

INFLUÊNCIA DO TIPO ECOLÓGICO E DA SAZONALIDADE NA ECOFISIOLOGIA,
ANATOMIA E CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM ESPÉCIES DE *Eichhornia* (Kunt)
EM RIOS DO NORTE FLUMINENSE

JORGE LUÍS DA SILVA SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

ABRIL - 2014

INFLUÊNCIA DO TIPO ECOLÓGICO E DA SAZONALIDADE NA ECOFISIOLOGIA,
ANATOMIA E CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM ESPÉCIES DE *Eichhornia* (Kunt)
EM RIOS DO NORTE FLUMINENSE

Jorge Luís da Silva Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais 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: Dr^a. Angela Pierre Vitória

Campos dos Goytacazes

Abril - 2014

INFLUÊNCIA DO TIPO ECOLÓGICO E DA SAZONALIDADE NOS PROCESSOS
ECOFISIOLÓGICOS, ANATOMIA E CONCENTRAÇÃO DE METAIS EM ESPÉCIES
DE *Eichhornia* (Kunt) EM RIOS DO NORTE FLUMINENSE

Jorge Luís da Silva Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em

Comissão examinadora:

Dr. Bruno dos Santos Esteves (Dr. em Ecologia e Recursos Naturais, Prumo Logística Global)

Dr^a. Marina Satika Suzuki (Dr^a.em Biociência e Biotecnologia, LCA – UENF)

Dr. Guilherme Rodrigues Rabelo (Dr. em Biociência e Biotecnologia, LBCT – UENF)

Dr^a. Angela Pierre Vitória (Dr^a. em Biologia Vegetal, LCA – UENF)
(Orientadora)

À minha tia-avó Emilce Neves da Siva (*in memoriam*)

“O importante e bonito do mundo é isso: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas que elas vão sempre mudando. Afinam e desafinam”

Guimarães Rosa

Agradecimentos

À Deus, por me dar força e coragem para conseguir chegar até aqui. **Obrigado Senhor!**

À minha avó Aildes Teixeira dos Santos, pelo apoio de todas as horas, pelo carinho e amor incondicional, por entender minha ausência apesar da saudade e sempre ter uma palavra de conforto em todos os momentos. **Obrigado Vó!**

À minha mãe Ana Cristina da Silva, pelo sonho que sonhamos juntos e hoje concluímos mais uma etapa. **Obrigado Mãe!**

À Dr^a Angela Pierre Vitória, pela atenção, pelos conselhos, pela amizade a mim ofertada, por acreditar em mim como pesquisador e pela confiança depositada no meu trabalho. **Obrigado Angela!**

À Dr^a Cristina Maria Magalhães de Souza, pela amizade, companheirismo e preciosos conselhos. **Obrigado Cristal!**

À Dr^a Maura da Cunha e seu grupo de pesquisa, principalmente Dr. Guilherme Rodrigues Rabelo e Ms. Saulo Pireda pela ajuda no desenho experimental e análises dos dados de microscopia desta Pesquisa. **Obrigado galera do LBCT!**

Aos técnicos da UENF, Edilma, Gerson, Beatriz e Ana Paula pela ajuda e amizade no decorrer destes dois anos de mestrado. **Obrigado!**

Aos amigos Adélia Rocha, Bruno Mello, Camila Ventura, Laura Helena que fizeram esta caminhada muito mais divertida e alegre. Sofremos juntos, estudamos juntos, sorrimos juntos e aprendemos juntos. Vocês foram e sempre serão minha família acadêmica. **Obrigado turma!**

Ao grupo de Ecofisiologia Vegetal, Tati, Andresa, Milena e Maria Angélica. Obrigado pelo convívio, amizade e infinitas horas de bancada e campo. **Obrigado grupo!**

Aos amigos do Laboratório de Ciências Ambientais, Mariana Deprá, Marcelita, Juliana, Inácio, Annalisa, Clara Ayume, Geovana, Beatriz e Lucas. **Obrigado pela amizade!**

Ao Laboratório de Ciências Ambientais, pelo apoio e logística para o desenvolvimento desta pesquisa. **Obrigado LCA!**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pelo apoio e logística para o desenvolvimento desta pesquisa! **Obrigado PPGERN!**

À UENF, pela estrutura e apoio logístico! **Obrigado UENF!**

À FAPERJ, pela concessão da bolsa. **Obrigado FAPERJ**

Lista de abreviaturas e siglas

°C – graus Celsius

ANOVA – Análise de variância

Caro – carotenoides

Cd – cádmio

CEIVAP – Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul

Clo *a* – Clorofila *a*

Clo *b* – Clorofila *b*

CO₂ – gás carbônico

Cr – cromo

Cr³⁺ – cromo trivalente

Cu – cobre

DMSO – dimetilsulfóxido

ES – Espírito Santo

F₀ – fluorescência mínima

F_m – fluorescência máxima

PSII – fotossistema II

F_v – Fluorescência variável

F_v/F₀ – rendimento quântico variável

F_v/F_m – rendimento quântico da fluorescência clorofila *a*

g – grama

HF – ácido fluorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

ICP – OES – Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

INEA – Instituto Estadual do Ambiente

L – litro

LBCT – Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

LCA – Laboratório de Ciências Ambientais

Mg – magnésio

MG – Minas Gerais

mL – mililitro

MPS – material particulado em suspensão

n – número de amostras

O₂ – oxigênio

p<0,05 – probabilidade de erro do teste estatístico menor que 0,05.

PC1 – componentes principais 1

PC2 – componentes principais 2

PCA – Análise dos componentes principais

PCH – pequena central hidrelétrica

pH – potencial hidrogeniônico

qN – *quenching* não fotoquímico

qNP – *quenching* não fotoquímico

qP - *quenching* fotoquímico

RFA – radiação fotossinteticamente ativa

RI – Rio Itabapoana

RJ – Rio de Janeiro

RPS – Rio Paraíba do Sul

SP – São Paulo

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense

μg – micrograma

μL – microlitro

Zn – zinco

Lista de Figura

- Figura 1:** Tipos ecológicos de macrófitas aquáticas, adaptadas de Esteves, 1998.....2
- Figura 2:** Locais de coleta das macrófitas aquáticas: Rio Paraíba do Sul (RPS) em Atafona distrito de São João da Barra, RJ e Rio Itabapoana (RI) em Barra do Itabapoana distrito de São Francisco do Itabapoana, RJ.....12
- Figura 3:** Pontos de amostragem das macrófitas aquáticas: **A** – Pontos do rio Paraíba do Sul em Atafona distrito de São João da Barra, RJ e **B** – Pontos do rio Itabapoana em Barra do Itabapoana distrito de São Francisco do Itabapoana, RJ.....12
- Figura 4:** **A** – Foto da macrófita aquática *Eichhornia azurea* Kunt (flutuante emersa) e **B** – Foto da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (flutuante emersa).....13
- Figura 5:** **A** e **B** – Saída de campo realizada no rio Paraíba do Sul; **C** – Aclimação dos indivíduos de *Eichhornia crassipes* para realização de medidas ecofisiológicas; **D** – Aclimação das folhas ao escuro com cliques foliares para o acompanhamento da cinética de emissão de fluorescência da clorofila *a* e **E** e **F** – Utilização no campo do fluorímetro modulado portátil (FMS2, Hansatech, UK). (Acervo pessoal).....14
- Figura 6:** **A** – Amostra de raiz (*E. crassipes*), macerada e armazenada em recipiente plástico; **B** – Balança de precisão (Shimadzu AY 220), onde foram pesados 0,5 g de amostra (peso seco); **C** – As amostras foram colocadas em tubos de teflon (X-press); **D** – Extratos mantidos em repouso *overnight*; **E** – Amostras levadas ao microondas modelo Mars X-press (CEM) e **F** – Determinação dos metais (Cd, Cu, Cr e Zn) foi realizada posteriormente no equipamento IPC-OES (Varian-720ES).....17
- Figura 7:** Espaço de ordenação gerado pela análise dos componentes principais. Foram considerados as concentrações de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) nas raízes de ambas as espécies rios e períodos. Símbolos cheios: *E. azurea*, símbolos vazios: *E. crassipes*. Os símbolos (Período chuvoso, RPS, *E. crassipes*),▲ (Período chuvoso, RPS, *E. azurea*),◇ (Período chuvoso, RI, *E. crassipes*),◆ (Período chuvoso, RI, *E. azurea*),○ (Período seco, RPS, *E. crassipes*),● (Período seco,

RPS, *E. azurea*), □ (Período seco, RI, *E. crassipes*) e ■ (Período seco, RI, *E. azurea*).....24

Figura 8: Espaço de ordenação gerado pela análise dos componentes principais. Foram considerados as concentrações de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) na parte aérea de ambas as espécies rios e períodos. Símbolos cheios: *E. azurea*, símbolos vazios: *E. crassipes*. Os símbolos △ (Período chuvoso, RPS, *E. crassipes*), ▲ (Período chuvoso, RPS, *E. azurea*), ◇ (Período chuvoso, RI, *E. crassipes*), ◆ (Período chuvoso, RI, *E. azurea*), ○ (Período seco, RPS, *E. crassipes*), ● (Período seco, RPS, *E. azurea*), □ (Período seco, RI, *E. crassipes*) e ■ (Período seco, RI, *E. azurea*).....25

Figura 9: Secções transversais de folhas de *E. azurea* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, C e E** – indivíduos oriundos do rio Paraíba do Sul e **B, D e F** – indivíduos oriundos do rio Itabapoana. **A e B** – lâmina foliar; **C e D** – epiderme adaxial e **E e F** – epiderme abaxial. Onde: * indica aerênquima, △ vacúolo com compostos fenólicos, ↗ feixe vascular e << estômatos.....27

Figura 10: Secções transversais de folhas de *E. crassipes* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, B e C** – indivíduos do RPS e **D, E e F** – indivíduos do RI. **A e D** – lâmina foliar; **B e E** – epiderme adaxial e **C e F** – epiderme abaxial.....28

Figura 11: Secções transversais da zona de absorção de raízes de *E. azurea* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, B e C** – indivíduos oriundos do RPS e **D, E e F** – indivíduos oriundos do RI. **A e D** – feixes vasculares; **B e E** – Feixes vasculares e endoderme e **C e F** – Epiderme, endoderme, cristais de areia, cristais de oxalato de cálcio e compostos fenólicos.....30

Figura 12: Secções transversais da zona de absorção de raízes de *E. crassipes* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, B e C** – indivíduos oriundos do RPS e **D, E e F** – indivíduos oriundos do RI. **A e D** – Feixes vasculares; **B e E** – Feixes vasculares e endoderme e **C e F** – Epiderme e endoderme.....31

Lista de tabelas

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água medidos nos rios Paraíba do Sul e Itabapoana em dois períodos: chuvoso (novembro/2012) e seco (maio/2013). As medidas de temperaturas, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido foram feitas *in situ*. As medidas de vazão foram cedidas por Pitter Pimenta Viana (mestre em Ecologia e Recursos Naturais/UENF).....18

Tabela 2: Parâmetros de fluorescência de clorofila *a* avaliados em plantas de *E. crassipes* no RPS e RI nos municípios de São João da Barra e São Francisco do Itabapoana: **A** – Fv/Fm, rendimento quântico máximo do fotossistema II; **B** – Fv/F0, rendimento quântico variável e **C** – qP, quenching fotoquímico e **D** – qNP, quenching não fotoquímico. As letras maiúsculas comparam os rios e as minúsculas os períodos. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).....20

Tabela 3: Quantificação de pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* e *E. azurea* provenientes do RPS e RI nos períodos chuvoso (novembro de 2012) e seco (maio de 2013). Letras maiúsculas comparam as espécies, letras minúsculas comparam os rios, Y e Z representam comparação entre os períodos de um mesmo rio (onde $Y > Z$). Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).....21

Tabela 4: Quantificação de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) em *E. crassipes* e *E. azurea* provenientes do RPS (São João da Barra) e RI (São Francisco do Itabapoana) em novembro/2012 (Período Chuvoso) e maio/2013 (Período Seco). Letras maiúsculas comparam as espécies, letras minúsculas comparam os rios, Y e Z comparam as estações (onde $Y < Z$). Todos os dados para raiz e parte aérea foram diferentes significativamente. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).....23

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Hipóteses | 8 |
| 3. Objetivo..... | 8 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 9 |
| 4.1. Área de estudo | 9 |
| 4.1.1. Rio Paraíba do Sul (RPS) | 9 |
| 4.1.2. Rio Itabapoana (RI)..... | 10 |
| 4.2. Material vegetal e período amostral | 10 |
| 4.3. Determinação da vazão e dados físico – químicos da água | 13 |
| 4.4. Análises Ecofisiológicas | 13 |
| 4.4.1. Fluorescência da clorofila a | 13 |
| 4.4.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos | 14 |
| 4.5. Microscopia Óptica | 15 |
| 4.6. Determinação da concentração de metais em material vegetal | 16 |
| 4.7. Análise estatística..... | 17 |
| 5. Resultados | 18 |
| 5.1. Parâmetros físico-químicos da água | 18 |
| 5.2. Fluorescência da clorofila a..... | 18 |
| 5.3. Pigmentos fotossintéticos..... | 19 |
| 5.4. Concentração de metais no material vegetal | 22 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 5.5. Anatomia Vegetal | 26 |
| 6. Discussão | 32 |
| 7. Conclusão | 40 |
| 8. Referências bibliográficas | 41 |

RESUMO: Organismos bioacumuladores de metais, como as macrófitas aquáticas, auxiliam no estudo das condições ambientais. Estes organismos expostos a poluentes ambientais, como os metais, podem apresentar alterações anatômicas e fisiológicas. A depender do tipo ecológico da planta (flutuante ou emersa), local e período do ano (seco ou chuvoso) podem ocorrer variações na ecofisiologia, modificações na anatomia e na concentração de metais nos tecidos vegetais. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a influência do tipo ecológico da macrófita (*Eichhornia crassipes*, flutuante e *Eichhornia azurea*, emersa) na capacidade de acúmulo de metais e nas respostas ecofisiológicas e anatômicas. Foram realizadas análises de: fluorescência da clorofila *a* (apenas para *Eichhornia crassipes*), conteúdo de pigmentos fotossintéticos, avaliações anatômicas (microscopia óptica) e quantificação de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) nas duas espécies de macrófitas em diferentes períodos (seco e chuvoso) nos rios Paraíba do Sul e Itabapoana. Os pigmentos fotossintéticos apresentaram maiores teores no período seco, quando foram encontradas menores concentrações de metais, com exceção do Cr, nos tecidos vegetais. Os dados de microscopia mostram que as espécies do rio Paraíba do Sul apresentaram maior comprometimento anatômico que as espécies do rio Itabapoana e plantas do tipo ecológico distintos apresentaram diferentes estratégias anatômicas frente a presença de metais: a espécie emersa (*Eichhornia azurea*) investiu mais em cristais (oxalato de cálcio e areia) e produção de compostos fenólicos que a espécie flutuante (*Eichhornia crassipes*). A análise multivariada por componentes principais (PCA) considerando as concentrações de metais mostra que o período do ano (seco/chuvoso) e local de coleta foram preponderantes ao tipo ecológico para a formação dos grupos.

Palavras-chave: fluorescência da clorofila *a*; anatomia vegetal; espécies biomonitoradas.

ABSTRACT: Bioaccumulators Bodies metals such as macrophytes, assist in the study of environmental conditions. These organisms exposed to environmental pollutants, such as metals, may have anatomical and physiological changes. Depending on the type of ecological plant (rooted or free), location and time of year (dry or wet) variations in Ecophysiology, changes in anatomy and concentration of metals in plant tissues may occur. This research aimed to evaluate the influence of ecological type (free or embedded) in capacity and accumulation of metals in ecophysiological and anatomical responses (*E. crassipes*, *E. azurea* and free, rooted) analyzes included: chlorophyll a fluorescence (for *E. crassipes* only), pigment contents, anatomical reviews (optical microscopy) and quantitation of metals (Cd, Cu, Cr and Zn) in two species of macrophytes in different periods (dry and wet) in the Paraíba do Sul rivers and Itabapoana. Photosynthetic pigments showed higher levels in the dry season, season when lower concentrations of metals in plant tissues were found. microscopy data show that the species of the Paraíba do Sul river showed higher anatomical impairment to the species of plants and river Itabapoana type showed distinct ecological strategies against different anatomical presence of metals: the entrenched species (*E. azurea*) invested more in crystals (sand and calcium oxalate) and phenol compounds that produce free species (*E. crassipes*). Multivariate principal component analysis (PCA) shows that the period of the year (dry / wet) and place of sampling influenced more in the concentrations of metals in the tissues of roots and shoots of the individuals who ecological type.

