oliveira *et al.* (2002) relataram elevada correlação entre ambos os parâmetros em um estudo sobre o resfriamento na atividade fotossintética em plântulas de café (*Coffea arabica* L.). Os autores demonstraram que o valor máximo de F_v/F_m reduziu 6% em relação ao controle enquanto que para F_v/F_0 essa redução foi de 20%, sugerindo que este último parâmetro seja mais sensível às variações de temperatura.

A manutenção dos valores de F_v/F_m pelo aguapé ao longo do período de estudo pode ser atribuída em parte a sua capacidade de acumular grandes

quantidades de metais em suas raízes (Soltan, 1999; Vesik *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004; Campanelli *et al.* submetido). Esta estratégia evita que os metais se acumulem nas folhas e causem danos à fotossíntese. A regulação da absorção de metais pesados pela raiz, o acúmulo neste órgão e a baixa translocação para a parte aérea preserva a integridade e funções primárias das folhas evitando o comprometimento da fotossíntese. Assim, esses mecanismos do sistema radicular podem contribuir para a tolerância de algumas espécies de plantas a metais pesados (Verkleij & Parest, 1989; Arduini *et al.*, 1996).

Os parâmetros q_N e NPQ durante o período seco do segundo ano apresentaram resultados similares aos de F_m , F_v , F_v/F_m e F_v/F_0 . Deste modo, é possível sugerir que o aumento na dissipação de calor nas regiões do médio e alto RPS seja outra forma de evitar que algum dano seja provocado no aparelho fotossintético de aguapé. A dissipação não-fotoquímica constitui o principal componente gerador do declínio da fluorescência da clorofila *a* (Krause & Weis, 1991). Os valores encontrados para ambos os *quenchings* não-fotoquímicos (q_N e NPQ) revelaram que as plantas de aguapé têm uma tendência de aumentar a dissipação não-fotoquímica na medida que os ambientes tornam-se mais antropizados.

As diferenças sazonais encontradas no baixo RPS durante o segundo ano para os parâmetros F_v , F_v/F_m , F_v/F_0 refletem a evidente variação temporal do ambiente (radiação solar, pluviosidade, temperatura e vazão – Anexos 1, 2 e 3) encontrada neste trecho do RPS. O maior volume de água no período chuvoso provavelmente teve um efeito diluidor na concentração dos xenobióticos (entre eles os metais pesados), associado com uma elevada luminosidade durante este período. Isto pode ter promovido maiores valores nestes parâmetros. Os elevados valores de q_N encontrados para as plantas do rio Imbé durante o período chuvoso do segundo ano podem ser atribuídos a algum agente químico ainda desconhecido ou ao excesso de radiação solar (Anexo 1). A variação temporal encontrada no rio Imbé para o parâmetro F_0 pode ser devida à deposição atmosférica de mercúrio, visto que na região de Campos dos Goytacazes há plantio intensivo de cana-de-açúcar, onde se utiliza defensivos agrícolas que contém este elemento. Tal contaminante já foi detectado no rio Imbé (Carvalho, comunicação pessoal¹).

¹ Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho, Professor do Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Quando analisados os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de aguapé em função da variação temporal, constata-se que apenas os parâmetros F_0 , F_m e F_v foram significativamente diferentes, com as maiores médias ocorrendo no segundo ano de coleta. Os resultados obtidos por Campaneli *et al.* (submetido) (Anexos 5 e 6) podem em parte explicar o aumento no parâmetro F_0 , visto que nas regiões do médio, baixo e alto RPS, as concentrações de Cu e Zn foram mais elevadas nas raízes. Conforme foi demonstrado por Ralph & Burchett (1998), um aumento dos valores de F_0 ocorreu em função da exposição de *Halophylla ovalis* aos metais Zn e Cu em condições controladas. Os valores mais elevados da fluorescência variável (F_v) neste segundo ano são resultantes principalmente dos elevados valores de F_m . Estes elevados valores de F_m podem estar relacionados com o aumento do conteúdo de clorofilas totais, conforme foi visto por Miranda *et al.* (1981). Esta relação não foi constatada, provavelmente devido ao número amostral insuficiente. Também é possível que os menores valores de F_m encontrados durante o primeiro ano possam indicar proteção do aparelho fotossintético contra o excesso de energia de excitação por meio do fechamento dos centros de reação do FS_{II} (Campbell *et al.*, 2003; Pospíšil, 1997).

Os parâmetros da concentração dos pigmentos fotossintéticos analisados em aguapé durante o segundo ano de estudo indicaram que as tendências não foram as mesmas durante o período de estudo. Desse modo, as diferenças entre os distintos locais para os parâmetros [Clo *b*], [*Caro*], clo *a/b* e Clo (*a + b*)/(*caro*) dependeram do fator período de coleta, enquanto que para [Clo *a*] e [Clo Totais] não dependeram do período de coleta.

De forma geral, os parâmetros [Clo *b*], [Clo *a*], [*Caro*], clo *a/b* e [Clo Totais] apresentaram valores mais elevados nas regiões do médio e alto RPS durante o primeiro ano de estudo. Isto pode ser devido ao fato das plantas de aguapé terem absorvido maiores concentrações de metais pesados nestas porções do RPS em relação ao controle, conforme demonstrado por Campaneli *et al.* (submetido). Mishra *et al.* (2007) verificaram que plantas de aguapé intoxicadas com Cd aumentaram o conteúdo de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais e carotenóides em concentrações de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para 24 e 48h de exposição. Entretanto, quando o tempo de exposição e a concentração das soluções de Cd foram ampliados houve uma queda nos valores das concentrações destes pigmentos (exceto carotenóides). Hu *et al.* (2007) verificaram que baixas doses de Cu estimulam a elevação dos conteúdos de

clorofilas, carotenóides e proteínas em aguapé. A degradação de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a*, *b* e clorofilas totais) é rotineiramente observada em plantas expostas a elevadas concentrações de metais pesados (Stobart *et al.*, 1985; Rai *et al.*, 1995a). Deste modo, é possível que as concentrações de metais pesados encontrados nas amostras de aguapé durante o período chuvoso possam ter estimulado um aumento dos valores destes pigmentos.

No segundo ano de estudo os maiores valores de [Clo *a*], [Clo *b*], [Caro] e [Clo Totais] encontrados na região do rio Imbé se comportaram diferentemente dos valores encontrados no ano anterior. Isto foi devido possivelmente às altas concentrações de Mn (Anexo 7) encontradas no limbo de aguapé no período seco. Também é possível que algum outro agente xenobiótico (como, por exemplo, os herbicidas triazínicos) tenha contribuído para o aumento nos valores desses pigmentos. A absorção de compostos orgânicos como herbicidas pelas plantas é afetada pelas propriedades químicas do composto, pelas condições ambientais e pelas características da espécie vegetal (Burken & Schnoor, 1996). Deste modo, estes xenobióticos, em maiores concentrações podem ter contribuído para o aumento do conteúdo destes pigmentos nas plantas. Esta seria uma forma de manter o seu aparelho fotossintético funcionando em melhores condições, como discutido anteriormente.

