

**AVALIAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM *Eichhornia crassipes* (MART.)  
SOLMS SUBMETIDA A Cr<sup>+3</sup>**

**ANDRESA LANA THOMÉ BIZZO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2015**

**Avaliações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.)Solms  
submetida a Cr<sup>+3</sup>**

Andresa Lana Thomé Bizzo

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

Orientadora: Prof.Dr<sup>a</sup>. Angela Pierre Vitória  
Coorientador: Dr.<sup>o</sup>. Guilherme Rodrigues Rabelo  
Campos dos Goytacazes  
Março de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

597 / 2015

Bizzo, Andresa Lana Thomé

Avaliações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.)  
Solms submetidas a Cr<sup>+3</sup> / Andresa Lana Thomé Bizzo. – Campos dos  
Goytacazes, 2015.  
x, 54 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e  
Biotecnologia. Laboratório de Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ecologia de ecossistemas

Orientador: Vitória, Ângela Pierre

Bibliografia: f. 41-49

1. Macrófitas aquáticas 2. Cromo 3. Ecofisiologia 4. Anatomia  
5. Cloroplasto I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
II. Título

551.48  
B625a

**Avaliações ecofisiológicas e estruturais em *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms  
submetida a Cr<sup>+3</sup>**

**Andresa Lana Thomé Bizzo**

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

Aprovada em 27 de março de 2015.

Comissão Examinadora:




---

Dr<sup>a</sup> Tarçila Maria da Silva Moraes  
(IFFluminense)



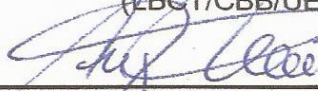
---

Dr<sup>a</sup> Marina Satika Suzuki  
(LCA/CBB/UENF)



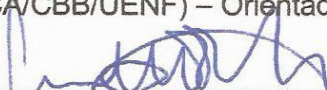
---

Dr<sup>a</sup> Maura da Cunha  
(LBCT/CBB/UENF)



---

Dr<sup>a</sup> Angela Pierre Vitória  
(LCA/CBB/UENF) – Orientadora



---

Dr<sup>o</sup> Guilherme Rodrigues Rabelo  
(LBCT/CBB/UENF) – Coorientador

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por me iluminar, me dar força e suporte em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais Vitório e Mônica, pela dedicação, amor, compreensão e apoio, acreditando sempre em mim. Muito obrigada!!

Agradeço ao meu irmão Andrew Victor, por toda cumplicidade e palavras incentivadoras sempre. Agradeço aos meus avós por toda preocupação e incentivo.

Agradeço a minha orientadora Angela Pierre Vitória, pela oportunidade, por compartilhar o conhecimento, pela paciência, por todo aprendizado que obtive durante este tempo, e por também acreditar em mim.

Agradeço ao Drº Guilherme Rodrigues Rabelo pela coorientação, por toda colaboração e paciência, contribuindo para a realização e enriquecimento deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA), em especial aos colegas de curso que trabalhamos em equipe nas disciplinas que compartilhamos.

Agradeço aos meus companheiros de Laboratório, Milena, Tati, Fabrício e Jorge, por todo suporte, pela convivência e desesposos compartilhados, proporcionando bons momentos de amizade. Em especial agradeço a doutoranda Maria Angélica Gomes, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados, por toda contribuição neste trabalho e pela amizade, fazendo nossos campos bem divertidos.

Agradeço ao LBCT pela viabilidade dos estudos de microscopia, a Professora Maura da Cunha, e a técnica Bia pela amizade e auxílios.

Agradeço a FAPERJ por fomentar e tornar possível a realização deste projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço à banca examinadora por aceitar contribuir neste trabalho.

Agradeço a todas amigas e companheiras, em especial Lara, Thaís, Pollyana, Fabi, Rebeka, Roberta e Thaíssa por estarem sempre ao meu lado em toda essa trajetória, proporcionando momentos únicos.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram para minha formação profissional e pessoal.

# Sumário

Sumário .....	II
Índice de Figuras .....	III
Resumo .....	VIII
Abstract .....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Metais e sistemas aquáticos.....	1
1.2. Macrófitas Aquáticas.....	2
1.3. Cromo (Cr) e sua fitotoxicidade .....	4
1.4. Fotossíntese e metais.....	5
1.5. Anatomia vegetal e metais.....	7
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo geral .....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. Hipóteses.....	10
4. Materiais e Métodos .....	11
4.1. Material Vegetal.....	11
4.2. Locais de Coletas .....	12
4.2.1. Rio Paraíba do Sul (RPS).....	12
4.2.2. Rio Muriaé .....	13
4.2.3. Rio Pomba.....	14
4.3. Experimento e número amostral.....	14
4.4. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	17
4.5. Pigmentos Fotossintéticos .....	17
4.6. Preparo de amostra para Microscopia .....	18
4.6.1. Fixação.....	18
4.6.2. Pós-fixação e desidratação da lâmina foliar.....	18
4.6.3. Infiltração e Inclusão da lâmina foliar .....	18
4.6.4. Fixação e desidratação da zona de absorção da raiz .....	18
4.6.5. Infiltração e Inclusão da zona de absorção da raiz .....	19