Keywords: chlorophyll a fluorescence; plant anatomy; biomonitoras species.

1. Introdução

As macrófitas aquáticas constituem grande parte dos vegetais aquáticos que apresentam ainda algumas características de vegetais terrestres como a presença de cutícula, aumento dos tecidos responsáveis pela captura de gases e o aumento da capacidade de transpiração (Clemens, *et al.*, 2001; Pompêo & Moschini-Carlos, 2003). Porém, a readaptação destes organismos ao ambiente aquático causou modificações em diferentes níveis fisiológicos, anatômicos e estruturais. As modificações anatômicas que proporcionaram ou facilitaram o regresso destes vegetais ao meio aquático foram: diminuição dos tecidos de sustentação; redução dos estômatos (ausentes ou não funcionais); cloroplastos posicionados na parte superior das folhas; e folhas com cutículas finas para promover a troca de gases com o meio líquido (Pompêo, 2001).

Podem ser encontradas macrófitas com diferentes tipos ecológicos (Esteves, 1998; Pompêo & Moschini-Carlos, 2003). A categorização quanto aos tipos ecológico baseia-se no hábito ecológico de cada espécie (Figura 1), sem levar em consideração os aspectos taxonômicos (Esteves, 1998), sendo estes vegetais agrupados quanto ao seu local de ocorrência:

- Macrófitas aquáticas emersas: plantas enraizadas no sedimento apresentando folhas acima da lâmina de água; Exemplo: *Eichhornia azurea*.
- Macrófitas aquáticas flutuantes: plantas que se desenvolvem flutuando livremente no espelho de água; Exemplo: *Eichhornia crassipes*
- Macrófitas aquáticas submersas enraizadas: plantas enraizadas crescendo submersas; Exemplo: *Egeria densa*
- Macrófitas aquáticas submersas emersas: plantas que apresentam raízes pouco desenvolvidas, flutuando submersas; Exemplo: *Utricularia* e *Ceratophyllum*
- Macrófitas aquáticas com folhas flutuantes: plantas enraizadas desenvolvendo-se com folhas flutuantes na lâmina de água; Exemplo: *Nymphaea*

Os tipos ecológicos estão distribuídos de maneira organizada, formando um gradiente em direção ao interior do corpo hídrico conforme observa-se a partir das

margens: presença das macrófitas emersas, seguida pelas de folhas flutuantes até as submersas enraizadas no interior do corpo hídrico (Figura 1).

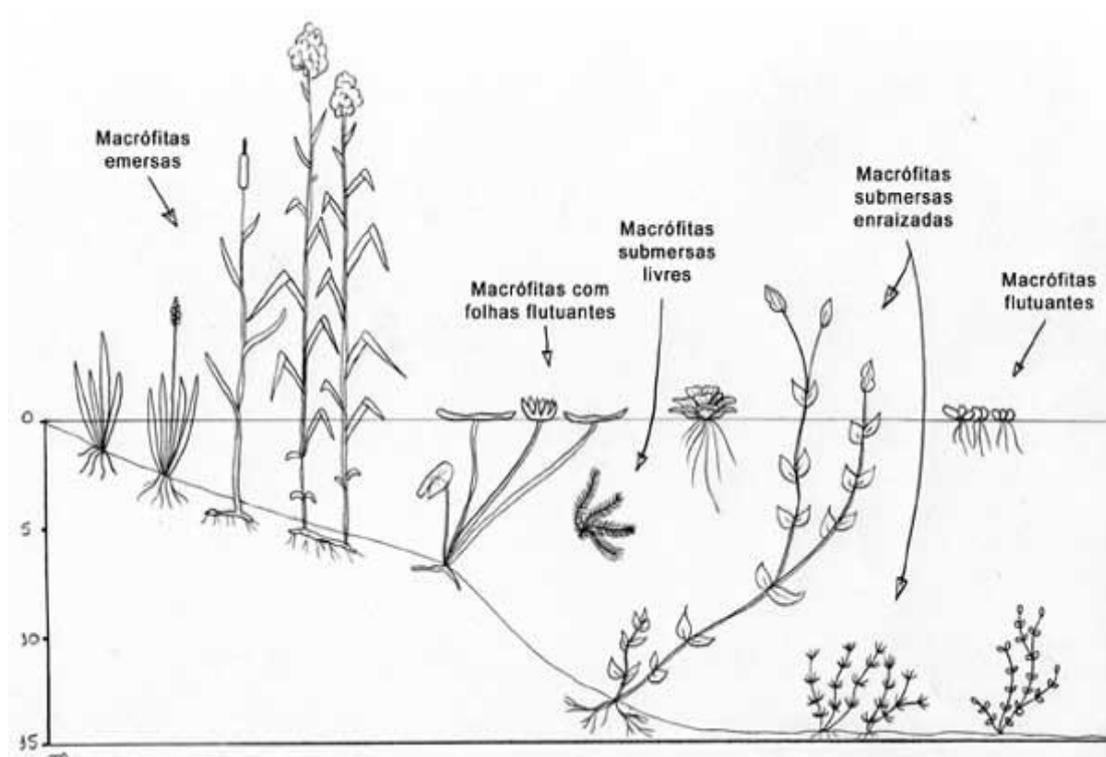


Figura 1: Tipos ecológicos de macrófitas aquáticas, adaptadas de Esteves, 1998.

Estes vegetais apresentam adequações morfológicas e fisiológicas que os tornam consideravelmente plásticos e apropriadas para propagação em ambientes aquáticos.

Estes organismos agem como armazenadores de nutrientes, tendo influência nas características físico-químicas dos corpos hídricos (Pagioro & Thomaz, 1999). Macrófitas são fontes de matéria orgânica para os herbívoros e detritívoros, sendo responsáveis muitas vezes por até 50% da matéria orgânica dos ambientes em que se encontram por meio dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (Bianchini Jr. *et al.*, 2002).

A produção primária das macrófitas aquáticas depende de uma soma de fatores condicionantes, dentre eles se destacam: disponibilidade de carbono inorgânico e nutriente, temperatura, radiação fotossinteticamente ativa, velocidade de corrente, variação do nível de água, salinidade e densidade de indivíduos (Camargo *et al.*, 2003; Henry-Silva & Camargo, 2005; Milne *et al.*, 2006). Estes fatores podem atuar em conjunto sob condições naturais e influenciar a fotossíntese das macrófitas em escalas diárias e sazonais (Sand-Jensen, 1989).

A temperatura determina a velocidade de reações químicas destes vegetais (Kirk, 1994). Temperaturas elevadas beneficiam a produção primária por intensificar as reações metabólicas (Carr *et al.*, 1997). A radiação fotossinteticamente ativa é importante por controlar a taxa fotossintética destes organismos. A fotossíntese aumenta com a radiação até o nível de saturação (Cosby *et al.*, 1984), porém, a fotossíntese pode ser dificultada em alta radiação (Platt *et al.*, 1980). Em condições ambientais próximas aos limites suportados pelas espécies, a fotossíntese apenas é suficiente para sua sobrevivência.

A relevância das macrófitas aquáticas está vastamente d na literatura (Esteves & Camargo, 1986; Horne & Goldman, 1994; Thomaz & Bini, 1998; Bianchini Jr. *et al.*, 2002; Henry-Silva & Camargo, 2003), sendo amplamente utilizadas como espécies biomonitoras da qualidade da água em ambientes lóticos e lênticos (Pedralli, 2003).

O biomonitoramento é a avaliação das respostas biológicas expressas por organismos que refletem um ambiente e a presença ou não de poluentes (UNEP, 1991; WHO, 1996). Esta avaliação estima o nível de poluição por meio da análise de parâmetros como as concentrações dos poluentes nos tecidos de espécies acumuladoras ou bioindicadoras (Sartorio, 2011).

O termo bioindicador é utilizado para designar espécies que refletem os primeiros efeitos da contaminação de seu habitat (Adams, 2002) e a avaliação utilizando estas espécies é baseada na capacidade destes organismos de bioacumular poluentes ambientais (Ravera *et al.*, 2003). As macrófitas aquáticas são utilizadas no controle da qualidade da água, em estudos para monitorar metais e outros poluentes dos corpos hídricos e sedimentos (Zhu & Sikora, 1995).

A utilização de macrófitas em programas de biomonitoramento é comum em ambientes lóticos e lênticos, porém é recomendado que para tal, sejam utilizadas as espécies de tipo ecológico submersos enraizado e/ou flutuantes enraizado (Stein, 2011). Estas espécies devem apresentar as características propostas por Brito (1983) tais como: serem fixas, acumuladoras de poluentes, abundantes e conhecidas taxonomicamente, resistentes à manipulação e transporte, de fácil manutenção e coleta.

Os metais ocorrem naturalmente no ambiente, no entanto, o crescimento de atividades industriais aliado ao despejo de efluentes domésticos tem colaborado significativamente para o aumento de suas concentrações (Cooker & Matheus, 1983). Alguns metais como o Zn e o Cu possuem função biológica conhecida sendo considerados micronutrientes essenciais ao metabolismo dos organismos aquáticos. Por outro lado, elementos como Cr e Cd não possuem função biológica conhecida, sendo tóxicos para a maioria dos organismos, mesmo quando presentes em baixas concentrações (Pereira & Ebecken, 2009).

Os metais em ambientes aquáticos podem ser oriundos de fontes naturais ou antropogênicas. Os metais de fontes naturais têm origem em fenômenos como intemperismo de rochas litogênicas, vulcões e fontes termais (Ebrahimpour & Mushrifah, 2008). As fontes antropogênicas podem ser pontuais, como esgoto industrial e doméstico; ou difusas como deposição atmosférica e agrotóxica. Porém, uma maior atenção deve ser atribuída a fontes difusas, já que estas irão afetar a qualidade das águas por muitos anos, mesmo depois do controle das fontes pontuais (Suschka *et al.*, 1994). Os metais podem estar presentes no meio aquático na forma particulada (em suspensão ou sedimento) e/ou dissolvida (Shi *et al.*, 1998; Shrivastava *et al.*, 2003; Lokeshwari & Chandrappa, 2007).

Os metais em um corpo hídrico podem sofrer variações temporais de acordo com a fração (particulada ou dissolvida) em que se encontram. Pode-se relacionar as maiores concentrações de metais na fração particulada à presença de atividades antrópicas (Admiraal *et al.*, 1995; Carvalho, 1997; Salomão, 1997; Figueiredo, 1999). As variações temporais são aquelas nas quais os metais sofrem oscilações em sua concentração de acordo com a sua associação ao material particulado em suspensão (MPS) (Salomão, 1997). Levando-se em consideração as variações

temporais existem dois grupos de metais na forma particulada sendo o primeiro metais que apresentam maior concentração nos corpos hídricos no período chuvoso, sendo estes provenientes da erosão do solo e transportados através do escoamento superficial da bacia de drenagem e o segundo metais que apresentam a maior concentração no período seco, devido à influência da proporção entre efluentes domésticos e volume de água do corpo hídrico.

A precipitação pluviométrica tem um papel fundamental na concentração de metais no MPS (material particulado em suspensão, ou seja, presente na coluna d'água), quando ela cai diretamente no corpo hídrico ela causa a diluição dos elementos presentes na coluna d'água. Quando a precipitação ocorre em toda a bacia de drenagem, ela interage com o solo e as rochas ali presentes, alterando assim a composição química da água (Berner & Berner 1996). O fluxo de elementos pode variar então em escala temporal, de acordo com os períodos do ano (chuvoso e seco), ocorrendo uma maior entrada alóctone no período chuvoso, em razão do maior escoamento superficial.

Para os metais na fração dissolvida, as maiores concentrações são encontradas no período chuvoso, pois estes elementos, têm sua origem na lixiviação dos solos, através do escoamento superficial e sub-superficial (Guilherme *et al.*, 2005). Já no período seco pode-se observar a menor concentração destes metais na coluna d'água, pois estes elementos estariam sendo precipitados e depositados no sedimento do corpo hídrico (Salomão, 1999).

Os organismos bioacumuladores auxiliam no estudo da qualidade ambiental dos corpos hídricos (Gratão *et al.*, 2005). Em macrófitas aquáticas, por exemplo, a concentração de metais pode ser mais elevada do que no ambiente em que elas se encontram (Samecka-Cymerman & Kempers, 2007). Estes organismos podem acumular metais e algumas espécies apresentam reações de fitotoxicidade, prejudicando assim o seu desenvolvimento (Dhir *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008), enquanto outras podem facilmente crescer na presença de metais.

A presença de íons metálicos que são incomuns a uma célula vegetal pode levar a condição de estresse e causar efeitos deletérios sobre o metabolismo. Isto pode acontecer devido entre outras coisas a intervenção nos processos fotossintéticos, como a substituição do Mg nas moléculas de clorofila por outros íons

bivalentes (Küpper *et al.*, 1998), levando a alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e diminuição da abertura estomática (Paiva *et al.*, 2009), além da interferência na atividade das enzimas do ciclo de Calvin (Prasad, 1995).

Para conseguir sobreviver em condições de estresse, as plantas desenvolveram algumas estratégias cuja principal função é combater o estresse causado pela presença de metais que podem ser tóxicos aos seus tecidos, diminuindo assim os possíveis danos causados por estes elementos. De uma forma geral, o principal meio de tolerância das plantas aos metais consiste em tornar estes elementos menos reativos e/ou imobilizados em órgãos ou compartimentos celulares onde não causam tantos prejuízos ao metabolismo (Clemens, 2001). Os metais podem entrar nas células vegetais por sistemas de transporte existente nas membranas celulares (Haider *et al.*, 1983) e dentro da célula se distribuir entre vários compartimentos intracelulares mas em geral estes metais vão se alojar no vacúolo central das células vegetais (Clemens, 2001).

A análise da variação dos parâmetros da fluorescência é bastante comum para avaliação da toxicidade de poluentes e a inibição de ações biológicas como a fotossíntese (Babu *et al.*, 2005). Esta técnica permite avaliar de maneira simples, sensível, rápida e não invasiva a ação do carreamento de elétrons no fotossistema II (FSII), fornecendo assim dados sobre os processos fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (Roháček, 2002; Yusuf, *et al.*, 2010).

Quando as moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (denominada fótons), elas conseguem alterar suas configurações eletrônicas e passam do estado basal para um estado de mais alta energia (estado excitado). O estado excitado é muito instável e dura pouco tempo (aproximadamente de 8 a 10 nanosegundos). Sendo assim, as moléculas de clorofila tendem a dissipar esta energia absorvida por meio de algumas vias conhecidas: dissipação fotoquímica (utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese) e dissipação não fotoquímica (principalmente calor) (Maxwell & Johnson, 2000).

O rendimento da fluorescência da clorofila *a* representa o nível de excitação da energia luminosa que está contida no sistema de pigmentos. Este sistema é responsável pela fotossíntese e fornece condição para mensurar a inibição/dano no processo de transferência de elétrons do FSII (Bolhàr- Nordenkampf *et al.*, 1989). A

presença de elevadas concentrações de metais nos tecidos vegetais pode alterar a eficiência destes processos, e efeitos específicos de um determinado metal na fotossíntese pode variar entre espécies (Heckathorn *et al.*, 2004).

A fluorescência emitida pelas clorofilas do complexo antena do FSII pode ser dividida em dois componentes constantes e um variável. Os componentes constantes são a fluorescência mínima (F_0) e fluorescência máxima (F_m), o componente variável é a fluorescência variável (F_v). Então, através destes componentes se torna possível determinar o rendimento quântico do FSII, que é gerado através da razão F_v/F_m . Esta razão expressa a capacidade do sistema em transformar energia luminosa em energia química (Van Kooten & Snel, 1990).

Os efeitos dos metais sobre a fluorescência da clorofila *a* podem ser observados através dos distúrbios que estes elementos causam no FSII, levando a diminuições da razão F_v/F_m e da dissipação fotoquímica assim como ao aumento da dissipação não fotoquímica (Paiva *et al.*, 2009).