As variações nas concentrações de clorofila *a* e *b* refletiram-se diretamente nos valores da razão clorofila *a/b*. Segundo Gonçalves *et al.* (2001) isto constitui um bom indicador de alterações ambientais. Ambas as clorofilas são componentes das membranas dos cloroplastos e ocorrem na razão de aproximadamente 3:1 (Lichtenthaler *et al.*, 1981). As razões encontradas neste trabalho variaram entre 2,1:1 e 3,5:1. Quando avaliada a relação clo *a/b* no segundo ano de estudo verificou-se que no período seco, tanto o rio Imbé quanto o baixo RPS foram as regiões que apresentaram os menores valores para esta razão. Observando-se os valores de [clo *b*] neste mesmo período constata-se que estes se apresentam mais elevados neste ambientes, contribuindo com a queda dos valores de clo *a/b*. Segundo Seybold & Egle (1937) plantas expostas a elevados fluxos de fótons fotossintéticos (*FFF*) apresentam as razões clorofila *a/b* em torno de 3,2 a 4,0 e plantas crescendo em ambientes com reduzidos *FFF* possuem razões de clorofila *a/b* em torno de 2,5 a 2,9. A queda nestes valores se deve em parte, ao aumento de clorofila *b* em ambientes mais sombreados ou com baixa disponibilidade luminosa, o que acaba

conduzindo a uma diminuição desta razão. Portanto, é possível sugerir que estes menores valores observados para a razão clo a/b no rio Imbé e baixo RPS podem ser reflexo da menor radiação solar (Anexo 1) a que estas plantas estiveram sujeitas no período seco do segundo ano de estudo. Isto também ajudaria a explicar a variação ocorrida nos parâmetros [clo b] e Clo $(a + b)/(caro)$ no rio Imbé com as maiores médias ocorrendo no período seco e para o parâmetro clo a/b no rio Imbé e baixo RPS com as maiores médias no período chuvoso (maior radiação solar). Outro fato que deve ser considerado é o hábito livre desta planta flutuante, o que impede inferências seguras a cerca de onde elas estavam dias antes do momento de coleta, apesar destas formarem bancos relativamente fixos próximos a margem dos rios, e no caso do rio Imbé, em ambientes sombreados pela mata ciliar.

Hendry *et al.* (1987) verificaram que a degradação de clorofila pode estar relacionada à ocorrência de estresse ambiental. Assim, alterações na razão clorofila a/b em aguapé também podem estar relacionadas com a concentração dos poluentes despejados no RPS. Em águas poluídas por metais, plantas aquáticas agem como bioabsorventes. Neste contexto, macrófitas flutuantes são particularmente usadas na redução e monitoramento de metais pesados, já que elas formam bancos e atingem o equilíbrio com o meio que as circunda dentro de um curto período (Muramoto & Oki, 1983; Rai *et al.*, 1995b; Maria *et al.*, 2001). Entretanto, o aumento na relação clorofila a/b observado nas plantas provenientes do médio e alto RPS sugerem que elevadas taxas de radiação solar possam ter influenciado esta relação. Segundo Ito *et al.* (1996), as clorofilas a e b são interconvertidas no ciclo das clorofilas e formam complexos de clorofila-proteína que são importantes na regulação e organização do FS_{II}.

Quando analisada a concentração de carotenóides no segundo ano de coleta verificou-se que os maiores valores ocorreram no período seco nas plantas do rio Imbé e alto RPS. Estes valores elevados indicam que neste período (baixa luminosidade, portanto menor efeito fotoinibitório) possa ter havido a concentração de contaminantes ambientais. No caso do alto RPS a explicação seria o aumento nas concentrações dos materiais de origem antropogênica despejados neste trecho do RPS que induziram um aumento deste pigmento. Já no caso do rio Imbé, por este teoricamente estar livre de contaminantes, era esperado valores inferiores aos encontrados, o que nos leva a sugerir que possa de fato ter havido uma contaminação ambiental de origem desconhecida (possivelmente um agente

xenobiótico). Outro fato que pode ter contribuído para esse aumento é a herbivoria causada por insetos observada nesta última coleta nas plantas do rio Imbé.

Carotenóides são reconhecidos como importantes antioxidantes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Eles podem interagir com oxigênio singleto e radicais livres, prevenindo processos potencialmente letais, tais como peroxidação de lipídios. Mishra *et al.* (2007) verificaram que plantas de aguapé intoxicadas com Cd aumentaram o conteúdo de carotenóides quando elevadas concentrações deste metal foram utilizadas, mostrando que estas plantas podem se adaptar a mudanças na concentração deste metal através do ciclo das xantofilas. Muitas plantas mostram grandes diferenças no nível absoluto de carotenóides e habilidade para sintetizar zeaxantina em resposta a condições de estresse (Kenneth *et al.*, 2000). No entanto, é importante ressaltar que os fotossistemas II são fotoprotégidos pelo mecanismo de dissipação de energia dependente do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams & Adams, 1996; Gilmore, 1997; Merzlyak & Solovchenko, 2002). Este mecanismo é controlado por *feedback* sendo ativado quando a folha está sob níveis excessivos de luz, ou sujeitas a concentrações elevadas de metais pesados, contribuindo com a dissipação do excesso de energia luminosa absorvida na forma de calor. O aparelho fotossintético é capaz de uma reorganização dinâmica em resposta às mudanças de intensidade e qualidade de luz (Ohtsuka *et al.* 1997).

As xantofilas têm grande importância na proteção do aparelho fotossintético devido a sua ação na dissipação da energia térmica que evita a formação do oxigênio singleto no centro de reação do FS_{II} (Silva, 1998; Gonçalves *et al.*, 2001; Merzlyak & Solovchenko, 2002; Burns *et al.*, 2003). Aumento nas concentrações destes pigmentos foi verificado quando plantas de aguapé foram expostas a elevadas concentrações de metais pesados (Hu *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2007). Sob condições de estresse tais como excesso de energia luminosa, a violaxantina é convertida rapidamente em zeaxantina, liberando na forma de calor o excesso de energia que chega aos fotossistemas (Demmig-Adams & Adams, 1996). Assim, os maiores teores de carotenóides encontrados em aguapé no médio e alto RPS no período chuvoso do primeiro ano de estudo e nas amostras das plantas do rio Imbé no segundo ano de estudo, podem ser indicativos de um mecanismo protetor da planta contra os efeitos de poluentes no ambiente, excesso de energia luminosa ou herbivoria.

De maneira geral, neste estudo foi verificada uma correlação positiva entre o

conteúdo de pigmentos carotenóides e os parâmetros de dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ) no aguapé. Assim, é possível que esta planta se utilize deste mecanismo para evitar o comprometimento do aparelho fotossintético e manter o rendimento do processo.

6.3. Análises Anatômicas e Ultraestruturais

6.3.1. Microscopia Óptica (MO)

Os dados obtidos neste trabalho indicaram que o padrão anatômico do mesofilo de aguapé apresenta-se composto por feixes vasculares colaterais que são intercalados por regiões de parênquima clorofiliano frouxo, com lacunas de ar corroborando os resultados de Mahmood *et al.* (2005). Segundo estes autores o mesofilo de aguapé é diferenciado em parênquima paliçádico e parênquima lacunoso. A camada de parênquima paliçádico está presente tanto na parte superior (com 5 a 7 camadas de células), abaixo da epiderme adaxial, quanto na parte inferior (com 2 a 3 camadas de células), acima da epiderme abaxial. O parênquima lacunoso consiste de grandes espaços de ar envolvidos por células com paredes celulares delgadas e cheias de cloroplastos (Mahmood *et al.*, 2005). A presença de lacunas de ar nos diferentes órgãos está relacionada à manutenção da maior eficiência de trocas gasosas (Coan *et al.*, 2002), além do auxílio na flutuação da planta, representando adaptações ao ambiente aquático.

No geral as plantas de aguapé apresentaram células parenquimáticas levemente plasmolisadas (exceto no médio RPS no período seco de 2005). Segundo Van Steenis (1957) e Sculthorpe (1967), as plantas aquáticas normalmente apresentam grandes variações fenotípicas, incluindo modificações nas estruturas caulinares e foliares. Assim, muitas plantas têm seu desenvolvimento diretamente associado às variações do ambiente em que se encontram. Possivelmente variações no ambiente de coleta do médio RPS no período seco de 2005 (Fig. 12 C) possam ter levado a alterações na turgescência, que não se repetiram nas demais coletas.