4.6.6.	Microscopia Óptica .....	19
4.6.7.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	19
4.6.8.	Histoquímica.....	20
4.7.	Análises estatísticas .....	20
5.	Resultados.....	21
5.1.	Fluorescência da clorofila a .....	21
5.2.	Pigmentos fotossintéticos .....	21
5.3.	Histoquímica.....	24
5.4.	Comparação anatômica das raízes.....	25
5.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da folha .....	30
6.	Discussão .....	34
7.	Conclusão.....	40
8.	Referências .....	41
9.	Anexo 1 .....	50
10.	Anexo 2.....	51
11.	Apêndice 1 .....	53
12.	Apêndice 2 .....	54

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Características Morfológicas e estruturais de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé). Fonte: Adaptado de www.tropica.com..... 11
- Figura 2.** *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé). Fonte: Registro pessoal..... 12
- Figura 3.** Aclimação dos indivíduos de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms a casa de vegetação (A) Experimentos em casa de vegetação com *Eichhornia crassipes* submetida a 1mM de Cr<sup>+3</sup>(B, C e D), retirada de amostras para microscopia e quantificação de metais (E)..... 16
- Figura 4.** Parâmetros de Fluorescência da clorofila *a*: Fv/Fm = rendimento quântico potencial do FSII (A, B e C) Fv/Fo = eficiência da capacidade fotossintética (D, E e F) qP = quenching fotoquímico (G, H e I); qNP (J, K e L) e NPQ (M, N e O) = dissipação não-fotoquímica em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Muriaé, Paraíba do Sul (RPS) e Pomba exposto a 1 mM Cr<sup>+3</sup> por 0, 4 e 8 dias. Linhas cheias representam as plantas controle e as linhas pontilhadas as plantas expostas a 1mM Cr<sup>+3</sup>. Letras a e b diferença entre os rios. Letras x e y diferença entre os tempos. Ausência de letras = ausência de diferenças estatísticas (p<0,05). ..... 22
- Figura 5.** Pigmentos Fotossintéticos (nm.cm<sup>-2</sup>): clorofila *a* (A, B e C) clorofila *b* (D, e E F), clorofila total (G, H e I) clorofila *a*/clorofila *b* (J, K e L) e carotenóides (M, N e O) determinados em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Muriaé, Paraíba do Sul (RPS), e Pomba, exposta a 1 mM Cr<sup>+3</sup> por 0, 4 e 8 dias. Linhas cheias representam as plantas controle e as linhas pontilhadas as plantas expostas a 1mM Cr<sup>+3</sup>. Não houve diferença significativa entre tratamentos, rios e tempos (p<0,05). .... 23
- Figura 6.** Seções transversais de região da coifa de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Muriaé.; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Pomba ; G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul Barras Horizontais 50 µm.. ..... 27
- Figura 7.** Seções transversais da região com emissão de raízes laterais de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Muriaé; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Pomba G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a Cr<sup>+3</sup> respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul. Barras Horizontais 50µm. Arênquima (aer), Parede periclinal externa (ppe). ..... 28



**Figura 8.** Seções transversais da região da epiderme e córtex de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Muriaé; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Pomba G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul. Barras Horizontais 100  $\mu\text{m}$ . Arênquima (aer), Parede periclinal externa (ppe). ..... 29

**Figura 9.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de *E. crassipes* oriundos dos rios Muriaé indivíduos controle (A) e indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (B e C), rio Pomba indivíduos controle (D e E) e indivíduos expostos 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (F, G e H) e rio Paraíba do Sul controle (I) e indivíduos expostos 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (J e L). Foi evidenciado mitocôndria (Mit), cloroplasto (Chl), estroma (Str peroxissomos (Per), parede celular (CW) grãos de amido(Sta) , compostos fenólicos (Ph) e desorganização dos tilacóides(setas).),..... 32