A absorção e o acúmulo de metais em macrófitas aquáticas também pode acarretar na deterioração da clorofila *a* (Perales-Vela *et al.*, 2007), levando a queda da eficácia fotossintética (Upadhyay & Panda, 2005).

Alterações anatômicas também são observadas com o acúmulo de metais em plantas (Maluga, 1964; Porto, 1981; Karataglis, 1992; Neumann *et al.*, 1995; 1997; Santos, 2000). Modificações no tamanho ou na morfologia celular em plantas são efeitos comuns da toxidez de metais. No entanto, o tipo e a intensidade de tais efeitos dependem da espécie química do metal, da sua concentração e do tipo de metal em questão (Barceló & Poschenrieder, 1999). Reduções no diâmetro dos vasos do metaxilema das raízes foram observadas nos indivíduos de *Brassica juncea* que cresceram em ambientes impactados por metais (Sridhar *et al.*, 2005). Segundo os mesmos autores, os metais também podem se depositar nas paredes celulares do xilema e floema, o que afeta a translocação de água e outras substâncias na planta.

A determinação da concentração de metais, estudos anatômicos e ecofisiológicos de macrófitas aquáticas de diferentes tipos ecológicos podem refletir as condições do ambiente em que elas se encontram. Frente ao exposto este trabalho surgiu a partir dos seguintes questionamentos:

- 1) Existe diferença na concentração de metais em espécies filogeneticamente próximas, mas de tipos ecológicos distintos (flutuante ou emersa)?
- 2) Caso haja diferença na concentração de metais destas espécies isso irá se refletir em alterações na ecofisiologia e anatomia destas espécies?
- 3) O grau de antropização do ecossistema (rios mais ou menos poluídos) interfere no desempenho das macrófitas (capacidade de acúmulo de metais e metabolismo fotossintético)?

Para responder a estas perguntas foram utilizados como modelo de estudos duas espécies de *Eichhornia* (*E. crassipes* – flutuante) e (*E. azurea* – emersa) e dois rios que diferem quanto a poluição: rio Paraíba do Sul (mais antropizado) e rio Itabapoana (menos antropizado).

2. Hipóteses

- 1) A espécie *E. azurea* (emersa) apresentará maior concentração de metais que a espécie *E. crassipes* (flutuante). Independente do período do ano (seco/chuvosa) ou do rio de origem.
- 2) As espécies do rio Paraíba do Sul apresentarão maior concentração de metais e maior comprometimento anatômico e fotossintético que espécies do rio Itabapoana.

3. Objetivo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência do tipo ecológico (flutuante ou emersa) na capacidade de acúmulo de metais e nas respostas ecofisiológicas e anatômicas das espécies *E. crassipes* (flutuante) e *E. azurea* (emersa originárias dos estuários do RPS e do RI em diferentes períodos (seco e chuvoso).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químicos da água dos rios Paraíba do Sul e Itabapoana;
- Avaliar as variações ecofisiológicas e anatômicas de diferentes tipos distintos ecológicos de macrófitas em diferentes períodos nos RPS e RI.
- Avaliar as concentrações de metais (Cd, Cu, Cr e Zn) na parte aérea e raízes das espécies *E.crassipes* e *E.azurea* em diferentes períodos nos RPS e RI.

4. Material e métodos

4.1. Área de estudo

4.1.1. Rio Paraíba do Sul (RPS)

O RPS é formado pelo encontro dos rios Paraitinga e Paraibuna. Este rio nasce na serra da Bocaina - SP e deságua em Atafona – RJ, tendo como percurso total 1.150 Km (CEIVAP, 2010). A bacia do RPS banha três estados São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (CEIVAP, 2010). No Estado do Rio de Janeiro, este rio estende-se por 37 municípios sendo importante para a população fluminense, por ser a única fonte de abastecimento para 12 milhões de pessoas (INEA, 2010).

Este rio também é utilizado pelo sistema hidroenergético, tendo ao longo de seu leito diversos reservatórios utilizados para a geração de energia elétrica. Sendo assim, o Norte do Estado do Rio de Janeiro, a jusante de todos estes impactos citados sofre as consequências do uso da água do RPS: água destinada ao abastecimento público da região metropolitana do estado, alto crescimento na demanda de energia elétrica e a destinação final de rejeitos domésticos, industrial, provenientes da agricultura entre outros (INEA, 2010).

Segundo os dados do CEIVAP (2010), um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento, são despejados diariamente no RPS, além de contaminantes como metais, que acabam por contaminar todos os compartimentos do RPS, sejam abióticos (Molisani *et al.*, 1999; Salomão *et al.*, 2001;

Carvalho *et al.*, 2002) ou bióticos (Lage-Pinto *et al.*, 2008; Campaneli *et al.*, 2010; Vitória *et al.*, 2010; Vitória *et al.*, 2011).

4.1.2. Rio Itabapoana (RI)

O RI tem seu curso entre os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Este rio nasce com a confluência do rio Preto e São João, na serra do Caparaó - MG e então segue cerca de aproximadamente 250 km servindo de limite entre os estados do RJ e ES desaguardo no oceano Atlântico na localidade de Barra do Itabapoana, distrito do município de São Francisco do Itabapoana (RJ).

A Bacia Hidrográfica desse rio abrange uma área de drenagem de 4.875 Km² incluindo 18 municípios nos três Estados e apresenta quatro usinas hidrelétricas de pequeno porte (Pequena Central Hidrelétrica - PCH) em seu percurso (PCH Pedra do Garrafão, PCH Pirapetinga, PCH Calheiros e Usina Hidrelétrica do Rosal).

A degradação das águas deste rio se deve ao lançamento de efluentes domésticos sem tratamento e do carreamento de fungicidas e herbicidas das atividades agrícolas. Outro grave problema vem da agroindústria (usinas de cana de açúcar) que colaboram para elevar os índices de poluição deste corpo hídrico despejando diretamente seus rejeitos no rio.

4.2. Material vegetal e período amostral

Foram estudadas as espécies *Eichornnia azurea* Kunth e *Eichornnia crassipes* (Mart.) Solms da família *Pontederiaceae*. Esta família é composta pelas espécies popularmente denominadas como aguapés, representadas no Brasil especialmente pelos gêneros *Heteranthera*, *Pontederia* e *Eichhornia*, sendo esta última a que apresenta maior importância e ocorrência (Klein & Amaral, 1988).

A espécie *E. azurea* (emersa e emersa), está particularmente localizada nas planícies do continente sul-americano, agregada aos ambientes das bacias Amazônica, do Paraguai e do Paraná (Barret, 1978; Bianchi *et al.*, 2000; Alves dos

Santos, 2002). Pode ser encontrada em diversos tipos de habitats, como lagoas permanentes, temporárias e rios (Pott & Pott, 2000).

A espécie *E. crassipes* (flutuante e emersa), é cosmopolita, nativa da América do Sul, e foi introduzida em diversas regiões do mundo, tornando-se uma espécie invasora de ambientes aquáticos (Holm *et al.*, 1969). Possui alta taxa de crescimento que pode estar relacionada às modificações provocadas pelas atividades antrópicas que criam condições propícias à sua proliferação, como a eutrofização antrópica do ecossistema. Sua propagação indesejada pode acarretar a diminuição de uso dos ecossistemas aquáticos, causando a rarefação do oxigênio na água e redução da produção pesqueira (Pieterse & Murphy, 1990; Petr, 2000; Vereecken *et al.*, 2006).

Indivíduos de *E. azurea* (Figura 4 A) e de *E. crassipes* (Figura 4 B) foram amostrados nos meses de novembro de 2012 (período chuvoso) e maio 2013 (período seco), em três pontos na foz do RPS (Ponto 1: 41° 1'52,56"O e 21°37'12,43"S, Ponto 2: 41°2'34,98"O e 21°37'23,45"S, Ponto 3: 41°2'54,58"O e 21° 37'48,03") em Atafona distrito de São João da Barra, RJ e três pontos na foz do RI (Ponto 1: 40°58'24,61"O e 21°17'6,05"S, Ponto 2:40°58'38,32"O e 21°17'6,05"S, Ponto 3: 40°58'50,57"O e 21°16'52,51"S) em Barra do Itabapoana distrito de São Francisco do Itabapoana, RJ (Figura 2). Em todos os pontos houve a disponibilidade de coleta de ambas as espécies de macrófitas aquáticas. Os mesmos indivíduos coletados de cada período, rio e ponto foram utilizados para todas as análises realizadas neste estudo.



Figura 2: Locais de coleta das macrófitas aquáticas: Rio Paraíba do Sul (RPS) em Atafona distrito de São João da Barra, RJ e Rio Itabapoana (RI) em Barra do Itabapoana distrito de São Francisco do Itabapoana, RJ.



Figura 3: Pontos de amostragem das macrófitas aquáticas: **A** – Pontos do rio Paraíba do Sul em Atafona distrito de São João da Barra, RJ e **B** – Pontos do rio Itabapoana em Barra do Itabapoana distrito de São Francisco do Itabapoana, RJ.

Quinze indivíduos de cada espécie (os mesmos avaliados quanto a fluorescência da clorofila a para *E. crassipes*) foram coletados *in situ* e trazidos para o Laboratório de Ciências Ambientais (LCA – UENF), secos a 60 °C e macerados em conjunto em graal e pistilo, formando uma amostra homogênea para posterior quantificação de metais em triplicata (item 5.5) (n=15).



Figura 4: **A** – Foto da macrófita aquática *Eichhornia azurea* Kunt (flutuante emersa) e **B** – Foto da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (flutuante emersa).

4.3. Determinação da vazão e dados físico – químicos da água

Os dados físico-químicos (temperatura - °C, oxigênio dissolvido – OD (mg/L), condutividade elétrica - $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e pH) foram determinados no campo, colocando os eletrodos diretamente na água do rio nos pontos de coleta e depois feita a média aritmética para parâmetro físico-químico. As análises foram feitas entre 10:00h e 12:00 h. Foram utilizados os seguintes equipamentos portáteis: Oxímetro (Horiba), Condutímetro (WTW) e pHmetro (Instrutherm pH -720).

4.4. Análises Ecofisiológicas

4.4.1. Fluorescência da clorofila a

Quanto à fluorescência da clorofila a (item 4.4.1), foram avaliadas duas folhas de quinze indivíduos de *E. crassipes* (n = 15) em cada período e rio. Os indivíduos de *E. crassipes* foram coletados, trazidos à margem dos rios e depositados em

recipientes de polietileno com água do local de coleta para aclimatação por 30 minutos. (Figura 5). Estas medições não foram feitas medidas em *E. azurea* devido ao hábito fixo da espécie.

As medidas foram feitas no período de 12:00h às 14:00h, com a utilização do fluorímetro modulado portátil (FMS2, Hansatech, UK). Foram feitas medidas na região central da superfície adaxial de folhas completamente expandidas e saudáveis (emersas de necrose ou ferimentos).

As folhas usadas para as medidas foram pré-adaptadas no escuro por 30 minutos com pinças próprias do fluorímetro (Figura 4 D) e posteriormente expostas à luz modulada de baixa intensidade por 5 segundos (aproximadamente $6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 660 nm). Em seguida, as folhas foram submetidas a um pulso de 0,8 segundos de luz actínica saturante ($10.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), adaptado de Genty *et al.* (1989) e Van Kooten e Snel (1990).

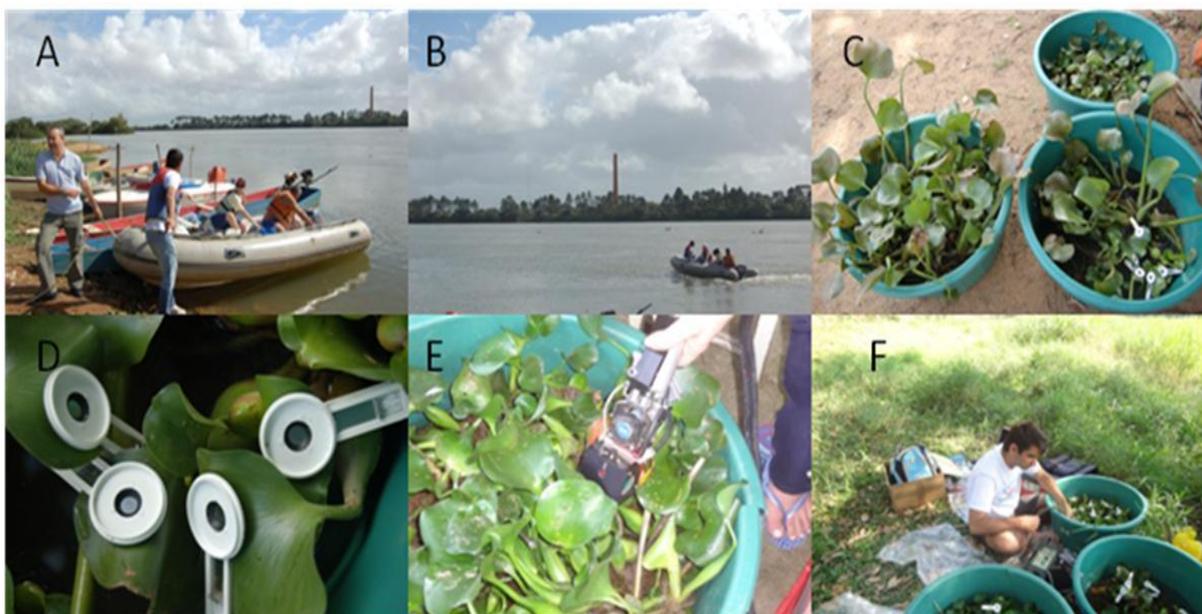


Figura 5: A e B – Saída de campo realizada no rio Paraíba do Sul; C – Aclimatação dos indivíduos de *Eichhornia crassipes* para realização de medidas ecofisiológicas; D – Aclimatação das folhas ao escuro com cliques foliares para o acompanhamento da cinética de emissão de fluorescência da clorofila a e E e F – Utilização no campo do fluorímetro modulado portátil (FMS2, Hansatech, UK). (Acervo pessoal)

4.4.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos (item 4.4.2) foram extraídos de fragmentos retirados do limbo foliar de cinco indivíduos (duas folhas por indivíduo) de cada

espécie (n=10). Dez discos foliares medindo 0,50cm² cada de ambas as espécies, foram cortados em tiras e colocados em tubos plásticos com rosca (um disco em cada tubo) com capacidade para 15 mL, contendo 5 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) envolvidos em papel alumínio (para minimizar a exposição à luz).

Após cinco dias em contato com os discos foliares, uma alíquota de 1,0 mL de DMSO de cada amostra foi submetida a leituras em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu modelo UV-1800) nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm (Wellburn, 1994) para a determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos segundo Wellburn (1994):

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

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

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

Onde A = absorvância

4.5. Microscopia Óptica

Para a microscopia óptica (item 4.5) foram coletados em maio de 2013 dois fragmentos do limbo foliar e zona de absorção das raízes de dois indivíduos de cada espécie nos mesmos pontos das análises anteriores (n= 2).

Os fragmentos de ambas as espécies foram coletados e pré-fixados no campo em temperatura ambiente, em solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2.

Este material foi conduzido ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF (LBCT) onde as amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05 M e o material foi pós-fixado por 1h 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 foi realizada 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).

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).

Após a infiltração e inclusão do material, foram retirados cortes ultrafinos (70 – 90 nm) em ultramicrotomo Reichert, com auxílio de faca de diamante. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina 1% por 5 minutos. As lâminas foram seladas com Etelan® e observadas em microscopia de campo claro (Axioplan ZEIS).

4.6. Determinação da concentração de metais em material vegetal

A extração dos nutrientes inorgânicos do material vegetal (raízes e folhas) foi realizada a partir de 0,5 g (peso seco) de amostra macerada (Figura 6). Inicialmente, as amostras foram colocadas em tubos de teflon (X-press) nos quais foram adicionados 8 mL de ácido nítrico (HNO_3) acrescidos de 2 mL de ácido fluorídrico (HF) concentrado. Os extratos foram mantidos em repouso *overnight* em temperatura ambiente e em seguida, levados ao microondas, modelo Mars X-press (CEM), por 40 minutos (15 min -Ramp e 25 min -Hold) a temperatura de 175 °C e potência de 1600W. Após o resfriamento (30 min), foram adicionados 12 mL de ácido Bórico (H_3BO_3) saturado para neutralização do HF e os tubos foram levados novamente ao microondas por 25 minutos (15 min- Ramp e 10 min – Hold) a 170 °C. Após o resfriamento (30 min), o extrato final foi filtrado em papel Whatman 40 e completado com HNO_3 0,5 N a um volume final de 30 ml com em balão volumétrico. A determinação dos metais Cd, Cu, Cr e Zn foi realizada posteriormente no equipamento ICP-OES (Varian-720ES).