Plantas de aguapé do médio RPS apresentaram redução no tamanho das células da epiderme adaxial no período seco de 2006 (Fig. 19 C). Isto sugere que neste período as plantas de aguapé deste trecho do RPS poderiam estar expostas a algum agente estressante a que outras amostras não tiveram contato. Mahmood *et al.* (2005) verificaram redução significativa no tamanho das células da epiderme

adaxial e abaxial em folhas de plantas de aguapé submetidas a rejeitos de indústria têxtil. Do mesmo modo, foi possível verificar que as amostras de plantas de aguapé provenientes do médio e alto RPS apresentaram redução no tamanho das células epidérmicas do pecíolo assim como as células epidérmicas do limbo foliar no período seco de 2005. Mahmood *et al.* (2005) também verificaram redução no tamanho das células epidérmicas do pecíolo de aguapé sob condições de estresse.

Verificaram-se idioblastos nas amostras de limbo provenientes do rio Imbé (Fig. 20 A) durante o período chuvoso de 2007. Estas células são comuns em folhas de Pontederiaceae e segundo Gonzalez (2002) podem conter compostos fenólicos (tanino). Os compostos fenólicos, assim como os cristais de oxalato de cálcio são interpretados como estratégia de defesa que as folhas dispõem contra herbivoria (Turner, 2001; Volk *et al.* 2002). Os compostos fenólicos e cristais são comumente encontrados nas folhas de macrófitas aquáticas, juntamente com esclereídes e células amilíferas (Sculthorpe, 1985; Gonzales, 2002). Apenas na última coleta, plantas provenientes do rio Imbé apresentaram herbivoria em relação às plantas de aguapé dos demais pontos de coleta, representando assim uma condição de estresse.

As raízes (zona de absorção) apresentaram grandes espaços de ar com trabéculas e partições (aerênquima) de células parenquimáticas. Stützel (1988) inferiu que as espécies que formam o parênquima cortical com aerênquima são aquelas que crescem em solos encharcados ou ambientes alagados, o que pode ser confirmado com os resultados obtidos no presente trabalho. A principal função de um tecido aerenquimatoso altamente compartimentalizado em plantas aquáticas é a estabilidade mecânica (Williams & Barber, 1961). Esses autores sugerem que nesse tecido fica preservado o mínimo de oxigênio requerido de um ambiente aquático, pobre em oxigênio, e que os canais de ar nas partes aéreas das plantas aquáticas suprem o oxigênio das raízes.

No presente estudo, verificou-se a presença de estruturas que possivelmente são cristais de oxalato de cálcio no feixe vascular das raízes de aguapé (Fig. 17, 18, 21 e 22). Cristais de oxalato de cálcio e compostos fenólicos foram reportados como uma forma de mitigar a toxicidade de metais em plantas, incluindo macrófitas flutuantes (Rauser, 1999).

A zona de absorção das raízes das plantas coletadas no médio RPS no período seco de 2006 apresentou uma redução do número de camadas de células

do córtex interno. Mahmood *et al.* (2005) observaram redução no número de camadas de células parenquimáticas do córtex interno das raízes de plantas de aguapé crescidas em rejeito de indústria têxtil. Isto sugere que no trecho do médio RPS as plantas de aguapé possam estar sofrendo um maior aporte de substâncias nocivas (xenobióticos) em relação ao controle.

6.3.2. Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

No geral, as folhas de aguapé provenientes do rio Imbé apresentaram maior quantidade de grãos de amido, indicando a eficácia do processo fotossintético nestas plantas. Além disso, as organelas ocuparam posição marginal, sugerindo integridade do vacúolo (Fig. 23 A e B). Também foi possível observar que os cloroplastos exibiram sua estrutura típica, com formato de elipse (Fig. 23 A). Nas micrografias obtidas nota-se o estroma e a integridade das membranas dos tilacóides, com o empilhamento característico dos mesmos.

No presente estudo, o volume do estroma aumentou nos cloroplastos de aguapé do médio RPS (Fig. 24 B, B1e B2; 26 C e G; 27 C), sendo que esta alteração persistiu independente dos períodos de coleta (seco ou chuvoso). O aumento do volume do estroma é uma característica típica de plantas em resposta ao estresse (Rangel *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2004; Vitória *et al.*, 2004; Vitória *et al.*, 2006). Plantas de rabanete (*Raphanus sativus* L.) tratadas com 1.0 mM CdCl₂ exibiram cloroplastos mais inchados devido ao aumento no volume do estroma (Vitória *et al.*, 2004). O mesmo foi observado em plantas estressadas que não cresceram em presença de metais pesados, tal como cloroplastos de maracujá em resposta ao metil jasmonato (Rangel *et al.*, 2002) e os cloroplastos de plântulas de arroz expostos a clorato (Borges *et al.*, 2004).

No geral, as plantas de aguapé provenientes do médio RPS não apresentaram grãos de amido, independente do período de coleta. Estes dados sugerem que haja uma menor eficácia do processo fotossintético em função do aporte de material antropogênico neste trecho do RPS. Molas (2002) observou que os cloroplastos de plantas couve (*Brassica oleracea*) tratadas com Ni (II) - Glu não continham grãos de amido.

No período chuvoso do segundo ano de coleta, observou-se que as plantas de aguapé do rio Imbé sofreram algum tipo de estresse que levou ao acúmulo de plastoglóbulos dentro dos cloroplastos (Fig. 27 E). Plastoglóbulos também foram

observados em plantas provenientes do médio e alto RPS. Estas estruturas em geral contêm corpos lipídicos produzidos pelos plastídios (Lichtenthaler, 1968). Tem sido proposto que, assim como os corpos lipídicos formados pelo retículo endoplasmático (Fernandez & Staehelin, 1987), plastoglóbulos podem ser envolvidos por uma monocamada lipídica reforçada com proteínas (Kessler *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Durante a senescência, o número de plastoglóbulos aumenta com a degradação dos tilacóides. O número de plastoglóbulos também aumenta em plantas sujeitas às condições ambientais que aumentem o estresse oxidativo no aparelho fotossintético. Isto inclui o aumento das concentrações de CO₂ (Sallas *et al.*, 2003), aumento nas concentrações de ozônio (Britvec *et al.*, 2001), exposição a complexos orgânicos Ni(II)-Glutamato (Molas, 2002), infecção viral (Hernandez *et al.*, 2004). Outra possível causa da grande presença de plastoglóbulos nas folhas de aguapé do rio Imbé poderia ser em função da herbivoria sofrida por estas plantas neste período. Deste modo, é possível inferir que as plantas estudadas no final do período chuvoso de 2007 sofreram algum dano que levou ao aumento da síntese de plastoglóbulos como mecanismo de defesa.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos através dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* para as plantas de aguapé permitem concluir que durante o período de estudo, as atividades antrópicas que alteram as características físico-químicas do RPS não afetaram o seu desempenho fotoquímico, visto que o rendimento quântico máximo do FS_{II} (F_v/F_m) apresentou-se dentro dos limites aceitáveis para uma planta sadia. Desta forma, não se confirmou a hipótese de que aguapé apresente sinais estresse quanto ao seu rendimento fotoquímico quando sujeito a diferentes cargas de poluentes ambientais ao longo do RPS. Também não confirmamos a hipótese do efeito temporal e espacial no rendimento fotossintético de aguapé.
- O uso da razão F_v/F_0 permite uma melhor discriminação das diferenças no rendimento quântico do FS_{II} em plantas de aguapé que a razão F_v/F_m .
- Os resultados da dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ), revelaram que as plantas provenientes das regiões do médio e alto RPS dissipam mais energia na forma de calor durante o período seco quando comparados com o

controle. Apesar disso, não houve variação temporal entre os períodos de coleta. Isto sugere que os locais de coleta foram mais importantes que o período e/ou ano de estudo.