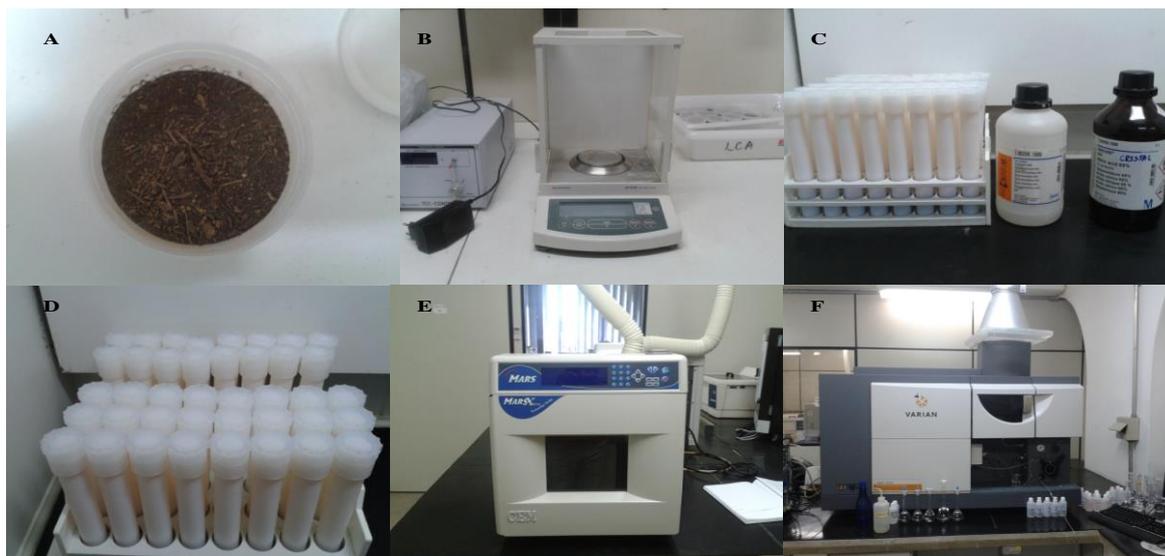


Figura 6: **A** – Amostra de raiz (*E. crassipes*), macerada e armazenada em recipiente plástico; **B** – Balança de precisão (Shimadzu AY 220), onde foram pesados 0,5 g de amostra (peso seco); **C** – As amostras foram colocadas em tubos de teflon (X-press); **D** – Extratos mantidos em repouso *overnight*; **E** – Amostras levadas ao microondas modelo Mars X-press (CEM) e **F** – Determinação dos metais (Cd, Cu, Cr e Zn) foi realizada posteriormente no equipamento IPC-OES (Varian-720ES).

4.7. Análise estatística

Os dados de concentração de metais foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis no programa Statistica 7.0. Para as análises ecofisiológicas (fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos) médias foram comparadas usando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Foi realizada análise multivariada por componentes principais (PCA) para verificar a ordenação dos diferentes conjuntos amostrais em grupos a partir dos parâmetros avaliados (quantificação dos metais Cd, Cr, Cu, Zn e somatório dos metais nas raízes e parte aérea dos indivíduos). O software PC-ORD versão 4 (MJM Software Design, Gleneden Beach, OR USA) foi utilizado para a confecção da PCA.

5. Resultados

5.1. Parâmetros físico-químicos da água

A tabela 1 mostra a variação nos parâmetros físico-químicos e vazão do RPS e RI a medidos no campo nos períodos chuvoso e seco. A condutividade elétrica apresentou maiores valores médios durante o período seco sendo: $104,5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $97,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ no RPS e RI, respectivamente (Tabela 1).

Quanto ao pH da água, foi observada uma tendência à neutralidade no período seco, sendo de 7,5 para o RI e 7,2 para o RPS. No período chuvoso o pH variou entre 6,5 e 6,6 (Tabela 1). O oxigênio dissolvido indicou valores médios mais elevados durante o período chuvoso em ambos os locais de coleta e o RPS apresentou sempre os maiores valores médios. A vazão do RPS I mostrou uma marcante diferença sazonal atingindo valores de $1500 \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ no período chuvoso e $664 \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ no período seco, os valores de vazão do RI foram menores e menos alterado pela sazonalidade que o RPS em função de estarem $\sim 114 \text{ Km}$ a jusante do reservatório do distrito de Rosal, Bom Jesus do Itabapoana – RJ.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da água medidos nos rios Paraíba do Sul e Itabapoana em dois períodos: chuvoso (novembro/2012) e seco (maio/2013). As medidas de temperaturas, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido foram feitas *in situ*. As medidas de vazão foram cedidas por Pitter Pimenta Viana (mestre em Ecologia e Recursos Naturais/UENF)

| | Rio Paraíba do Sul | | Rio Itabapoana | |
|--|--------------------|--------------|-----------------|--------------|
| | Período Chuvoso | Período Seco | Período Chuvoso | Período Seco |
| Temperatura da água (°C) | 27,3 | 23,5 | 28,5 | 25,5 |
| Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 80,8 | 104,5 | 91,4 | 97,1 |
| pH | 6,5 | 7,2 | 6,6 | 7,5 |
| OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 7,1 | 6,5 | 6,2 | 5,4 |
| Vazão ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) | 1500 | 664 | 17,66 | 15,2 |

5.2. Fluorescência da clorofila a

O rendimento quântico máximo (F_v/F_m), não apresentou diferença estatística entre os períodos e rios, tendo seus valores médios variado entre 0,83 e 0,88

(Tabela 2). O rendimento quântico variável (F_v/F_0) também não apresentou diferença estatística entre os rios. Porém, diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre os períodos, sendo os maiores valores médios obtidos nos períodos chuvosos do RPS e seco no RI (Tabela 2).

Os valores médios do *quenching* fotoquímico (qP) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando se compara os rios somente no período chuvoso, neste período os indivíduos do RPS apresentam valores médios maiores que os do RI (Tabela 2). Para este parâmetro foram observados maiores valores médios no período seco de ambos os rios. Porém, os valores de qP se mantiveram entre 0,87 e 1 para todas as plantas analisadas. Para o *quenching* não fotoquímico (qNP) também foi verificado um padrão sazonal com maiores valores no período chuvoso (Tabela 2). Este parâmetro variou entre 0,01 e 0,14 (Tabela 2). Pode se observar aumento de qNP quando ocorreu redução de qP nas plantas do rio Itabapoana no período chuvoso.

5.3. Pigmentos fotossintéticos

Foram verificadas diferenças significativas para os teores de clorofila *a* ($p < 0,05$) quando comparamos os períodos, sendo observados maiores valores no período seco para ambos os rios e espécies (Tabela 3). Para a clorofila *b*, foi observada a mesma tendência sazonal foi mais evidente em ambas as espécies no RPS. Maiores valores de clorofilas totais também foram observados no período seco.

Os carotenóides apresentam a mesma tendência das clorofilas *b*. Porém, esta tendência foi comum a ambos os rios. Para a razão clorofilas totais /carotenóides os maiores valores foram encontrados no período chuvoso, com exceção de *E. azurea* no RI. Esta variação sazonal foi mais bem marcada no RPS.

Tabela 2: Parâmetros de fluorescência de clorofila *a* avaliados em plantas de *E. crassipes* no RPS e RI nos municípios de São João da Barra e São Francisco do Itabapoana: **A** – Fv/Fm, rendimento quântico máximo do fotossistema II; **B** – Fv/F0, rendimento quântico variável e **C** – qP, quenching fotoquímico e **D** – qnP, quenching não fotoquímico. As letras maiúsculas comparam os rios e as minúsculas os períodos. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

| Parâmetros de fluorescência | Rio Paraíba do Sul (RPS) | | Rio Itabapoana (RI) | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | Período Chuvoso | Período Seco | Período Chuvoso | Período Seco |
| Fv/Fm | 0,855 Aa | 0,856 Aa | 0,855 Aa | 0,852 Aa |
| Fv/F0 | 6,3 Aa | 6,0 Ab | 5,9 Aa | 6,2 Ab |
| qP | 0,97 Ab | 0,98 Aa | 0,92 Ab | 0,97 Aa |
| qnP | 0,07 Ba | 0,06 Ab | 0,08 Aa | 0,06 Ab |

Tabela 3: Quantificação de pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* e *E. azurea* provenientes do RPS e RI nos períodos chuvoso (novembro de 2012) e seco (maio de 2013). Letras maiúsculas comparam as espécies, letras minúsculas comparam os rios, Y e Z representam comparação entre os períodos de um mesmo rio (onde Y > Z). Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

| Pigmentos | rio Paraíba do Sul | | | | rio Itabapoana | | | |
|---------------------------------------|---------------------|--------------|------------------|--------------|---------------------|--------------|------------------|--------------|
| | <i>E. crassipes</i> | | <i>E. azurea</i> | | <i>E. crassipes</i> | | <i>E. azurea</i> | |
| | Período Chuvoso | Período Seco | Período Chuvoso | Período Seco | Período Chuvoso | Período Seco | Período Chuvoso | Período Seco |
| Chlo <i>a</i> (nmol/cm ²) | 39,4 AaZ | 49,3 AaY | 40,1 AaZ | 43,8 AaZ | 35,9 AaZ | 43,85 AaY | 31,2 AbZ | 39,61 AaY |
| Chlo <i>b</i> (nmol/cm ²) | 11,0 AaZ | 14,8 AaZ | 12,9 AaZ | 14,7 AaZ | 12,0 AaZ | 12,49 AaZ | 12,6 AaZ | 12,74 AaZ |
| Caro (nmol/cm ²) | 8,5 AaZ | 10,8 AaZ | 8,5 AaZ | 11,7 AbZ | 8,5 AaZ | 10,99 AaZ | 11,4 AaZ | 16,76 AaZ |
| Chlo <i>a/b</i> | 3,4 AaZ | 3,2 AaZ | 3,0 AaZ | 3,2 AaZ | 3,3 AaZ | 3,62 AaZ | 2,5 AaZ | 3,8 AaZ |
| Chlo (<i>a + b</i>)/Caro | 5,8 AaY | 3,27 AaZ | 6,3 AaY | 3,2 AaZ | 5,7 AaZ | 5,21 AaZ | 4,0 AaZ | 5,11 AaZ |
| Total Chlo | 50,5 AaZ | 64,1 AaY | 52,9 AaZ | 64,1 AaZ | 48,7 AbZ | 56,34 AaY | 43,8 AbZ | 52,35 AbY |

5.4. Concentração de metais no material vegetal

A concentração total de metais nas raízes foi sempre superior à da parte aérea para ambas as espécies, rios e períodos (Tabela 4). Foi observada maior concentração de metais na parte aérea e raízes de *E. azurea* no período chuvoso, e maior concentração de metais em ambos os órgãos para *E. crassipes* no período seco, mas apenas no RI.

A distribuição quantitativa para os metais nas amostras de raízes de *E. crassipes* e *E. azurea* no RPS e RI durante os períodos seco e chuvoso foram semelhantes: $Zn > Cr > Cu > Cd$. Para as amostras de parte aérea, a distribuição quantitativa dos metais muda em relação à distribuição das raízes, sendo: $Zn > Cu > Cr > Cd$ em ambas as espécies, períodos e rios.

Levando em consideração a translocação dos metais das raízes para a parte aérea observamos que existe uma tendência quantitativa: $Cu > Zn > Cr > Cd$, exceto para *E. azurea* oriunda do RPS que translocou maior quantidade de Zn que de Cu. Para Cd foi observado que em ambas às espécies do RPS houve uma maior translocação deste metal no período seco, no rio Itabapoana essa tendência se repete somente para *E. azurea* uma vez que não foi detectado este metal na espécie *E. crassipes*.

Quando comparamos as espécies em um mesmo rio e período, observamos que para metais como o Cu e o Zn foi encontrada maior concentração nas raízes de *E. azurea* no período chuvoso e o metal Cr foi observado em maior quantidade nas raízes de *E. crassipes* no período seco.

Tabela 4: Quantificação de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) em *E. crassipes* e *E. azurea* provenientes do RPS (São João da Barra) e RI (São Francisco do Itabapoana) em novembro/2012 (Período Chuvoso) e maio/2013 (Período Seco). Letras maiúsculas comparam as espécies, letras minúsculas comparam os rios, Y e Z comparam as estações (onde Y < Z). Todos os dados para raiz e parte aérea foram diferentes significativamente. Letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05)

| | | Rio Paraíba do Sul (RPS) | | | | | | | | Rio Itabapoana (RI) | | | | | | | |
|-------------|--------|--------------------------|-----|--------------|-----|------------------|-----|--------------|-----|---------------------|-----|--------------|-----|------------------|-----|--------------|-----|
| | | <i>E. crassipes</i> | | | | <i>E. azurea</i> | | | | <i>E. crassipes</i> | | | | <i>E. azurea</i> | | | |
| | | Período Chuvoso | | Período Seco | | Período Chuvoso | | Período Seco | | Período Chuvoso | | Período Seco | | Período Chuvoso | | Período Seco | |
| órgão | Metais | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Raiz | Cd | 1,6 | AaZ | 1,40 | AaZ | 1,90 | AaZ | 1,00 | AaZ | 0,30 | AbZ | 0,20 | AbZ | 0,50 | AbY | 0,20 | AbZ |
| | Cr | 27,4 | AaZ | 27,6 | AaZ | 25,4 | AaY | 18,0 | BaZ | 19,1 | BbZ | 24,4 | AaZ | 29,8 | AaY | 12,2 | BbZ |
| | Cu | 14,9 | BaZ | 16,7 | AaZ | 20,6 | AbY | 14,3 | AaZ | 13,5 | BbZ | 13,3 | AaZ | 21,2 | AaY | 11,2 | AbZ |
| | Zn | 70,8 | BaY | 61,4 | AbZ | 81,3 | AaY | 56,8 | BaZ | 52,4 | BbZ | 73,5 | AaY | 62,8 | AbY | 48,3 | BaZ |
| | Σ | 114,7 | AaZ | 107,2 | AaZ | 129,2 | AaY | 90,1 | AaZ | 85,3 | BbZ | 111,4 | AaY | 114,3 | AaY | 71,9 | BbZ |
| parte aérea | Cd | 0,20 | AaZ | 0,10 | AaZ | 0,10 | AaZ | 0,10 | AaZ | - | - | 0,10 | AaZ | - | - | 0,10 | AaZ |
| | Cr | 1,20 | BbZ | 3,80 | AaY | 4,60 | AaY | 0,8 | BbZ | 1,60 | AaZ | 3,30 | AaY | 0,90 | AbZ | 2,10 | AaY |
| | Cu | 7,70 | BaZ | 6,20 | AaZ | 8,40 | AaY | 2,9 | BbZ | 6,70 | BbZ | 7,30 | AaZ | 7,50 | BbZ | 6,10 | AaY |
| | Zn | 29,0 | AaY | 18,7 | BbZ | 31,1 | AaZ | 29,3 | AaZ | 21,5 | AaZ | 27,0 | BaZ | 29,0 | AaY | 15,1 | AbZ |
| | Σ | 38,2 | AaY | 28,8 | AaZ | 44,3 | AaY | 33,0 | AaZ | 29,8 | AaZ | 37,8 | BaY | 37,4 | AaY | 23,4 | AbZ |

A análise dos componentes principais (PCA) nas raízes explicou 79, 27% da variância total da concentração de metais dos indivíduos de ambos os períodos rios e espécies. O primeiro componente principal (PC1) explicou 65,12% e o segundo (PC2), 14,15% (Figura 7). Foram formados dois grupos que apontaram um padrão sazonal de respostas da concentração de metais. As amostras do período chuvoso se localizaram abaixo da PC2 e as do período seco acima. Foi observado que no rio Itabapoana na seca se formaram dois grupos levando em consideração as espécies (*E. crassipes* e *E. azurea*). O agrupamento dos dados foi diretamente influenciado pelas concentrações de Cu e somatório dos metais na PC1 e concentração de Cd e Zn na PC2

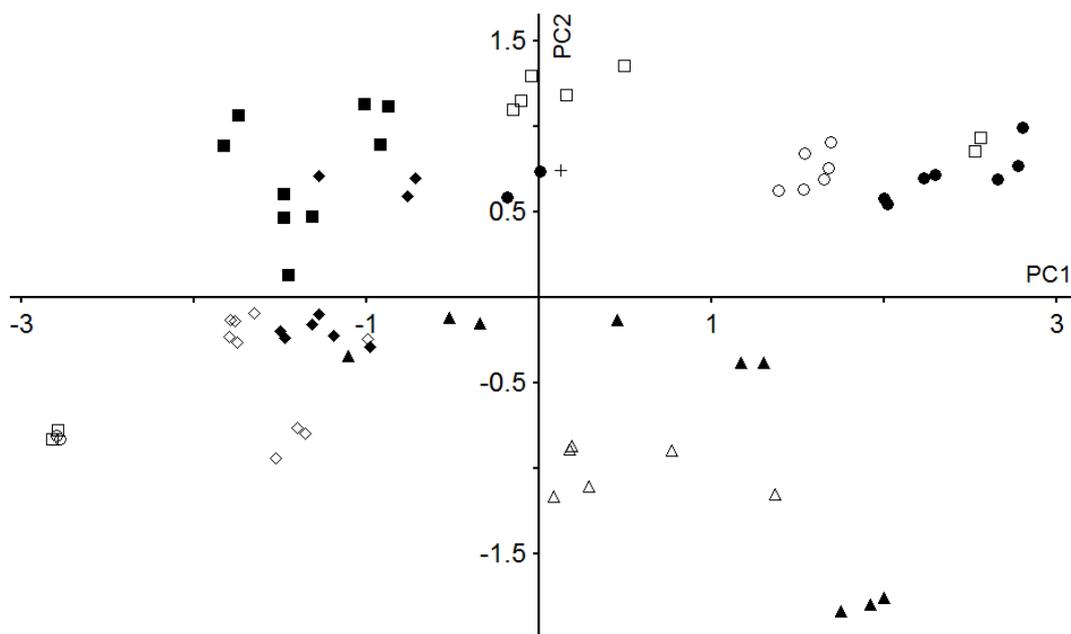


Figura 7: Espaço de ordenação gerado pela análise dos componentes principais. Foram considerados as concentrações de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) nas raízes de ambas as espécies rios e períodos. Símbolos cheios: *E. azurea*, símbolos vazios: *E. crassipes*. Os símbolos (Período chuvoso, RPS, *E. crassipes*), ▲ (Período chuvoso, RPS, *E. azurea*), ◇ (Período chuvoso, RI, *E. crassipes*), ◆ (Período chuvoso, RI, *E. azurea*), ○ (Período seco, RPS, *E. crassipes*), ● (Período seco, RPS, *E. azurea*), □ (Período seco, RI, *E. crassipes*) e ■ (Período seco, RI, *E. azurea*).

Para as folhas a análise multivariada por componentes principais (PCA) foi feita utilizando-se as concentrações dos metais (Cd, Cr, Cu e Zn) (Figura 8). Pela análise dos componentes principais para folhas foi possível explicar 81,40% da variância total da concentração de metais na dos indivíduos de ambos os períodos rios e espécies, no primeiro componente principal (PC1) foi possível explicar 67,15% e no segundo (PC2) 14,25%.

Assim como na Figura 7 (anterior) houve separação em função da sazonalidade. As amostras do período chuvoso se localizaram à direita da PC2 e as do período seco à esquerda. Assim como para raízes (Figura 7) foram formados dois grupos bem divididos que apontaram padrão sazonal de respostas. Foi observado que no período seco em ambos os rios podemos separar grupos levando em consideração as espécies (*E. crassipes* e *E. azurea*). O agrupamento dos dados foi diretamente influenciado pelas concentrações de Zn e Cu, na PC1 e pela concentração de Cr na PC2.

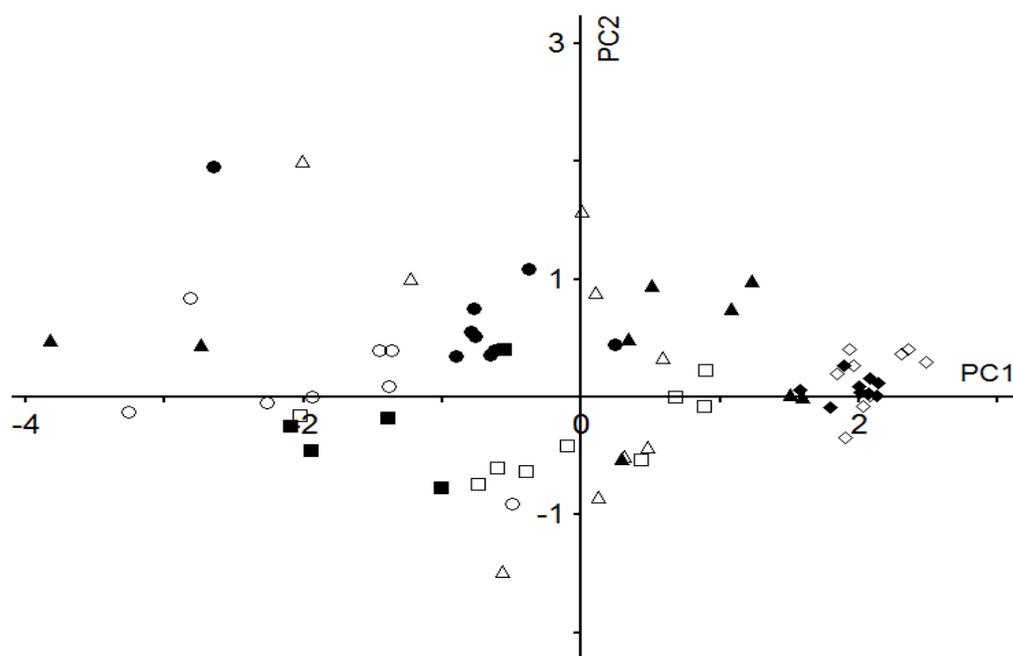


Figura 8: Espaço de ordenação gerado pela análise dos componentes principais. Foram considerados as concentrações de metais (Cd, Cr, Cu e Zn) na parte aérea de ambas as espécies rios e períodos. Símbolos cheios: *E. azurea*, símbolos vazios: *E. crassipes*. Os símbolos Δ (Período chuvoso, RPS, *E. crassipes*), \blacktriangle (Período chuvoso, RPS, *E. azurea*), \diamond (Período chuvoso, RI, *E. crassipes*) \blacklozenge (Período chuvoso, RI, *E. azurea*), \circ (Período seco, RPS, *E. crassipes*), \bullet (Período seco, RPS, *E. azurea*), \square (Período seco, RI, *E. crassipes*) e \blacksquare (Período seco, RI, *E. azurea*).

5.5. Anatomia Vegetal

Foram realizadas observações ao microscópio óptico de indivíduos de *E. azurea* e *E. crassipes* do RPS e RI (lâmina foliar e zona de absorção das raízes) provenientes das coletas do período chuvoso, uma vez que neste período foram observadas maiores concentrações de metais nos tecidos vegetais.

Secções transversais revelaram que em ambas as espécies a lâmina foliar apresenta-se anfiestomática, com estômatos do tipo paracítico. A superfície adaxial e abaxial das folhas de ambas as espécies apresentam-se unisseriadas, com células em formato tabular, revestidos por fina camada de cutícula (Figura 9 A e B, Figura 10 A e D).

Em *E. azurea*, o mesofilo diferencia-se em parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, porém com parênquima paliçádico em ambas as faces, mesofilo isolateral. O parênquima paliçádico é formado por 2 a 5 estratos na face adaxial, e por 1 a 3 estratos na face abaxial. Enquanto em *E. crassipes*, o mesofilo apresenta-se dorsiventral diferenciado em parênquima paliçádico, composto por 3 a 8 estratos na face adaxial, e parênquima lacunoso na face abaxial formado por 1 a 4 estratos. Em ambas as espécies ocorrem a presença de aerênquima, um parênquima com grandes espaços intercelulares preenchidos por ar, destacando-se o aerênquima mais proeminente das espécies do rio Paraíba do Sul que os das espécies do rio Itabapoana (Figura 9 A e B, Figura 10 A e D).

Nota-se também, em *E. azurea*, espécie do tipo ecológico enraizado, a presença de inúmeros idioblastos no parênquima paliçádico e lacunoso em ambos os rios, sugerindo a presença de compostos fenólicos em seus vacúolos. Em tecidos foliares de *E. crassipes* não foi observado esta substância em nenhum dos locais de estudo (Figura 9 A e B, Figura 10 A e B).

Secções transversais das zonas de absorção das raízes evidenciaram a presença de epiderme unisseriada (Figuras 11 e 12) e subjacentes a epiderme foram observadas uma zona de células com paredes espessas e suberificadas, a exoderme.

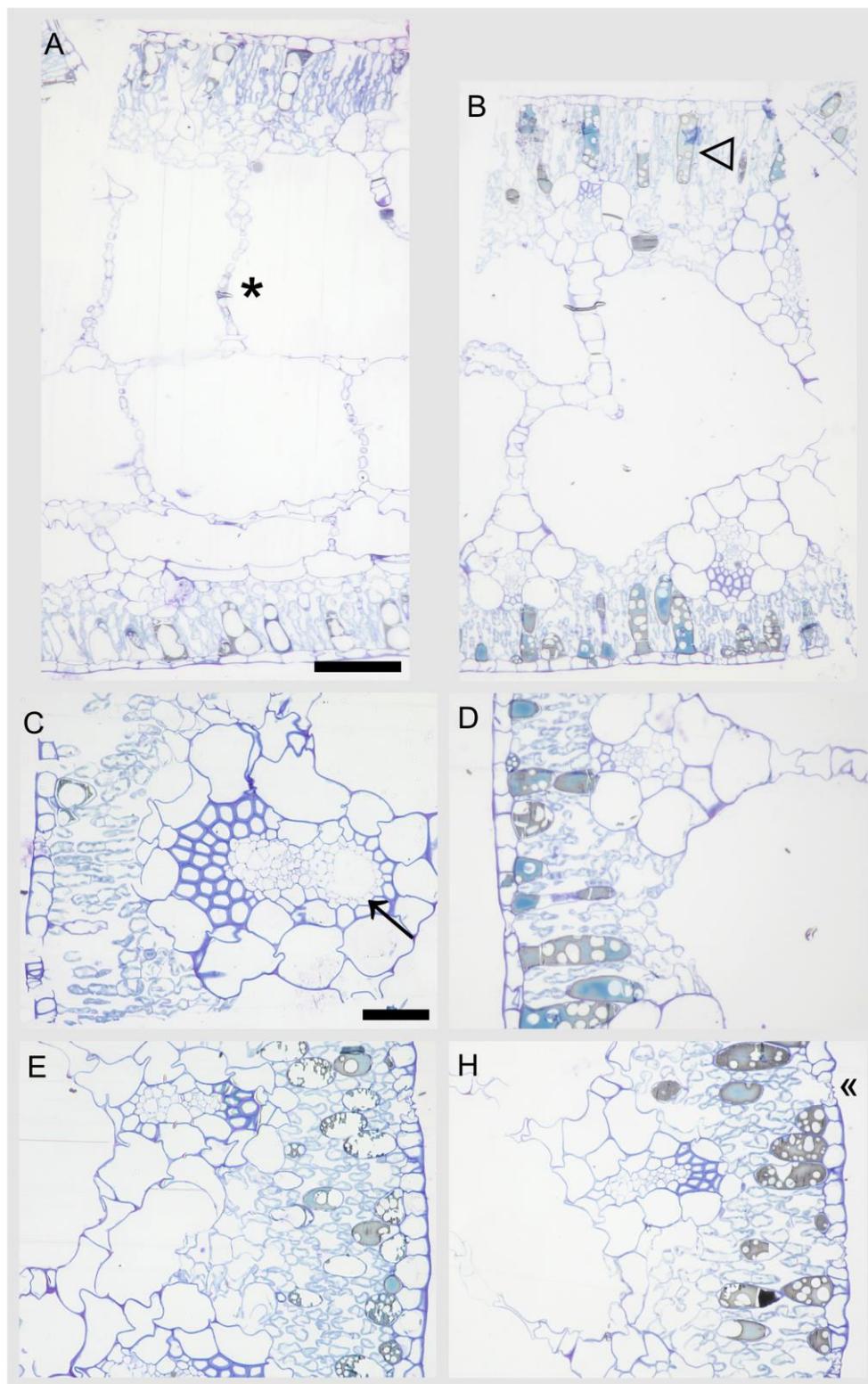


Figura 9: Secções transversais de folhas de *E. azurea* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, C e E** – indivíduos oriundos do rio Paraíba do Sul e **B, D e F** – indivíduos oriundos do rio Itabapoana. **A e B** – lâmina foliar; **C e D** – epiderme adaxial e **E e F** – epiderme abaxial. Onde: * indica aerênquima, \triangle vacúolo com compostos fenólicos, \cap feixe vascular e \ll estômatos.

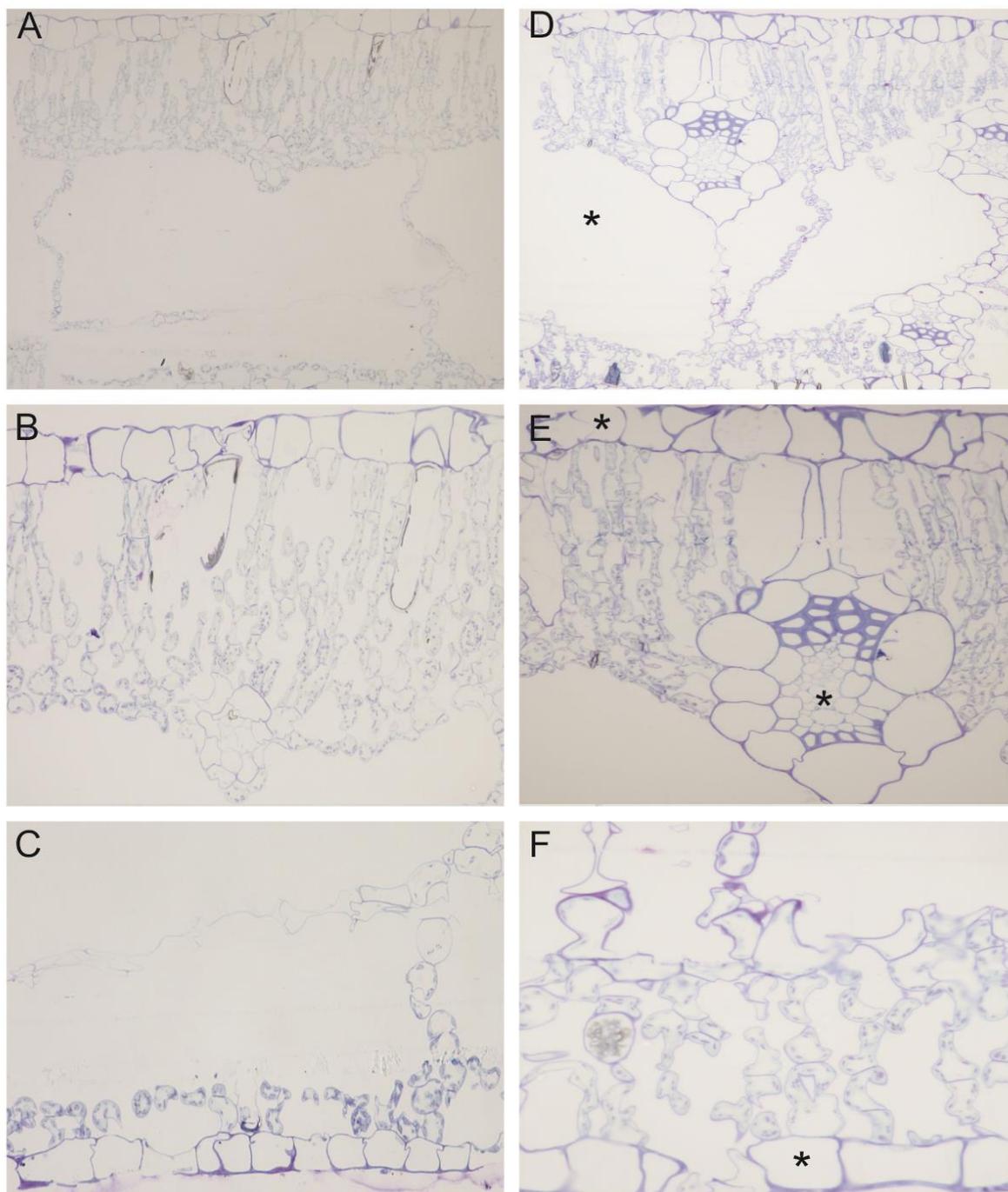


Figura 10: Secções transversais de folhas de *E. crassipes* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, B e C** – indivíduos do RPS e **D, E e F** – indivíduos do RI. **A e D** – lâmina foliar; **B e E** – epiderme adaxial e **C e F** – epiderme abaxial.