- Os carotenóides apresentaram correlação positiva com os parâmetros de dissipação não-fotoquímica (q_N e NPQ), sugerindo que as plantas de aguapé quando se deparam com algum tipo de estresse ambiental, seja ele físico (intensidade luminosa), químico (exposição à rejeitos de origem antrópica ex.: metais pesados e pesticidas) ou biológico (herbivoria), podem ativar o ciclo das xantofilas como forma de evitar que a planta sofra algum tipo de dano no seu aparelho fotossintético.
- Os dados de microscopia confirmaram a hipótese de que os efeitos dos poluentes promovem alterações anatômicas e ultraestruturais em aguapé ao longo do RPS. Apesar de as plantas de aguapé do médio e alto RPS terem apresentado algumas alterações anatômicas (MO) e ultraestruturais (MET) mais aparentes que o controle, estas não ocorreram de maneira drástica, pois a integridade das células, cloroplastos e membranas das organelas foram mantidas.
- O médio RPS foi a porção do rio onde as plantas apresentaram os sintomas/indicações de maior exposição à xenobióticos. Entretanto, as alterações ecofisiológicas, anatômicas e ultraestruturais apresentadas parecem ser suficientes para a manutenção do processo fotoquímico em aguapé. Assim, rejeitamos a hipótese de que as alterações estruturais em aguapé se refletem na redução da eficiência fotoquímica e/ou vice versa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.R., FRYER, M.J., BAKER, N.R. (1995) Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany*. 46: 1195 – 1203.
- ANGELOV, M., T. TSONEV, A. UZUNOVA, GAIDARDJIEVA, K. (1993) Cu²⁺ effect upon photosynthesis, chloroplast structure, RNA and protein synthesis of pea plants. *Photosynthetica*. 28:341-350.
- ARDUINI, I.; GODBOLD, D.L.; ONNIS, A. (1996) Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97:111-117.
- BACARIN, M.A.; MOSQUIM, P.R. (2002) Cinética de emissão de fluorescência das clorofilas de dois genótipos de feijoeiro. *Ciências agrotécnicas*, Lavras. v.26, n.4: 705-710.
- BAIRD, C. (2002) Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 622p
- BAKER, N.R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. v.81, n.4: 563-70.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*. 55(403): 1607-1621.
- BARBOSA, J.P.S., VALERIANO, M.M., SCOFIELD, G.B. (2005) Cálculo do excedente hídrico no alto curso do Rio Paraíba do Sul, SP. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil. INPE, p. 2463-2470.
- BILGER, W., BJÖRKMAN, O. (1990) Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25:173-185.
- BIZERRIL, C.R.S.F., ARAÚJO, L.M.N., TOSIN, P.C. (1998) Contribuição ao conhecimento da Bacia do Rio Paraíba do Sul: Coletânea de estudos. ANEEL: CPRM.128p.
- BJÖRKMAN, O., DEMMING, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:61-66.

- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P., BAKER, N.R. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*. 3:497-514.
- BORGES, R., MIGUEL, E.C., DIAS, J.M.R., DA CUNHA, M., SMITH, R.B., OLIVEIRA, J.G., SOUZA FILHO, G.A. (2004). Ultrastructural, physiological and biochemical analyses of chlorate toxicity on rice seedlings. *Plant Sci.*166, 1057-1062.
- BOZZOLA, J.J., RUSSEL, L.D., 1992. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones & Bartlett, Boston. 542p.
- BRITVEC, M.; REICHENAUER, T.; SOJA, G.; LJUBESIC, N.; EID, M.; PECINA, M. (2001) Ultrastructure changes in grapevine chloroplasts caused by increased tropospheric ozone concentrations. *Biologia (Bratisl.)* 56: 417–424.
- BRON, I.U., RIBEIRO, R.V., AZZOLINI, M., JACOMINO, A.P., MACHADO, E.C. (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to evaluate the ripening of “Golden” papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 33: 163-173.
- BROOKES, A.J., COLLINS, C.J., THURMAN, D.A. (1981) The mechanism of zinc tolerance in grasses. *Journal of Plant Nutrition*. 3: 695-700.
- BROOKS, R.R., LEE, J., REEVES, R.D., JAFFRE, T. (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. *Journal Geochemical Exploration*. 7: 49-57.
- BURKEN, J. G.; SCHNOOR, J. L. (1996) Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J. Environ. Engin.* 122: 958-963.
- BURNS, J., FRASER, P. D., BRAMLEY, P.M. (2003) Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophyll in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*. 62: 939-947.
- CAMPANELI, L.B.S., SOUZA, M.C.M.; REZENDE, C.E., MONNERAT, P.H., ALMEIDA, M.G., AZEVEDO, R.A., VITÓRIA, A.P. (2008) Spatial and temporal variation of heavy metals in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth) in the Paraíba do Sul River. *Environmental Experimental Botany* (submitted).
- CAMPBELL, S., MILLER, C., STEVEN, A., STEPHENS, A. (2003) Photosynthetic responses of two temperate seagrasses across a water quality gradient using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 291: 57-78.

- CARVALHO, C.E.V., OVALLE, A.R.C., REZENDE, C.E., MOLISANI, M.M., SALOMÃO, M.S.M.B., LACERDA, L.D. (1999) Seasonal variation of particulate heavy metals in the Lower Paraíba do Sul River, R.J., *Brazilian Environmental Geology*. 37(4):297-302.
- CEIVAP - Comitê para integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul (2001) Bacia do rio Paraíba do Sul; Livro da Bacia. Projeto Pró Água/ MMA/ ANA/ Banco Mundial/ UNESCO; Brasília. Sítio <http://www.ceivap.org.br/> Capturado 1º/10/06.
- CHUA, H. (1998) Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in Guangdong Province of China. *The science of total environment*. 214:79-85.
- COAN, A.I., SCATENA, V.L., GIULIETTI, A.M. (2002) Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae Brasileiras. *Acta bot. Brás.* 16(4):371-384.
- COSTA, E.S, BRESSAN-SMITH, R., OLIVEIRA, J.G., CAMPOSTRINI, E.(2003) Chlorophyll *a* fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica*. 41:77-82.
- CUNHA, C.L.N., ROSMAN, P.C.C, MONTEIRO, T.C.N. (2003) Avaliação da poluição em rios usando modelagem computacional. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 8(3): 126-134.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS, W.W. (1996) The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*. 1(1): 21-26.
- ELEFTERIOU, E.P., KARATAGLIS, S. (1989) Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper-polluted fields. *Botanica Acta* 102: 134–140.
- FEEMA (1991) Perfil ambiental: Município de Volta Redonda – Rio de Janeiro. 98p.
- FEEMA (2007) Fundação Estadual de Engenharia de Meio Ambiente. <http://www.feema.rj.gov.br/bacia-rio-paraiba-sul.asp?cat=75>. Capturado em 18/11/07.
- FERNANDEZ, D.E., STAEHELIN, L.A. (1987) Does gibberellic-acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells? *Plant Physiol*. 85: 487–496.

- FERNANDO, C.L., FERNANDO, S.H. (1994) Subcellular localization of copper and partial isolation of copper proteins in roots from rice plants exposed to excess copper. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21:427-436.
- FIGUEIREDO, R.O. (1999). Transporte de carbono e nitrogênio no Baixo Paraíba do Sul: fluxos e processos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes. 177p.
- FÖRSTNER, U., WITTMANN, F.M. (1983) Metal pollution in the aquatic environment. Springer – Verlag, Berlin, 486 pp.
- FOSTER, I.D.L., CHARLESWORTH, S.M. (1996) Heavy metals in the hydrological cycle: Trends and explanation. *Hydrological Processes*.10: 227-261.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J-M., BAKER, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica and Biophysica Acta*, 990: 87-92.
- GILMORE, A.M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant*. 99: 197-209.
- GIMENO-GARCIA. E., ANDREU, V. BOLUDA, R. (1996) Heavy metals incidence in application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution*. 92(1):19-25.
- GONÇALVES, G.M. (2003) Dinâmica e fluxo de metais pesados nas frações particulada e dissolvida no estuário do rio Paraíba do Sul, RJ, sob diferentes condições de maré e vazão fluvial. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 110p.
- GONÇALVES, J.F.C.; MARENCO, R.A.; VIEIRA, G. (2001) Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 13(2): 149-157.
- GONZALEZ, A.M. (2002). Anatomia del vástago em espécies selectas de plantas hidrófitas:431-450. –In:ARBO, M.P.; OBERHOLZER, I. G. Flora del Ibero. Eudenne, Corrientes.
- GOPAL, B. (1987) Water hyacinth, Aquatic Plant Study, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo, 471p.