A epiderme das raízes de *E. crassipes* e *E. azurea* coletadas no RPS (Figuras 11 e 12) apresentaram acentuado aspecto côncavo de suas paredes periclinais externas e estrutura mais desorganizadas quando comparadas às espécies do RI (Figuras 11 C e F, Figura 12 C e F). Tal desorganização se

reproduz nas camadas corticais mais externas, inclusive a exoderme, com células de formato irregular mais evidentes nas coletas oriundas do rio Paraíba do Sul.

Em *E. azurea* de ambos os rios foram observados cristais de oxalato de cálcio e de areia, distribuídos pelo córtex, com predominância destes cristais nas camadas corticais subjacentes à epiderme. Não foram encontrados cristais no parênquima cortical de *E. crassipes* coletados em ambos os rios (Figura 11 C e F, figura 12 C e F).

Em ambas as espécies e rios foram observados aerênquima na região cortical. Juntamente ao aerênquima foram observados cristais de ráfide, comumente encontrados em tecidos que apresentam arranjo frouxo, auxiliando as células na formação estrutural destes tecidos (Figura 11 B e Figura 12 D). Em *E. azurea*, plantas provenientes do rio Itabapoana apresentaram o aerênquima mais desenvolvido quando comparadas às provenientes do rio Paraíba do Sul, enquanto em *E. crassipes* não foi observado diferença entre os rios coletados.

Nas camadas corticais mais internas, subjacentes ao aerênquima, nota-se um decréscimo do tamanho celular, aumento da organização e formatos mais isodiamétricos, com estratos de 2 a 6 camadas de células até alcançar a última camada do córtex, endoderme, distinguindo-se das demais pela presença de espessamento na parede periclinal face ao córtex.

No cilindro vascular, observa-se o periciclo subjacente a endoderme, com apenas 1 camada de células contornando completamente o cilindro vascular. Células do xilema são facilmente reconhecidas pelo grande lúmen celular, assim como grupos de células do floema, distribuídos externamente ao xilema. Distinguem-se as duas espécies pela presença de parênquima medular observado em *E. crassipes*, porém, não havendo distinção entre os rios coletados (Fig 11 A e D).

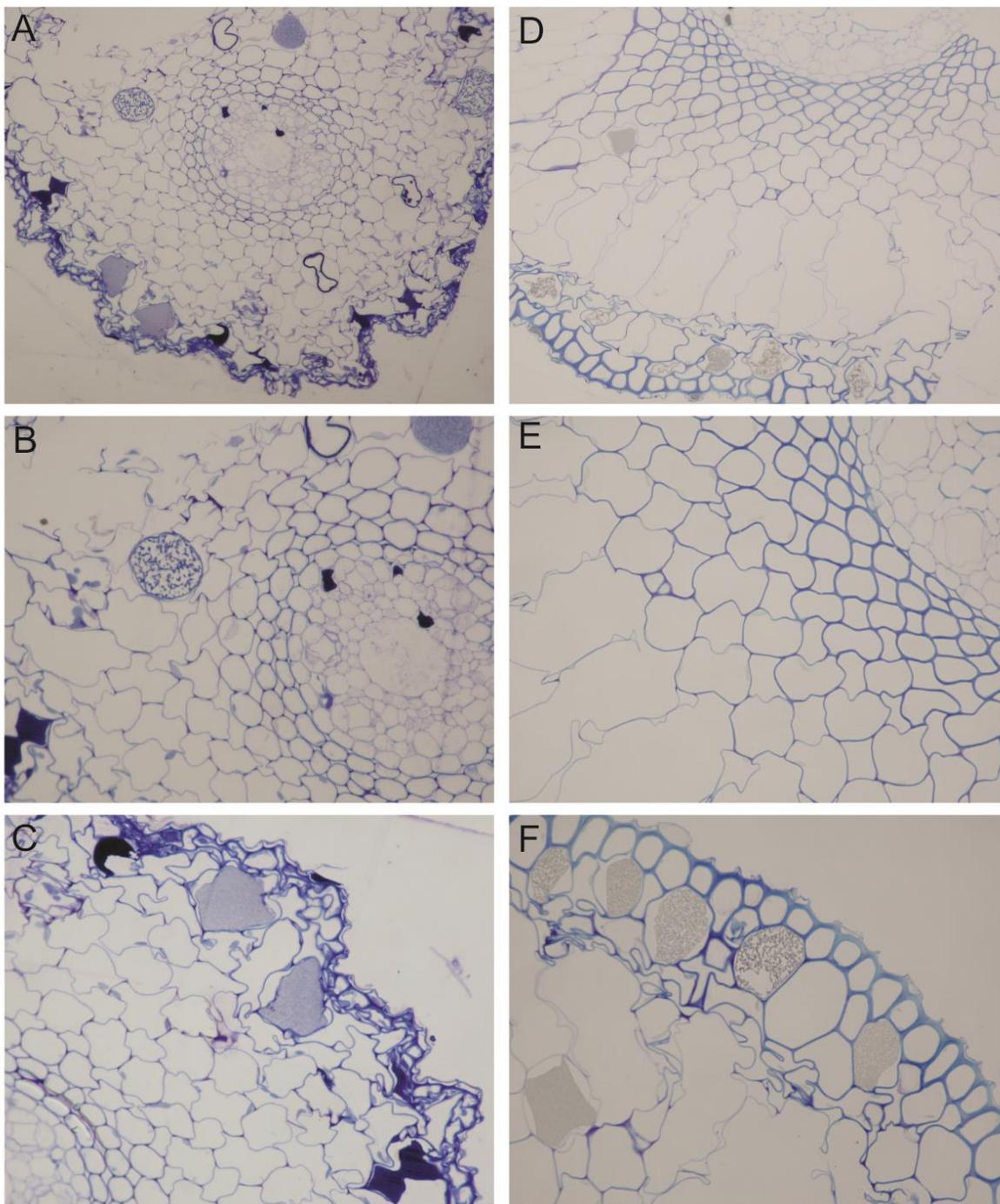


Figura 11: Secções transversais da zona de absorção de raízes de *E. azurea* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A**, **B** e **C** – indivíduos oriundos do RPS e **D**, **E** e **F** – indivíduos oriundos do RI. **A** e **D** – feixes vasculares; **B** e **E** – Feixes vasculares e endoderme e **C** e **F** – Epiderme, endoderme, cristais de areia, cristais de oxalato de cálcio e compostos fenólicos.

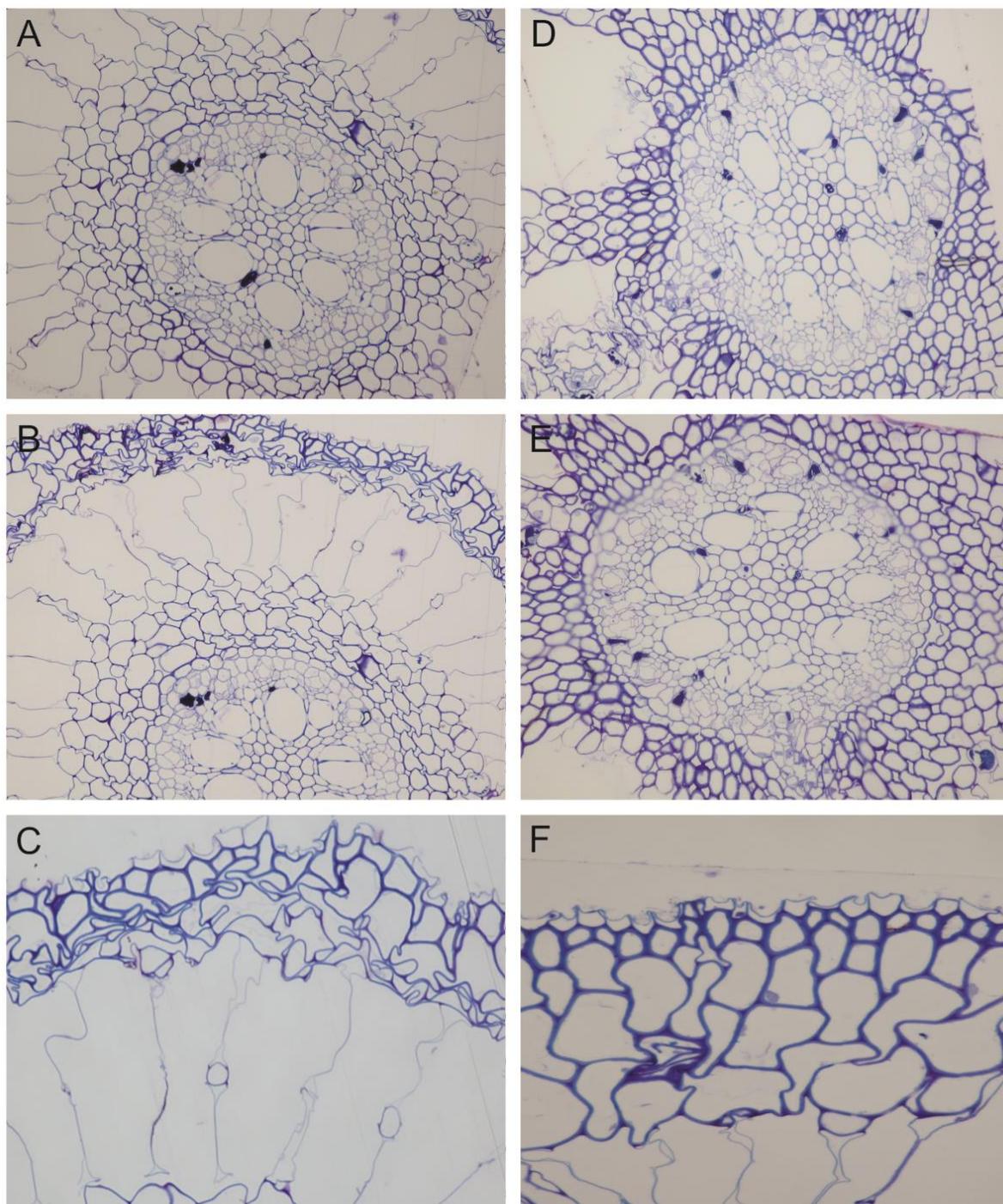


Figura 12: Secções transversais da zona de absorção de raízes de *E. crassipes* coletadas em diferentes rios do Norte Fluminense na estação chuvosa: **A, B e C** – indivíduos oriundos do RPS e **D, E e F** – indivíduos oriundos do RI. **A e D** – Feixes vasculares; **B e E** – Feixes vasculares e endoderme e **C e F** – Epiderme e endoderme.

6. Discussão

A razão F_v/F_m (rendimento quântico máximo) fornece indicativos do nível de estresse ao qual uma espécie vegetal pode estar submetida. Variações médias entre 0,75 e $0,85 \pm 0,03$ seriam indicativos de bom funcionamento do aparato fotossintético (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1989). Os resultados dos valores médios de F_v/F_m encontrados para *E. crassipes* de ambos os rios e períodos estão dentro da faixa supracitada, sugerindo que estas plantas estão saudáveis. Este fato é corroborado pelos valores do *quenching* fotoquímico (qP), que indica a proporção de energia que é empregada em reações fotoquímicas da fotossíntese. Nos resultados encontrados neste estudo, o *quenching* fotoquímico apresenta valores muito próximos a 1, demonstrando que os centros de reação estavam em sua maioria abertos e dissipando energia na forma fotoquímica. Isto aconteceu também nos indivíduos de *E. crassipes* do rio mais antropizado (Paraíba do Sul), sugerindo que esta espécie é capaz de manter o rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e o qP (*quenching* fotoquímico) das plantas dentro de uma faixa ótima.

Estes resultados corroboram com Lage-Pinto *et al.* (2008), que obtiveram médias de F_v/F_m variando entre 0,78 e 0,82 e o qP variando entre 0,86 e 0,99 em *E. crassipes* estudadas no alto, médio e baixo rio Paraíba do Sul e rio Imbé. Estes autores sugerem que apesar do médio e alto rio Paraíba do Sul estarem mais propensos a maior estresse ambiental proveniente de um maior volume de efluentes de indústrias contaminados com metais. Sendo assim os indivíduos de *E. crassipes* não apresentaram redução na razão F_v/F_m em função de ajustes ultraestruturais dos tilacóides e dissipação térmica (qNP) de energia.

Paiva *et al.* (2009) trabalharam com a referida espécie em casa de vegetação simulando condições de estresse metálico em experimentos hidropônicos. No experimento de Paiva *et al.* (2009), os indivíduos foram expostos a Cr^{+3} em diferentes concentrações (1 e 10 mM) e isto não alterou os valores do parâmetro F_v/F_m a 1mM de Cr^{+3} .

Outros estudos corroboram com este resultado sugerindo que as diferenças na razão F_v/F_m somente são encontradas em indivíduos com exposição a elevadas concentrações maiores de metais, e isso é devido a

capacidade destes organismos em acumular poluentes metálicos em suas raízes (Paiva *et al.*, 2009; Campaneli *et al.*, 2010), evitando assim a translocação destes elementos para as folhas. Esta estratégia é apontada como uma forma de não comprometer a integridade e funções primárias da folha como a fotossíntese (Soltan & Rashed, 2003).

Estudos realizados por Oliveira *et al.* (2002), sugerem que a razão F_v/F_0 , em relação a razão F_v/F_m , é melhor para discriminar pequenas diferenças no rendimento quântico do FS II. A faixa sugerida para indivíduos considerados saudáveis para esta razão está entre 4 e 6 (Roháček, 2002), o que contempla nossos dados.

O quenching não fotoquímico qNP está relacionado à dissipação não fotoquímica do excesso de energia de excitação no FS II (Krause & Weis, 1991). No presente estudo observou-se aumento mais proeminente do qNP na estação chuvosa do rio Itabapoana corroborando com os resultados de qP, que foram menores para a mesma estação e rio, mostrando assim que existe uma competição entre as vias de dissipação de energia do FS II.

Os metais podem afetar as fases iniciais da síntese de pigmentos ou causar a destruição dos mesmos (McNulty & Newman, 1961), resultando assim na redução do conteúdo de clorofilas *a* e *b* e de carotenoides (Kaur *et al.*, 2008). Variações nos pigmentos fotossintéticos como as clorofilas e os carotenóides são indicadores eficientes de estresse em plantas superiores (Hendry & Price, 1993; Sinha *et al.*, 2009). Indivíduos de *Eichhornia* submetidos a estresse por Cd diminuem o conteúdo de clorofilas *a*, *b* e clorofilas totais (Mishra *et al.*, 2007). Em estudos com alfafa (*Medicago sativa*) expostos a Zn foi observada a diminuição do conteúdo de clorofila (Porter & Sheridan, 1981). O excesso de Cu também pode promover a redução da concentração de clorofila, como já foi verificado em folhas de trigo (*T. aestivum*) (Elefteriou & Karataglis, 1989).

Na literatura é relatada a diminuição no teor das clorofilas em plantas de diferentes espécies expostas a metais (Sharma & Sharma, 1993; Samantaray *et al.*, 2001). Reduções nos teores de clorofila total foram bem documentados em estresse por Cr e em geral, a clorofila *a* foi mais sensível ao estresse metálico do

que a clorofila *b* (Vajpayee *et al.*, 2000; Panda & Choudhury, 2005; Sinha *et al.*, 2005; Paiva *et al.*, 2009), como foi corroborado pelo presente trabalho.

Boonyapookana *et al.* (2002) relataram que a diminuição na fotossíntese das plantas, pode ser promovida pelo aumento da concentração de metais na solução nutritiva, e esta diminuição da fotossíntese está associada com alterações bioquímicas que causam a inibição de síntese da clorofila.

É possível que algum outro agente externo, que tenha em sua composição química algum dos metais analisados, possa ter sido carregado com a precipitação pluviométrica maior no período chuvoso (mesmo período de maior detecção de metais menor concentração dos pigmentos). Estes agentes externos chegando dentro do corpo hídrico (como, por exemplo, os herbicidas utilizados na agricultura que é muito comum no Norte fluminense) tenha contribuído para o aumento das concentrações de Cu e Zn e conseqüentemente o declínio dos teores de pigmentos (Burken & Schnoor, 1996).

A manutenção das proporções na razão clorofila *a/b* apresentam um indicador da resistência dos pigmentos a elementos tóxicos (Maleva *et al.*, 2012). Sugerimos então que os indivíduos de ambas as espécies do rio RPS estariam sendo mais afetadas pelos metais levando em consideração os pigmentos fotossintéticos e concentração de metais detectados nos indivíduos.

As raízes de *Eichhornia* são os locais preferenciais de acúmulo de metais, corroborando com o que a literatura já descreveu para esta e outras espécies (Vesk & Allaway, 1997; Oliveira *et al.*, 2001; Vitória *et al.*, 2001; Soltan & Rashed, 2003; Jayaweera *et al.*, 2008; Campanelli *et al.*, 2010).

Pesquisas ressaltam a importância das raízes como órgão preferencial de acúmulo de metais como uma estratégia vegetal para evitar que o metal chegue à parte aérea e prejudique o funcionamento do aparato fotossintético (Soltan & Rashed, 2003). As raízes destas espécies são fasciculadas, favorecendo grande adsorção dos metais pela maior área de contato.

Levando em consideração o tipo ecológico das macrófitas aquáticas, foi observado que a diferença entre espécies não influencia na capacidade de acúmulo de metais em seus tecidos. Milne *et al.* (2011) também determinaram valores bastante similares de metais nas duas espécies de macrófitas deste

estudo (*E. crassipes* e *E. azurea*). A variação na concentração de metais observada por Maine *et al* 2011 ocorreu apenas em função do local de coleta das espécies, assim como ocorreu no presente trabalho.

Levando em consideração a sazonalidade em um ecossistema dinâmico como são os rios tropicais (Silveira, 2004), podemos inferir que a mudança causada pelas condições climáticas que modificam os ambientes lóticos onde se encontram estes organismos preponderam sobre o tipo ecológico, deixando as espécies estudadas equiparadas quanto ao acúmulo de metais.

Foi observado também que existe uma maior translocação das raízes para a parte aérea de metais que podem favorecer o metabolismo fotossintético como o Cu e o Zn (nutrientes essenciais). Já metais como o Cr conhecido por sua toxicidade foi encontrado em concentrações maiores que o Cu nas raízes e não translocados para a parte aérea, sugerindo que existe uma seleção com relação ao metal translocado.

MacFarlane e Burchett (1999) relataram que no transporte de metais das raízes para a parte aérea das plantas, os metais conseguem ser imobilizados por meio de armazenamento em paredes celulares e vacúolos, ou por ligação a fitoquelatinas (proteínas de ligação de metais) e conseguem reter estes íons nas raízes para evitar danos no aparato fotossintético.

Quando levamos em consideração o rio, observamos que os indivíduos coletados no RPS apresentam maiores concentrações de metais em seus tecidos comparados com indivíduos da mesma espécie e período do RI, isso pode ser correlacionado com o maior impacto que no RPS. O rio Paraíba do Sul é fonte de abastecimento e despejo de efluentes de muitos municípios dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro passando por importantes polos industriais do país, sua água é responsável pela maior parte da produção do PIB (Produto Interno Bruto) do país.

A capacidade que as macrófitas aquáticas possuem de acumular metais é consequência das interações destes organismos com vários fatores como adsorção, absorção, interação com sítios metabólicos e estocagem (Valitutto, 2004). A importância desses mecanismos no acúmulo de metais das macrófitas não depende somente das condições ambientais, mas também é estritamente

ligado as características biológicas, como o tipo ecológico destas plantas (Valitutto, 2004).

No presente estudo foi verificada variação sazonal de metais nas plantas. Outros estudos indicam que existe variação temporal nas concentrações de metais nas amostras de *E. crassipes* (flutuante) proveniente do Baixo RPS com maior acúmulo de Cu durante o período seco (Campanelli *et al.*, 2010). Porém, outros estudos na mesma região com o material particulado em suspensão mostraram maior concentração deste elemento no período chuvoso (Salomão, 1997; Carvalho *et al.*, 1999). Isto corrobora com os resultados do presente estudo, no qual foram encontradas maiores concentrações deste elemento no período chuvoso na espécie *E. azurea* (emersa).

A bacia do baixo Paraíba do Sul e bacia do rio Itabapoana tem sua economia ligada principalmente a agricultura da cana-de-açúcar, e nestas monoculturas são utilizados agrotóxicos a base de Cu. A melhor bioindicação da qualidade ambiental neste caso foi feita pela espécie de tipo ecológico enraizado, pois a espécie flutuante, pode migrar com o fluxo do rio e não estar refletindo a condição ambiental do local onde foi coletada.

Alterações na estrutura do corpo vegetal também são descritas na literatura relacionada a metais, os resultados de anatomia vegetal obtidos neste estudo indicaram a presença de aerênquima mais proeminente em indivíduos do rio Paraíba do Sul. O aerênquima pode se desenvolver através da morte celular. Com a decomposição das células mortas surge a deficiência de oxigênio e isto provoca a produção de etileno (que estimula o desenvolvimento do aerênquima) pelo estímulo anaeróbico (Fahn, 1982). A exposição de plantas aquáticas a metais também pode levar os indivíduos a um aumento do aerênquima, pois elementos metálicos como o Cd podem estimular a produção do hormônio etileno em espécies vegetais e conseqüentemente o aumento do aerênquima nestes indivíduos (Chen & Kao, 1995; Toppi *et al.*, 1998), como visto nos indivíduos do rio Paraíba do Sul embora nesta pesquisa não tenha sido feita a quantificação de etileno.

O aerênquima é constituído de um grande espaço intercelular, onde o ar é armazenado. Esta estrutura é muito comum em plantas aquáticas como o aguapé

(*Eichhornia*) e plantas que vivem em regiões alagadas como *Lavoisiera francavillana*. A presença do aerênquima nos diferentes órgãos está relacionada à manutenção da maior eficiência de trocas gasosas (Coan *et al.*, 2002), os indivíduos do rio Paraíba do Sul apresentam aerênquima maior que os indivíduos do rio Itabapoana, isto poderia estar relacionado a maior concentração de metais nos indivíduos do rio Paraíba do sul uma vez que tal estrutura pode potencializar as trocas gasosas.

Apenas a espécie *E. azurea* (emersa) apresentou em seu mesofilo estruturas que possivelmente são compostos fenólicos (compostos químicos utilizados pelos vegetais como quelante de metais). A formação de compostos fenólicos e a sua ligação intracelular em plantas submetidas a Al^{+3} como forma de desintoxicação já foi descrita na literatura (Kidd *et al.*, 2001). Indivíduos de tipo ecológico enraizado podem estar mais sujeitos a contaminações pontuais e por estarem fixos permanecem susceptíveis a contaminação, tendo que apresentar uma forma mais eficaz de desintoxicação por metais.

A maior quantidade de compostos fenólicos observados neste estudo na espécie *E. azurea* de ambos os rios também foi verificado por Schützendübel *et al.* (2001) em raízes de *Pinus sylvestris* L., após a exposição destes indivíduos a metais, sugerindo que a produção de tais substâncias provavelmente é uma estratégia de proteção da planta contra o estresse metálico. Sabe-se que a produção destes compostos pode estar relacionada ao acúmulo de metal, estas substâncias, especialmente taninos, são descritos como quelantes de metais (Lavid *et al.* 2001).

A epiderme das raízes de ambas as espécies do rio Paraíba do Sul apresentou características mais desorganizadas comparadas com a epiderme dos indivíduos do rio Itabapoana. Isto poderia estar ocorrendo em função dos indivíduos do rio Paraíba do Sul serem mais expostos a poluentes metálicos. Pela epiderme ser o tecido com maior contato e responsável pela entrada das substâncias para dentro do indivíduo sofrem os primeiros sintomas de estresse. Eleftheriou *et al.* (1993) observaram que os efeitos mais intensos da toxicidade causada por metais no sistema radicular ocorrem nas paredes celulares da epiderme das células das raízes.

Eleftheriou *et al.* (1993) também relataram alterações morfológicas em raízes de indivíduos submetidos a estresse metálico. Segundo esses autores, em raízes mantidas sob condições de estresse ocorreram alterações morfoestruturais, além de danos nas células epidérmicas e em células internas do córtex, que podem se destacar, distorcer e até mesmo colapsar.

A presença dos tricomas em plantas submetidas a tratamento com metais é vastamente discutida na literatura, sendo os tricomas descritos como estruturas da epiderme que podem acumular e/ou secretar metais, tendo em vista que estas células fazem parte do tecido mais externo da folha (Salt *et al.* 1995; MacFarlane & Burchett, 1999; Küpper *et al.*, 2000; Psaras *et al.*, 2000; Lavid *et al.*, 2001). Os resultados deste estudo sugerem que indivíduos de tipo ecológico enraizado possuem estratégias aclimatativas (maior quantidade de tricomas e compostos fenólicos) diferentes de indivíduos de tipo ecológico flutuante quando em ambientes que possam estar contaminados por metais.

Foram observados também a presença de cristais de ráfide (oxalato de cálcio) acumulados no parênquima das células das raízes da espécie *E. azurea* (emersa) de ambos os rios, o mesmo não foi observado nas raízes da espécie *E. crassipes* (flutuante). A presença de cristais de oxalato de cálcio também foi verificada por Mazen e Maghraby (1998) em experimento com *E. crassipes* expostos à metais.

Os cristais, geralmente, ocorrem com maior frequência em plantas que estão submetidas a estresse, podendo ser considerados como produtos finais do metabolismo celular e também podem funcionar como meio de remoção do excesso de oxalato de cálcio, acumulando em quantidades tóxicas no interior da célula (Franceschi & Horner, 1980). O metal juntamente com o Ca, pode se acumular no vacúolo formando cristais, como observado por Lavid *et al.* (2001) em *Nymphaea*. Mazen & El Maghraby (1997/1998) também observaram que a exposição de *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms aos metais Cd, Pb, Sr promoveu a formação de cristais de oxalato de cálcio (ráfides). Os metais podem ser complexados nos cristais, impedindo que um dano maior seja causado às plantas. Estes resultados sugerem que indivíduos de tipo ecológico sésil possuem estratégias de proteção contra toxicidades diferentes de indivíduos de tipo

ecológico emersa, uma vez que estes indivíduos estão mais propensos a contaminações pontuais.

7. Conclusão

Durante o período de estudo, as mudanças nas características físico-químicas do rio Paraíba do Sul e rio Itabapoana não afetaram o desempenho fotoquímico de *E. crassipes*.

Os pigmentos fotossintéticos foram sensíveis à presença de metais nos indivíduos sendo a clorofila *a* o pigmento mais susceptível a danos por estresse ambiental.

O período do ano (seco/chuvoso) e local de coleta influenciaram mais nas concentrações de metais nos tecidos das raízes e parte aérea dos indivíduos que o tipo ecológico. Isto refuta a hipótese de que a espécie de tipo ecológico enraizado (*E. azurea*) apresentará maior concentração de metais independentemente do local de coleta e período do ano.

Indivíduos do rio Paraíba do Sul apresentaram exoderme e epiderme com alterações morfológicas e células desorganizadas com relação aos indivíduos do rio Itabapoana o que confirma a hipótese de que as espécies do rio Paraíba do Sul apresentaram maior comprometimento anatômico que as espécies do rio Itabapoana.

Plantas do tipo ecológico distintos apresentaram diferentes estratégias anatômicas para a proteção contra o estresse metálico, a espécie emersa (*E. azurea*) investiu mais em cristais (oxalato de cálcio e areia) e produção de compostos fenólicos que a espécie flutuante (*E. crassipes*).

8. Referências bibliográficas

- ADAMS, S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. *Americas Fishers Society*, 3: 104-112.
- ADMIRAAL, W.; TUBBING, G.M.J. & BREEBAART, L. 1995. Effects of phytoplankton on metal partitioning in the lower River Rhine. *Water Research*, 29: 941-946.
- ALVES DOS SANTOS, I. 2002. Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 499-507.
- BABU, T.S.; TRIPURANTHAKAM, S. & GREENBERG, B.M. 2005. Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1, 2-dihydroxyanthraquinone: synergist toxicity via reactive oxygen species. *Environmental Toxicology Chemical*, 24(12): 3030-3036.
- BARCELÓ, J. & POSCHENRIEDER, Ch. 1999. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M.N.V. & HAGEMEYER, J. (ed.). *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer, 183-206p.
- BARRETT, S.C.H. 1978. Floral biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Aquatic Botany*, 5: 217-228.
- BERNER, E.K. & BERNER, R.A. (1996). *Global Environment: Water, Air and Global Geochemical Cycles*. Prentice Hall, Inc. 453
- BIANCHI, M.; VESPRINI, J. & BARRETT, S.C.H. 2000. Trimorphic incompatibility in *Eichhornia azurea* (Pontederiacaceae). *Sex Plant Reprod*, 12: 203-208.

- BIANCHINI JR., I.; PACOBAHYBA, L.D. & CUNHA-SANTINO, M.B. 2002. Aerobic and anaerobic decomposition of *Montrichardia arborescens* (L.) Schott. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 14(3): 27-34.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; OQUIST, G.; SCHREIBER, U. & LECHNER, G. 1989. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*, 3(4): 497-514.
- BOONYAPOOKANA, B.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P. & SINGHAKAEW, S. 2002. Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 4: 87-100.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. 1992. *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542 p.
- BRITO, I.C. 1983. A importância dos bioindicadores vegetais no ambiente aérea, aquático e terrestre: plantas indicadoras do mercúrio. In: Congresso Nacional de Botânica, 34. Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: SBB/UFRGS, 1983. V.1, p.115-119.
- BURKEN, J.G. & SCHNOOR, J.L. 1996. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *Journal of Environmental Engineering*, 122: 958-963.
- CAMARGO, A.F.M.; PEZZATO, M.M. & HENRY-SILVA, G.G. 2003. Fatores limitantes à produção primária de macrófitas aquáticas. In: Thomaz, S.M. & Bini, L.M. *Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas*. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 59-83p.
- CAMPANELI, L.B.; SOUZA, C.M.M.; RIBEIRO, T.S.; REZENDE, C.E.; AZEVEDO, R.A.; ALMEIDA, M.G & VITÓRIA, A.P. 2010. Variação espaço-temporal de metais em aguapé [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms], material particulado

aderido às raízes de aguapé e no sedimento em dois rios do sudeste brasileiro. *Biotemas*, 23(4): 119-128.

CARVALHO, C.E.V. & TORRES, J.P.M. 2002. The Ecohydrology of the Paraíba do Sul River, Southeast Brazil. *IAHS Special Publication*, 6: 179-191.

CARVALHO, C.E.V. 1997. *Distribuição espacial, temporal e fluxo de metais pesados na porção inferior da Bacia de Drenagem do Rio Paraíba do Sul, RJ*. Tese (Doutorado em Geociências-Geoquímica Ambiental), Universidade Federal Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 164p.

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, RJ. *Journal of Brazilian Environmental Geology*, 37: 297-302.

CEIVAP, 2010. Associação pró-gestão das águas da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul. Plano de recursos hídricos da bacia do rio Paraíba do sul: resumo. Rio de Janeiro, vol. 1.

CHEN, S.L. & KAO, C.H. 1995. Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Science*, 104: 135-138.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, v.212, p.475-486, 2001.

COAN, A.I.; SCATENA, V.L. & GIULIETTI, A.M. 2002 Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae Brasileiras. *Acta Botanica Brasilica*, 16(4): 371-384

COOKER, E.G. & MATHEUS, P.J. 1983. Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. *Water Science and Technology*, 15(1): 209-225.

COSBY, B.J.; HORNBERGER, G.M. & KELLY, M.G. 1984. Identification of photosynthesis-light models for aquatic systems: II. Application to a macrophyte dominated stream. *Ecological Modeling*, 23: 25-51.