- GUILHERME, I.R.G., MARCHI, G. (2004) Os metais pesados no solo s/d. DBO Agrotecnologia <http://www.anda.org.br/portug/artigos/MetaisPesados.pdf> Capturado em 20/10/06.
- GUPTA, S.C., GOLDSBROUGH, P.B. (1991). Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. *Plant Physiology*. 97:306-312.
- HECKATHORN, S.A., MUELLER, J.K., LAGUIDICE, S., ZHU, BARRETT, T., BLAIR, B., DONG, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91(9): 1312-1318.
- HENDRY, G.A.F., HOUGHTON, J.D., BROWN, S.B. (1987) The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytologist*. 107: 255-302.
- HENDRY, G.A.F., PRICE, A.H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F., GRIME, J.P. (eds). *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman & Hall, London, 148-152.
- HERNANDEZ, J. A., RUBIO, M., OLMOS, E., ROS-BARCELO, A., MARTINEZ-GOMEZ, P. (2004) Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum* 122: 486–495.
- HISCOX, J.D., ISRAELSTAM, G.F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*. 57(12):1332-1334.
- HU, C., ZHANG, L., HAMILTON, D., ZHOU, W., YANG, T., ZHU, D. (2007) Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* (Mart.). *Hydrobiologia*. 579:211–218.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Brasil em síntese (2006) Sítio: http://www.ibge.gov.br/brasil_em_sintese/default.htm Capturado em 10/10/07.
- ITO, H., OHTSUKA, T., TANAKA, A. (1996) conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 1475-1479.
- KENNETH, E., PALLETT, K.E., YOUNG, A.J. (2000) Carotenoids. Antioxidants in higher plants. In Ruth G. Alscher & John L. Hess (Eds.), (pp. 60–81). CRC Press.
- KESSLER, F., SCHNELL, D. BLOBEL, G. (1999) Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208: 107–113.

- KIEKENS, L.. Zink. In: ALLOWAY, B.J. (1990) Heavy metals in soils. Glasgow: Blackie and Son. p.261-277.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-349.
- KRUPA, Z., ÖQUIST, G., HUNER, N.P.A. (1993) The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*. 88: 626-630.
- KÜPPER, H., KÜPPER, F., SPILLER, M. (1996) Environmental relevance of heavy metal-substitute chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*. 47: 259-266.
- LHANO M.G. (2002) Aspectos biológicos e ecológicos de *Cornops aquaticum* (Bruner, 1906) Orthoptera: Acrididae) em *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae) no Pantanal de Poconé, Mato Grosso. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociências, Cuiabá, Brasil, 123p.
- LICHTENTHALER, H.K. (1968) Plastoglobuli and fine structure of plastids. *Endeavour*. 27: 144–148.
- LICHTENTHALER, H.K., BUSCHMANN, C., DOLL, M., FIETZ, H.-J., BACH, T., KOZEL, U., MEIER, D., RAHMSDORF, U. (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research*. 2: 115-141.
- LIU, D., KOTTKE, I. (2004) Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *Journal of Bioscience*. 29:329-335.
- LU, X., KRUATRACHUE, M., POKETHITIYOOK, P., HOMOYOK, K. (2004) Removal of cadmium and Zinc by Water Hyacinth *Eichhornia crassipes*. *Science Asia*.30: 93-103.
- MAHMOOD, Q., ZHENG, P., SIDDIQI, M., ISLAM, E., AZIM, M., HAYAT, Y. (2005) Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater *Journal of Zhejiang University Science B*. 6(10): 991–998

- MALLICK, N., MOHN, F.H. (2003) Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 55 (1): 64-9.
- MALM, O. (1986) Estudo da poluição por metais pesados no sistema rio Paraíba do Sul-rio Guandú (RPS-RG) através da metodologia de abordagem pelos parâmetros críticos. Dissertação de mestrado, IBVVF, UFRJ.127p.
- MANAHAN, S.E. (1997) Environmental Science and Technology. Lewis Publishers, New York, 641p.
- MARENGO, J.A., ALVES, L.M. (2005) Tendências Hidrológicas da Bacia do Rio Paraíba do Sul. INPE
- MARIA, A.M., MARIA, V.D., NOEMI, L.S. (2001) Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Research*, 35(11): 2629–2634.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345): 659-668.
- MAZEN, A.M.A., EL MAGHRABY, O.M.O. (1998) Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biologia Plantarum* 40(3): 411-417.
- MERZLYAK, M.N., SOLOVCHENKO, A.E. (2002) Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Science* v.163: 881-888.
- MIRANDA, V., BAKER, N.R., LONG, S.P. (1981) Limitations of photosynthesis in different regions of the *Zea mays* leaf. *New Phytologist*. 89:179-190.
- MISHRA, K.K., RAÍ, U.N., PRAKASH, O. (2007) Bioconcentration and Phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. *Environ Monit Assess* .130: 237–243.
- MOCQUOT, B., VANGRONSVELD, J., CLIJSTERS, H., MENCH, M. (1996) Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants : effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant and Soil*.182:287-300.
- MOLAS, J. (2002) Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*. 47: 115-126.
- MUEHE, D., VALENTINI, E. (1998). O litoral do Estado do Rio de Janeiro, uma caracterização físico-ambiental. Rio de Janeiro: FEMAR.

- MURAMOTO, S., OKI, Y. (1983) Removal of some heavy metals from polluted water by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 30: 170–177.
- NEUMANN, D., LICHTENBERGUER, O., GUNTER, D., TSCHIERSCH, K., NOVER, L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*. 194: 360-367.
- OHTSUKA, T., ITO, H., TANAKA, A. (1997) Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a and the assembly of chlorophyll with apoproteins by isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 113: 113-137.
- OLIVEIRA, J.G., ALVES, P.L.C.A., MAGALHÃES, A.C. (2002) The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14(2): 95-104.
- OUZOUNIDOU, G., MOUSTAKAS, M., STRASSER, R.J. (1997) Sites of action of copper in the photosynthetic apparatus of maize leaves : Kinetic analysis of chlorophyll fluorescence, oxygen evolution, absorption changes and thermal dissipation as monitored by photoacoustic signals. *Australian Journal of Plant Physiology*. 24:81-90.
- OVALLE, A.R.C., CARVALHO, C.E.V., RESENDE, C.E.R., SILVA, C.F., SALOMÃO, M.S.M.B., MOLISANI, M.M. (1997) Dissolved nutrients fluxes in Paraíba do Sul River, Rio de Janeiro, Brazil. Anais de BIOGEOMON: The third International Symposium on Ecosystem Behavior, Villanova, PA, USA. J. Conf. Abs 2 (2):264.
- PANDEY, S., ASTHANA, R.K., KAYASTHA, A.M., SINGH, N., SINGH, S.P. (1999) Metal uptake and thiol production in *Spirodela polyrhiza* (L.) SP[20]. *Journal of Plant Physiology*. 154: 634-640.
- PÄTSIKKÄ, E., KAIRAVUO, M., SÊRSÊN, F., ARO, E.M., TYYSTJÄRVI, E. (2002) Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. *Plant Physiology*. 129: 1359–1367.
- PEDROSA, P., CALASANS, C.V.C., REZENDE, C.E., (1999) Particulate and dissolved phases as indicators of limnological and ecophysiological spatial variation in Cima Lake System, Brazil: A case study. *Hydrobiologia* (The Hague), Holanda. 411(1-3): 89-101.