- DHIR, B.; SHARMILA, P. & SARADHI, P.P. 2008. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 61-70.
- EBRAHIMPOUR, M. & MUSHRIFAH, I. 2008. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. *Environmental Geology*, 54: 689–698.
- ELEFTERIOU, E.P. & KARATAGLIS, S. 1989. Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper-polluted fields. *Botanic Acta*, 102: 134-140.
- ELEFTHERIOU, P.E.; MOUSTAKAS, M. & GRAGISKOS, N. 1993. Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. *Journal of Experimental and Botany*, 44(2): 427-436.
- ESTEVEES, F.A. 1998. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2º Ed., 602p.
- ESTEVEES, F.A. & CAMARGO, A.F.M. 1986. Sobre o papel das macrófitas aquáticas na estocagem e ciclagem de nutrientes. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 1: 273-298.
- FAHN, A. 1982. *Plant Anatomy*. Oxford: Pergamon Press. 544p.
- FIGUEIREDO, R.O. 1999. *Transporte de carbono e nitrogênio no baixo Paraíba do Sul: Fluxos e Processos, Campos, Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 177p.
- FRANCESCHI, V.R. & HORNER, H.T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Botany Review*, 46: 361-427.
- GENEVIÈRE, M.C.; DUTHIE, H.C. & TAYLOR, W.D. 1997. Models of aquatic plant productivity: a review of the factors that influence growth. *Aquatic Botany*, 59: 195-215.

- 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.
- GRATÃO, P.L.; POLE, A.P.J. & AZEVEDO, A.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32: 481-494.
- GUILHERME, L.R.G.; MARQUES, J.J.; PIERANGELI, M.A.P.; ZULIANE, D.Q.; CAMPOS, M.L. & MARQUI, G. 2005. Elementos traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em Ciências do Solo*, 4: 345-390.
- HAIDER, S.Z.; MALIK, K.M.A.; RAHMAN, M.N. & WADSTEN, T. 1983. Laboratory model experiments for the synthesis of some bio-inorganic complexes presumably involved in the metal uptake by *water hyacinth*. *Conference on Water Hyacinth*, 351-360p.
- HECKATHORN, S.A.; MUELLER, J.K.; LAGUIDICE, S.; ZHU, B.; 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. & PRICE, A.H. 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. *In*: Hendry, G.A.F. & Grime J.P. (Eds.) *Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman & Hall, 148-152p.
- HENRY-SILVA, G.G. & CAMARGO, A.F.M. 2003. Avaliação sazonal da biomassa da macrófita aquática *Eichhornia azurea* em um rio de águas brancas da bacia hidrográfica do rio Itanhaém (litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil). *Hoehnea*, 30(1): 71-77.
- HENRY-SILVA, G.G. & CAMARGO, A.F.M. 2005. Interações ecológicas entre as macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes*. *Hoehnea*, 32(3): 445-452.
- HOLM, L.G.; WELDON, L.W. & BLACKBURN R D. 1969. Aquatic seeds. *Science*, 166-699.

- HORNE, A.J. & GOLDMAN, C.R. 1994. *Limnology*. New York: MacGraw-Hill inc., 576p.
- JAYAWEERA, M.W.; KASTURIARACHCHI, J.C.; KULARATNE, R.K.A. & WIJEYEKOON, L.J. 2008. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *Journal of Environmental Management*, 87: 450-460.
- KARATAGLIS, S., M. MOUSTAKAS AND L. SYMEONIDIS, 1991. Effect of heavy metals on isoperoxidases of wheat. *Biol. Plant*, 33: 3-9
- KAUR, G.; KUMAR, S.; NAYYAR, H. & UPADHYAYA, H.D. 2008. Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects on quantitative and qualitative components of seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 457–464.
- KIDD, P.S.; LLUGAY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B. & BARCELÓ, J. 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52(359): 1339-1352.
- KIRK, J.T.O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems* (Second Edition). Cambridge: Cambridge University Press, 509p.
- KLEIN, V.L.G. & AMARAL, F.C.S. 1988. Plantas daninhas aquáticas flutuantes. *Informe Agropecuário*, 13(150): 35-43.
- KRAUSE, G.H. & WEIS, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F. & SPILLER, M. 1998. In situ identification of heavy metalsubstitute chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58: 123-133.

- LAGE-PINTO, F.; OLIVEIRA, J.G.; DA-CUNHA, M.; SOUZA, C.M.M.; REZENDE, C.E.; AZEVEDO, R.A. & VITÓRIA, A.P. 2008. Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplasts of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environment and Experimental Botany*, 64(3): 307-313.
- LAVI, N.; BARKAY, Z. & TEL-OR, E. 2001. Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*, 212: 313-322.
- LAVI, N.; SCHWARTZ, A.; YARDEN, O. & TEL-OR, E. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*, 212: 323-331.
- LI, M.; ZHANG, J.; TAO, L. & LI, W. 2008. Ecophysiological responses of *Jussiaea repens* to cadmium exposure. *Aquatic Botany*, 88: 347-352.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Met. Enzymol.*, v. 148, p. 331-382, 1987.
- LOKESHWARI, H. & CHANDRAPPA, G.T. 2007. Effects of heavy metal contamination from anthropogenic sources on *Dasarahalli tank*, India. *H. Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 12: 121-128.
- MACFARLANE, G.R. & BURCHETT, M.D. 1999. Zn distribution and excretion in the leaves of the Grey Mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Veirh. *Environmental and Experimental Botany*, 41: 167-175.
- MAINE, M. A. ROMERO NÚÑEZ, S. MARRUGO NEGRETE, E. J. L. ARIAS RIOS, J. E. HERNAN,R. 2011 Hg, Cu, Pb, Cd, and Zn Accumulation in Macrophytes Growing in Tropical Wetlands. *Water Air Soil Pollut*, 216:361 - 373.
- MALUGA, D.P. 1964. Biogeochemical methods of prospecting. New York: Consultants Bureau Plenum Press.
- 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. 1997/1998. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biologia Plantarum*, 40: 411-117.
- MCNULTY, I.B. & NEWMAN, D.W. 1961. Mechanisms of fluoride induced chlorosis. *Plant Physiology*, 36: 385-388.
- MILNE, J.M.; MURPHY, K.J.; SIDINEI, M. & THOMAZ, S.M. 2006. Morphological variation in *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in relation to aquatic vegetation type and the environment in the floodplain of the Rio Paraná, Brazil. *Hydrobiologia*, 570: 19-25.
- MISHRA, K.K.; RAÍ, U.N. & PRAKASH, O. 2007. Bioconcentration and Phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 130: 237-243.
- MOLISANI, M.M.; SALOMÃO, M.S.M.B.; OVALLE, A.R.C.; REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. & CARVALHO, C.E.V. 1999. Heavy metals in sediments of the lower Paraíba do Sul river and estuary, RJ, Brasil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(5): 682-690.
- NEUMANN, D.; ZUR-NIEDEN, U.; LICHTENBERGER, O. & LEOPOLD, I. 1995. How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *Journal of Plant Physiology*, 146(5-6): 704-71.
- NEUMANN, D.; ZUR-NIEDEN, U.; SCHWIEGER, W.; LEOPOLD, I. & LICHTENBERGER, O. 1997. Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. *Journal of Plant Physiology*, 151(1): 101-108.
- OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O. & JORDÃO, C.P. 2001. Absorção e acúmulo de Cd e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3): 329-341.
- 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.

PAGIORO, T.A. & THOMAZ, S.M. 1999. Influence of the decomposition of *Eichhornia azurea* on selected abiotic limnological variables of different environments of the floodplain of the high Paraná river. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11(2): 157-171.

PAIVA, L.B.; OLIVEIRA, J.G.; AZEVEDO, R.A.; RIBEIRO, D.R.; SILVA, M.G. & VITÓRIA, A.P. 2009. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr³⁺ and Cr⁶⁺. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 403-409.

PANDA, S.K. & CHOUDHURY, I. 2005. Changes in nitrate reductase (NR) activity and oxidative stress in moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc toxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 191-197.

PEDRALLI, G. 2003. Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade da água: alternativas para usos múltiplos de reservatórios. In: Thomaz, S.M. & Bini, L.M. (eds.). *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 171-188p.

PERALES-VELA, H.V.; GONZALEZ-MORENO, S.; MONTES-HORCASITAS, C. & CANIZARES VILLANUEVA, R.O. 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrasulatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, 67: 2274-2281.

PEREIRA, G.C. & EBECKEN, N.F.F. 2009. Knowledge discovering for coastal waters classification. *Expert Systems with Applications*, 36(4): 8604-8609.

PETR, T. 2000. *Interactions between fish and aquatic macrophytes un inland waters. A review*. FAO Fishers Technical Paper, Rome: FAO, 396: 185p.

PIETERSE, A.H. & MURPHY, K.J. 1990. *Aquatic weeds: The ecology and management of nuisance aquatic vegetation*. Oxford: Oxford Science Publication, 593p.

- PLATT, T.; GALLEGOS, C.L. & HARRISON, W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 38: 687-701.
- POMPÊO, M.L.M. & MOSCHINI-CARLOS, V. 2003. Macrófitas Aquáticas e Perífiton: Aspectos Ecológicos e Metodológicos. São Carlos: Ed. Rima.
- POMPÊO, M.L.M. 2001. As macrófitas aquáticas. Disponível em <<http://vivimarc.sites.uol.com.br/asmacrofitasaquaticas.html>> Acesso em: 10 fev. 2014.
- 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.
- PORTO, M.L. 1981. Beiträge zur Schwermetallvegetation von Rio Grande do Sul, Brasilien. Tese (Doutorado em Ecologia Vegetal), Universidade de Ulm, República Federal da Alemanha, 76p.
- POTT, V.J & POTT, A. 2000. *Plantas aquáticas do Pantanal*. Brasília: EMBRAPA, 353p.
- PRASAD, M.N.V. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental Experimental Botany*, 35: 525-545.
- PSARAS, G.K.; CONSTANTINIDIS, T.H.; COTSOPOULOS, B. & MANETAS, Y. 2000. Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: evidence that the metal is excluded from both guard cells and trichomes. *Annals of Botany*, 86: 73-78.
- RAVERA, O; BEONE, G.M; CENCI, R. & LODIGIANI, P. 2003. Metal concentrations in *Unio pictorum mancus* (Mollusca, Lamellibranchia) from 12 Northern Italian lakes in relation to their trophic level. *Journal of Limnology*, 62(2): 121-138.

- ROHÁČEK, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40: 13-29.
- SALOMÃO, M.S.M.B. 1997. *Dinâmica do material particulado em suspensão e metais pesados associados na porção inferior do Rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 35p.
- SALOMÃO, M.S.M.B. 1999. *Dinâmica de metais pesados nas frações particulada e dissolvida na porção inferior do rio Paraíba do Sul, RJ*. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 82p.
- SALOMÃO, M.S.M.B.; MOLISANI, M.M.; OVALLE, A.R.C.; REZENDE, C.E.; LACERDA, L.D. & CARVALHO, C.E.V. 2001. Particulate heavy metal transport in the lower Paraíba do Sul River basin, southeastern, Brazil. *Hydrology Proceedings*, 15(4): 587-593.
- SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J. & RASKIN, I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology*, 109: 1427-1433.
- SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. & DAS, P. 2001. Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L) in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1281-1290.
- SAMECKA-CYMERMAN, A. & KEMPERS, A.J. 2007. Heavy metals in aquatic macrophytes from two small rivers polluted by urban, agricultural and textile industry sewages S.W. Poland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 198-206.
- SAND-JENSEN, K. 1989. Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. *Aquatic Botany*, 34: 5-25.

- SANTOS, M. 2000. *Paspalum notatum* Flüggé var. *notatum* (Poaceae) em ambientes com e sem rejeitos de mineração de carvão: morfo-anatomia e bioacumulação de metais pesados. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 154p.
- SARTORIO, A.P, 2011. Bioindicadores para determinação de metais da Itaipu Binacional, Paraná, Brasil. Dissertação apresentada a Universidade do Oeste do Paraná, Pós-graduação em zootecnia, produção e nutrição Vegetal.
- SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS. K.; LANGENFELD- HEYSER, R.; GODBOLD, D.L. & POLLE, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 127: 887-898.
- SHARMA, D.C. & SHARMA, C.P. 1993. Chromium uptake and its effects on growth and biological yield of wheat. *Cereal Research Communications*, 21: 317-321.
- SILVEIRA, M.P. Aplicação do Biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios. 2004. Embrapa Meio Ambiente 7:60.
- SHI, B.; ALLEN, H.E.; GRASSI, M.T. & HUIZHON, M. 1998. Modeling copper partitioning in surface waters. *Water Reseachers*, 32(12): 3756-3764.
- SHRIVASTAVA, P.; SAXENA, A. & SWARUP, A. 2003. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (M. P.) India. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 8: 1-4.
- SINHA, S.; SAXENA, R. & SINGH, S. 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidants enzymes. *Chemosphere*, 58(5): 595-604.

- SINHA, S.; BASANT, A.; MALIK, A. & SINGH, K.P. 2009. Multivariate modeling of chromium-induced oxidative stress and biochemical changes in plants of *Pistia stratiotes* L. *Ecotoxicology*, 18: 555-566.
- 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.
- SRIDHAR, B.B.M.; HAN, F.X.; MONTS, D.L. & SU, Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental and Experimental Botany*, 54: 131-141.
- STEIN, C.E. 2011. Estudo do papel da *Spartina alterniflora* como espécie bioindicadora de contaminação por elementos traço no Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (SP) Dissertação Instituto oceanográfico da Universidade de São Paulo.
- SUSCHKA, J.; RYBORZ, S. & LESZCZYNSKA, I. 1994. Surface water and sediment contamination in a old industrial region of Poland - two critical examples. *Water Science Technology*, 29: 107-114.
- THOMAZ, S.M. & BINI, L.M. 1998. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 10(1): 103-116.
- TOPPI, L.S.; LAMBARDI, M.; PAZZAGLI, L.; CAPUGGI, G.; DURANTE, M. & GABBRIELLI, R. 1998. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. *Plant Science*, 137: 119-129.
- UNEP - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME/IOC/ICES. 1991. Review of contaminants in marine mammals. *Marine Mammal Technical Report*, 2: 23p.
- UPADHYAY, R.K. & PANDA, S.K. 2005. Biochemical changes in *Azolla pinata* L. under chromium toxicity. *Journal of Plant Biology*, 32: 49-52.

- VAJPAYEE, P.; TRIPATHI, R.D.; RAI, U.N.; ALI, M.B. & SINGH, S.N. 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41: 1075-1082.
- VALITUTTO, R.S. 2004. Acumulação de poluentes inorgânicos por macrófitas aquáticas nos reservatórios de Santana e Vigário, Barra do Pirai-RJ. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ.
- VAN KOOTEN, O. & SNEL, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- VERECKEN, H.; BAETENS, J.; VIAENE, P.; MOSTAERT, F. & MEIRE, P. 2006. Ecological management of aquatic plants: Effects in lowland streams. *Hydrobiologia*, 570(1): 205-210.
- VESK, P.A. & ALLAWAY, W.G. 1997. Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a rainyland receiving urban run-off. *Aquatic Botany*, 59: 33-44.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J. & AZEVEDO, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57: 701-710.
- VITÓRIA, A.P.; LAGE-PINTO, F.; CAMPANELI, L.B.; AMEIDA, M.G.; SOUZA, C.M.M.; REZENDE, C.E.; AZEVEDO, R.A. & OLIVEIRA, J.G. 2010. Ecophysiological adaptation and metal accumulation in water hyacinth from two tropical rivers. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(1): 49-59.
- VITÓRIA, A.P.; LAGE-PINTO, F.; CAMPANELI, L.B.S.; CUNHA, M.; OLIVEIRA, J.G.; REZENDE, C.E.; SOUZA, C.M.M. & AZEVEDO, R.A. 2011. Structural and ecophysiological alterations of the water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] to anthropogenic stressors in Brazilian Rivers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5): 1059-1068.

- 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.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1996. Biological monitoring of chemical exposure in the workplace. vol. 1-2. Geneva: ONU.
- YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE & SARIN, N.B. 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 1428-1438.
- ZHU, T. & SIKORA, F.J. Ammonium and nitrate removal in vegetated and unvegetated gravel bed micocosm wetlands. *Water Science and Technology*, 32: 219-28.