- PORTER, J.R., SHERIDAN, R.P. (1981) Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and simulated acid rain. *Plant Physiology*. 68(1): 143-148.
- POSPÍSIL, P. (1997) Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica*. 34(3): 343-355.
- POTT, V.J., POTT, A. (2000) Plantas Aquáticas do Pantanal. EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS). – Brasília : Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 404p.
- RAI, U.N., SINHA, S., TRIPATHI, R.D., CHANDRA, P. (1995b) Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. *Ecological Engineering*. 157: 1–8.
- RAI, U.N.; TRIPATHI, R. D.; SINHA, S.; CHANDRA, P. (1995a) Chromium and cadmium bioaccumulation and toxicity in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle and *Chara coralline* Willdenow. *Journal of Environmental Science and Health*.30(3): 537–551.
- RALPH, P.J., BURCHETT, M.D. (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*.103: 91-101.
- RANGEL, M., MACHADO, O.L.T., DA CUNHA, M., JACINTO, T., 2002. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry*. 60, 619-625.
- RAUSER, W.E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys*. 31: 19-48.
- REILLY, C. (1972) Amino acids and amino acid-copper complexes in water-soluble extracts of copper-tolerant and non-tolerant *Becium homblei*. *Z. Pflanzenphysiol*. 66: 294-296.
- RÜEGSEGUER, A., BRUNOLD, C. (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology*. 99:428-433.
- SALLAS, L., LUOMALA, E.M., UTRIAINEN, J., KAINULAINEN, P., HOLOPAINEN, J.K. (2003) Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree Physiol*. 23: 97–108.
- SALOMÃO, M.S.M.B. (1999) Dinâmica de metais pesados nas frações particulada e dissolvida na porção inferior do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro. Tese

- (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82p.,
- SAYED, O.H. (2003) Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41 (3): 321-330.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E. D., CALDWELL, M. M. (Ed.) *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin Heidelberg New York:Springer Verlag, p. 49-70
- SCULTHORPE, C. D. (1967) *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Edward Arnold, London.
- SCULTHORPE, H. (1985) *The biology of aquatic vascular plants*. – Edward Arnold, London.
- SEMADS. 2001. *Ambiente das Águas no Estado do Rio de Janeiro*, p. 230.
- SEYBOLD, A., EGGLE, K. (1937) Lichtfeld und Blattfarbstoffe I. *Planta* 26: 491.
- SILVA, D.M. (1998). *Metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo*. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.117p.
- SMITH, M.D., LICATALOSI, D.D., THOMPSON, J.E. (2000) Coassociation of cytochrome f catabolites and plastid-lipid-associated protein with chloroplast lipid particles. *Plant Physiology*. 124: 211–221.
- SOLTAN, M.E. (1999) Behaviour of water hyacinth in river Nile water (Egypt). *Proceedings of the Vth Conference on Engineering in the Chemical Industry*. Hungarian Chemical Society, Budapest. pp. 228-235.
- SOLTAN, M.E., RASHED, M.N. (2003) Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Advances in Environmental Research*. 7:321-334.
- SOUZA, V.C., LORENZI, H. (2005) *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Ed. Instituto Plantarum, 639p.
- STOBART, A.K., GRIFFITHS, W.T., AMEEN-BUKHARI, I., SPERWOOD, R.P. (1985) The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum*, 63: 293–298.

- STOYANOVA, D., CHAKALOVA, E. (1990) The effect of cadmium on the structure of photosynthetic apparatus in *Elodea canadensis* Rich. *Plant Physiology*. 16:18-26.
- STÜTZEL, T. (1988) Untersuchungen zur wurzelanatomie der Eriocaulaceen. *Flora* 180: 223-239.
- THURMAN, D.A., RANKING, A.J (1982) The role of organic acids in zinc tolerance in *Deschampsia caespitosa*. *New Phytology*. 91: 629-634.
- TURNER, I.M. (2001). The ecology of trees in tropical rain forest – Cambridge University press, New York.
- VAN KOOTEN, O., SNEL, J.F.H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- VAN STEENIS, C.G.G. (1957) Specific and intraspecific delimitation. *Flora Malasiana* 1(53): 167-234.
- VERKLEIJ, J.A.C., PAREST, J.E. (1989) Cadmium tolerance and co-tolerance in *Silene vulgaris* (Moench.) Garcke [= *S. cucubalus* (L.) Willd.]. *The New Phytologist*, 111:637-645.
- VESK, P.A., NOCKOLDS, C.E., ALLAWAY, W.G. (1999) Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant cell and environment*. 22: 149-158.
- VITÓRIA, A.P., DA CUNHA, M., AZEVEDO, R.A. (2006). Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 58: 47-52.
- VITORIA, A.P., RODRIGUEZ, A.P.M., CUNHA, M., LEA, P.J., AZEVEDO, R.A. (2004) Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. *Biologia Plantarum*. 47 (4): 561-568.
- VOLK, G., LYNCH-HOLM, V., KOSTMAN, T., FRANCESCHI, V.R. (2002) The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology*. 4:34-45.
- VÖRÖSMARTY, C.J., GREEN, P., SALISBURY, J., LAMMERS, R.B. (2000). Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. *Science*, 289: 284-288.
- WELLBURN, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. 144(3): 307-313.

- WILLIAMS, W.T.; BARBER, D.A. (1961) The functional significance of aerenchyma in plants. *Symposium of the Society of Experimental Biology* 15: 134- 144.
- ZAR, J.H. (1996) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.
- ZENK, M.H.. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene – An International Journal on Genes and Genomes*. 179:21-30.
- ZHU, Y.L., ZAYED, A.M., QIAN, J.H. DE SOUZA, M., TERRY,N. (1999) Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water Hyacinth. *Journal Environmental Quality*. 28: 339-344.

9. APÊNDICES

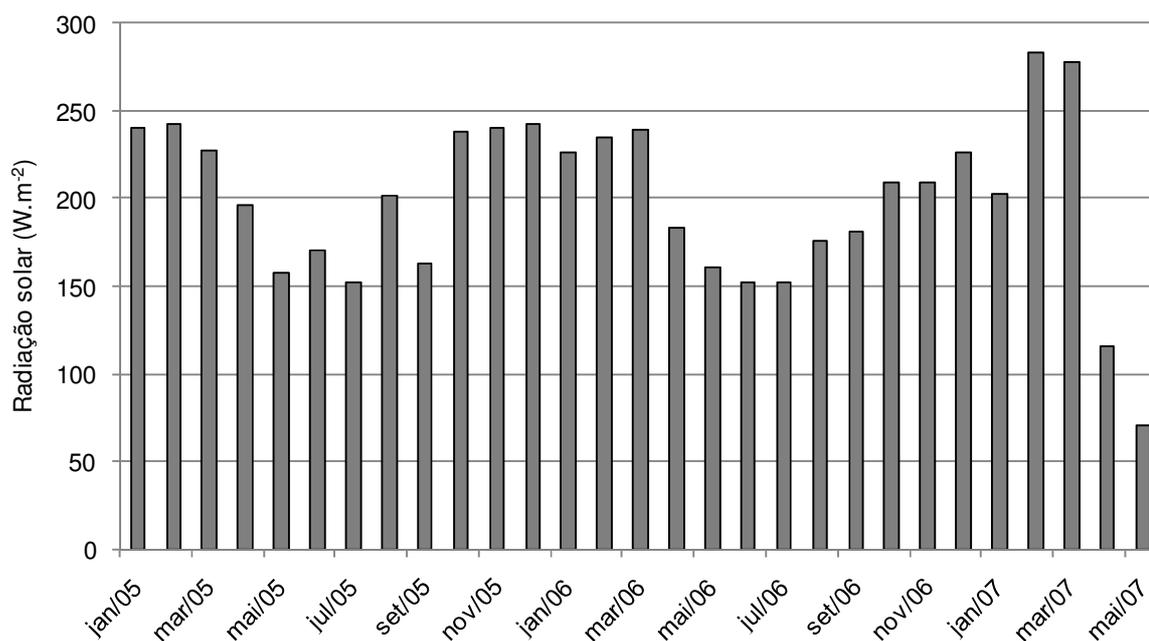
Apêndice 1. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (média \pm erro padrão) determinados em aguapé no rio Imbé e em três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2005 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (seco 2005 com seco 2006; e chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – multifatorial e teste de Tukey). q_N = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso.

Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>				
	Local	Período	q_N	NPQ
1° ano de coleta	IB	SE/2005	0,019 \pm 0,001 AaY	0,025 \pm 0,003 BaY
		CH/2006	0,022 \pm 0,000 AaZ	0,029 \pm 0,001 AaY
	BP	SE/2005	0,026 \pm 0,002 AaY	0,030 \pm 0,002 ABaY
		CH/2006	0,020 \pm 0,002 AaY	0,032 \pm 0,004 AaY
	MP	SE/2005	0,029 \pm 0,002 AaY	0,037 \pm 0,002 ABaY
		CH/2006	0,028 \pm 0,002 AaY	0,040 \pm 0,002 AaY
	AP	SE/2005	0,031 \pm 0,002 AaY	0,045 \pm 0,003 AaY
		CH/2006	0,021 \pm 0,001 AaY	0,033 \pm 0,001 AaY
2° ano de coleta	Local	Período	q_N	NPQ
	IB	SE/2006	0,023 \pm 0,001 ABbY	0,035 \pm 0,002 ABaY
		CH/2007	0,036 \pm 0,003 AaY	0,042 \pm 0,004 AaY
	BP	SE/2006	0,021 \pm 0,001 BaY	0,027 \pm 0,002 BaY
		CH/2007	0,019 \pm 0,002 BaY	0,029 \pm 0,004 AaY
	MP	SE/2006	0,025 \pm 0,002 ABaY	0,034 \pm 0,002 ABaY
		CH/2007	0,026 \pm 0,001 ABaY	0,036 \pm 0,001 AaY
	AP	SE/2006	0,033 \pm 0,002 AaY	0,044 \pm 0,003 AaY
CH/2007		0,027 \pm 0,001 ABaY	0,035 \pm 0,001 AaY	

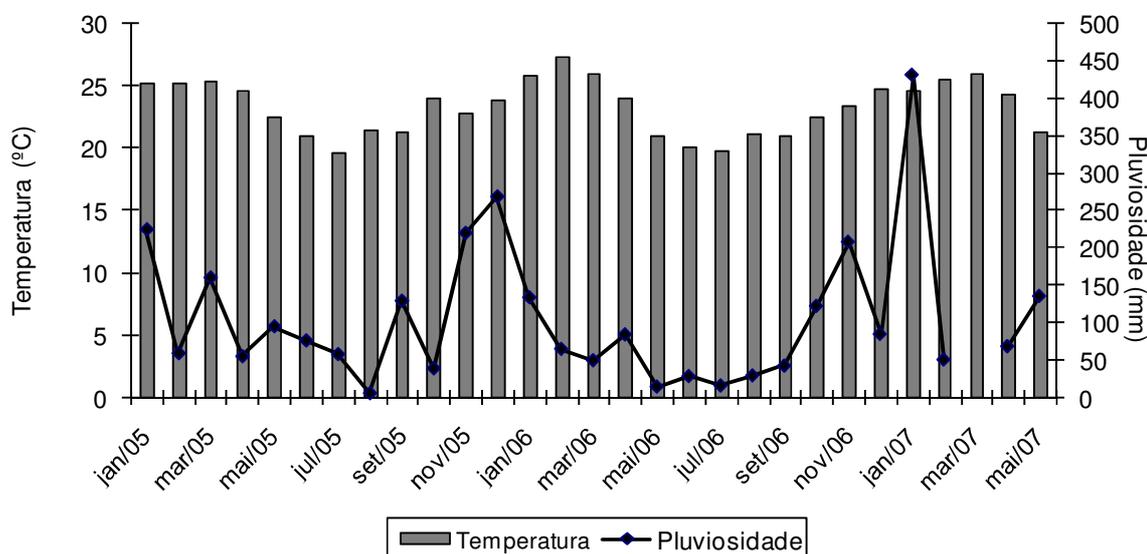
Apêndice 2. Concentrações de pigmentos carotenóides determinados em aguapé (média \pm erro padrão) provenientes do rio Imbé e três pontos no rio Paraíba do Sul (RPS) no período de 2006 a 2007. As letras A, B e C comparam os diferentes locais dentro de cada período de coleta no ano. Letras a e b comparam os períodos dentro de cada local no mesmo ano de coleta. As letras Y e Z comparam o período entre os anos (chuvoso 2006 com chuvoso 2007). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA – *one-way* (1º ano) e *two-way* (2º ano) e teste de Tukey). [Caro] = carotenóides. IM = rio Imbé; BP = baixo RPS; MP = médio RPS; AP = alto RPS; SE = seco e CH = chuvoso.

Concentração dos pigmentos carotenóides			
1º ano de coleta	Local	Período	[Caro] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$
		IB	CH/2006
	BP	CH/2006	0,007 \pm 0,001 BZ
	MP	CH/2006	0,013 \pm 0,001 AY
	AP	CH/2006	0,013 \pm 0,001 AY
2º ano de coleta	Local	Período	[Caro] $\mu\text{mol.cm}^{-2}$
	IB	SE/2006	0,016 \pm 0,001 Aa
CH/2007		0,016 \pm 0,001 AaY	
BP	SE/2006	0,011 \pm 0,001 Ba	
	CH/2007	0,011 \pm 0,001 BaY	
MP	SE/2006	0,011 \pm 0,001 Ba	
	CH/2007	0,013 \pm 0,001 BaY	
AP	SE/2006	0,016 \pm 0,001 Aa	
	CH/2007	0,013 \pm 0,001 BaY	

10. ANEXOS



Anexo 1. Radiação solar média mensal no período de janeiro de 2005 a maio de 2007 para o município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Fonte dos dados: Estação Evapotranspirométrica do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense, PESAGRO-RIO).



Anexo 2. Temperaturas médias mensais e pluviosidade total mensal no período de janeiro de 2005 a maio de 2007 para o município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (Fonte dos dados: Estação Evapotranspirométrica do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense, PESAGRO-RIO).

Anexo 5. Concentrações de Cu (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março).

Cu	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS		
	período seco 2005	período chuvoso 2006	período seco 2005	período chuvoso 2006	período seco 2005	período chuvoso 2006	período seco 2005	período chuvoso 2006	
1º ano de coleta	Limbo foliar	7,00 ± 0,38 CbY	8,00 ± 0,51 BcY	7,00 ± 0,23 BbZ	15,0 ± 2,35 AaY	11,0 ± 0,48 AcZ	13,0 ± 0,00 AcY	7,00 ± 0,38 BbZ	14,0 ± 1,29 AbY
	Peciolo foliar	8,00 ± 0,28 CbY	7,00 ± 0,17 CcY	7,00 ± 0,24 CbY	8,00 ± 1,08 BCbY	11,0 ± 0,03 BcY	11,0 ± 0,55 AcY	7,00 ± 0,21 AbZ	11,0 ± 0,55 AcY
	Raiz jovem	12,0 ± 0,04 CaY	10,0 ± 0,00 CbY	24,0 ± 1,14 AaY	15,0 ± 0,51 BaZ	27,0 ± 0,16 AbY	20,0 ± 0,51 AaZ	18,0 ± 0,24 BaZ	22,0 ± 0,00 AaY
	Raiz adulta	13,0 ± 0,15 DaY	14,0 ± 0,51 AaY	29,0 ± 1,72 BaY	14,0 ± 0,45 AaZ	35,0 ± 0,58 AaY	17,0 ± 0,51 AbZ	19,0 ± 0,07 CaY	17,0 ± 0,51 AbZ
Cu	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS		
	período seco 2006	período chuvoso 2007	período seco 2006	período chuvoso 2007	período seco 2006	período chuvoso 2007	período seco 2006	período chuvoso 2007	
2º ano de coleta	Limbo foliar	10,7 ± 0,29 BcY	6,50 ± 0,69 BbcZ	12,8 ± 0,01 BbY	12,4 ± 0,57 AbY	18,8 ± 2,12 AbY	11,4 ± 0,51 AcZ	8,60 ± 1,24 BbcY	11,3 ± 1,33 AcY
	Peciolo foliar	10,4 ± 0,98 BaY	3,61 ± 0,28 CcZ	14,0 ± 0,50 AbY	10,6 ± 0,63 AbZ	16,2 ± 0,70 AbY	8,40 ± 0,63 ABcZ	5,40 ± 0,53 CcY	6,50 ± 0,55 BcY
	Raiz jovem	13,0 ± 0,54 BaY	8,00 ± 0,96 BabZ	28,1 ± 2,07 AbY	17,8 ± 1,15 AaZ	29,5 ± 1,03 AaY	17,2 ± 0,61 AbZ	11,8 ± 0,44 BbZ	18,3 ± 1,67 AbY
	Raiz adulta	13,0 ± 1,00 BaY	10,3 ± 1,00 CaY	50,8 ± 8,83 AaY	19,7 ± 1,04 BaZ	32,3 ± 1,00 ABaY	27,8 ± 1,00 AaZ	22,8 ± 1,01 BaZ	26,9 ± 1,15 AaY

Campaneli *et al.* (submetido)

Anexo 6. Concentrações de Zn (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março).

	Zn	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
	Partes do vegetal	período seco 2005	período chuvoso 2006						
1º ano de coleta	Limbo foliar	41 ± 3,72 ABbY	27 ± 0,80 CcZ	38 ± 3,19 ABcY	36 ± 0,93 BdY	53 ± 5,68 AbY	58 ± 0,81 AcY	34 ± 2,82 BbZ	52 ± 0,38 AdY
	Peciolo foliar	44 ± 2,07 BbY	25 ± 0,70 CcZ	30 ± 3,50 CcY	30 ± 0,55 CcY	94 ± 1,94 AbY	59 ± 1,96 BcZ	46 ± 2,80 BbZ	92 ± 0,00 AcY
	Raiz jovem	46 ± 2,16 DbZ	56 ± 0,93 CbY	91 ± 3,57 CaY	64 ± 1,87 CbZ	300 ± 11,02 AaY	138 ± 3,29 BaZ	135 ± 4,37 BaZ	166 ± 1,64 AbY
	Raiz adulta	108 ± 2,35 BaY	67 ± 0,93 DaZ	73 ± 3,16 BbY	78 ± 0,51 CaZ	417 ± 34,76 AaY	113 ± 1,64 BbZ	131 ± 1,33 BaZ	228 ± 2,85 AaY
2º ano de coleta									
	Zn	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
	Partes do vegetal	período seco 2006	período chuvoso 2007						
	Limbo foliar	38,1 ± 2,93 BcY	35,3 ± 0,68 BdY	43,4 ± 2,25 BbZ	56,2 ± 1,12 AbY	122 ± 6,01 AdY	50,5 ± 3,79 AdZ	42,1 ± 4,40 BcY	44,4 ± 4,82 ABcY
Peciolo foliar	40,6 ± 1,30 CcZ	50,6 ± 3,13 BcY	57,3 ± 0,38 BbZ	76,3 ± 1,25 BbY	315 ± 6,93 AcZ	1540 ± 39,4 AcY	45,2 ± 1,34 BCcZ	76,2 ± 4,75 BcY	
Raiz jovem	69,8 ± 3,30 BbY	71,4 ± 5,23 CbY	98,7 ± 8,06 BaZ	202 ± 8,87 BaY	467 ± 58,4 AbZ	3289 ± 49,5 AaY	101 ± 4,10 BbZ	271 ± 16,8 BaY	
Raiz adulta	88,8 ± 2,00 BaZ	117 ± 1,00 BaY	115 ± 1,28 BaZ	211 ± 4,74 BaY	961 ± 21,0 AaZ	2666 ± 237 AbY	134 ± 0,16 BaZ	199 ± 5,26 BbY	

Campaneli *et al.* (submetido)

Anexo 7. Concentrações de Mn (mg/Kg de matéria seca) em tecidos de aguapé coletados em quatro pontos (rio Imbé, baixo, médio e alto RPS) nos períodos seco de 2005 e 2006 e chuvoso de 2006 e 2007. Letras maiúsculas (A, B...) representam a estatística para o mesmo período do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas (a, b...) – comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto de coleta e mesmo período do ano. Y e Z - comparação entre período seco e chuvoso do mesmo ano de coleta para um mesmo ponto de coleta (Tukey 5%). RPS – rio Paraíba do Sul. Período seco (setembro e outubro). Período chuvoso (março).

	Mn	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
		período seco 2005	período chuvoso 2006						
1º ano de coleta	Partes do vegetal								
	Limbo foliar	1841 ± 58,2 AbY	1025 ± 12,5 AcZ	220 ± 11,5 BcZ	471 ± 9,46 CbY	225 ± 1,33 BcZ	433 ± 0,00 DdY	337 ± 5,69 BcY	556 ± 4,47 BdY
	Peciolo foliar	2824 ± 152 AbY	1520 ± 58,4 AbZ	339 ± 8,81 BbZ	518 ± 8,69 DbY	355 ± 3,83 BcZ	659 ± 5,00 CcY	423 ± 18,8 BcZ	864 ± 17,3 BcY
	Raiz jovem	1108 ± 74,9 BbZ	1560 ± 18,9 BbY	595 ± 72,9 CaY	637 ± 31,0 CbY	1189 ± 197 BbZ	1968 ± 47,3 AaY	2911 ± 32,0 AbY	2063 ± 0,00 AbZ
	Raiz adulta	20807 ± 646 AaY	3558 ± 0,00 BaZ	639 ± 23,6 CaZ	2773 ± 67,6 CaY	6361 ± 899 BaY	1039 ± 52,7 DbZ	4777 ± 97,8 BaY	4883 ± 94,6 AaY
	Mn	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
		período seco 2006	período chuvoso 2007						
2º ano de coleta	Partes do vegetal								
	Limbo foliar	1015 ± 18,2 AcY	687 ± 15,8 AcZ	287 ± 12,4 CdZ	552 ± 5,60 BcY	449 ± 6,10 BbY	225 ± 10,1 DbZ	375 ± 33,1 BCbY	328 ± 10,8 CbY
	Peciolo foliar	1506 ± 27,2 AcZ	1742 ± 114 AbY	452 ± 11,5 DcZ	755 ± 16,0 BcY	948 ± 46 BbY	489 ± 6,20 BbZ	726 ± 14,1 CbY	627 ± 30,0 BbZ
	Raiz jovem	3014 ± 69,8 AbY	1997 ± 98,9 AbZ	875 ± 34,3 BbZ	2561 ± 321 AbY	2449 ± 238 AaY	1210 ± 14,9 BaZ	905 ± 11,3 BbZ	2392 ± 74,7 AbY
	Raiz adulta	6746 ± 286 AaY	6608 ± 325 AaY	1242 ± 39,5 DaZ	6981 ± 103 AaY	2673 ± 48,0 CaZ	1719 ± 285 BaY	4363 ± 284 BaY	4691 ± 974 AaY

Campaneli *et al.* (submetido)