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Teste histoquímicos realizados na zona de absorção das raízes <i>Eichhornia crassipes</i> (Aguapé) provenientes de 3 rios = Pomba, Muriaé e Paraíba do Sul (RPS), exposto a 1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias.....	24
<b>Tabela 2.</b> Descrição das alterações ultraestruturais do limbo foliar através da Microscopia Eletrônica de Transmissão de indivíduos de <i>E. crassipes</i> oriundos dos rios Muriaé, Pomba e Paraíba do Sul expostos a 1 mM de Cr <sup>+3</sup> por 4 dias.....	33
<b>Tabela 3.</b> Quantificação de Cromo nas raízes e folhas de <i>Eichhornia crassipes</i> oriundas dos rios Paraíba do Sul ; Muriaé e Pomba expostas as concentrações de 0 e 1 mM de Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Dados cedidos pela Doutoranda do curso de Ecologia e Recursos Naturais/UENF, Maria Angélica da Conceição Gomes.....	52
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros de Fluorescência da clorofila a Fv/Fm = rendimento quântico potencial do FSII; Fv/Fo = eficiência da capacidade fotossintética; qP = quenching fotoquímico; qNP = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica) em <i>Eichhornia crassipes</i> (Aguapé) provenientes de 3 rios = Paraíba do Sul (RPS), Muriaé e Pomba, exposta a 1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Letras maiúsculas comparam Controle e Cr no mesmo rio e tempo. Letras minúsculas (a e b) comparam os tempos em cada tratamento e rio. Letras minúsculas (x e y) comparam rios no mesmo tempo e tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas. p≤0,05. N = 6.....	53
<b>Tabela 5.</b> Conteúdos de Pigmentos Fotossintéticos (clorofila a (clo a), clorofila b (clo b) e carotenoides) determinados em <i>Eichhornia crassipes</i> (Aguapé) provenientes de 3 rios = Paraíba do Sul (RPS), Muriaé e Pomba, exposta a 1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Letras maiúsculas comparam tratamentos no mesmo rio e tempo (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). Letras maiúsculas comparam Controle e Cr no mesmo rio e tempo. Letras minúsculas (a e b) comparam os tempos em cada tratamento e rio. Letras minúsculas (x e y) comparam rios no mesmo tempo e tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas. p≤0,05. N = 6.....	54

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**Caro** – carotenoides

**Clo a** – Clorofila *a*

**Clo b** – Clorofila *b*

**CO<sub>2</sub>** – gás carbônico

**Cr** – Cromo

**Cr<sup>+3</sup>** – cromo trivalente

**DMSO** – dimetilsulfóxido

***E. crassipes*** – *Eichhornia crassipes*

**F<sub>0</sub>** – fluorescência mínima

**F<sub>m</sub>** – fluorescência máxima

**FSII** – fotossistema II

**F<sub>v</sub>** – Fluorescência variável

**F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>** – rendimento quântico variável

**F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>** – rendimento quântico da fluorescência clorofila *a*

**g** – grama

**HF** – ácido fluorídrico

**HNO<sub>3</sub>** – ácido nítrico

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

**l** – litro

**LBCT** – Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

**LCA** – Laboratório de Ciências Ambientais

**ml** – mililitro

**n** – número de amostras

**O<sub>2</sub>** – oxigênio

**pH** – potencial hidrogeniônico

**qN** – *quenching* não fotoquímico

**qNP** – *quenching* não fotoquímico

**qP** – *quenching* fotoquímico

**RPS** – rio Paraíba do Sul

**UENF** – Universidade Estadual do Norte Fluminense

**µg** – micrograma

**µl** – microlitro

## Resumo

*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é uma macrófita aquática emergente e flutuante que possui grande potencial de acúmulo de metais. Entretanto, o acúmulo intracelular desses metais nos vegetais pode induzir efeitos no metabolismo fisiológico, na anatomia e na ultraestrutura celular. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa verificaram maior assimilação de CO<sub>2</sub> nesta espécie quando exposta a 1 mM de Cr<sup>+3</sup>. O objetivo do presente estudo foi avaliar se esta melhoria fotossintética estava relacionada à alterações ecofisiológicas (fotoquímicas e de pigmentos), anatômicas e/ou ultraestruturais. Outro aspecto investigado foi se indivíduos de *E. crassipes* oriundos de três rios que diferem quanto a poluição (Paraíba do Sul, Muriaé e Pomba) apresentariam diferentes respostas a exposição a Cr<sup>+3</sup>. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, alterações anatômicas nas raízes e alterações ultraestruturais nas folhas foram avaliados em indivíduos expostos a 1mM de Cr<sup>+3</sup> (por 4 e 8 dias). Indivíduos de *E. crassipes* provenientes dos três rios expostos a 1mM de Cr<sup>+3</sup> não apresentaram alteração na maioria dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* ao longo do experimento. O rendimento quântico (Fv/Fm) se manteve estável (entre 0,84 e 0,88) e dentro dos valores estipulados pela literatura para plantas saudáveis, sugerindo que a presença do metal não comprometeu o funcionamento do fotossistema II. Também não foram observadas variações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Alterações anatômicas nas raízes de *E. crassipes* dos três rios expostas a 1mM de Cr<sup>+3</sup>, tais como o aumento do número de idioblastos, espessamento da exoderme, surgimento de cristais de oxalato de cálcio, possivelmente proporcionaram proteção a parte aérea. Análises ultraestruturais foliares em *E. crassipes* expostas a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> sugerem normalidade no processo fotossintético (presença de grãos de amido) e respostas contra danos decorrentes de estresse (aumento do número de plastoglóbulos, mitocôndria e peroxissomo, volume do estroma) auxiliando na proteção da planta. Não houve variação ecofisiológica, anatômica e ultraestrutural em função do rio de origem, mas em função da presença e do tempo de exposição a 1 mM de Cr<sup>+3</sup>.

## Abstract

*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms is a floating aquatic macrophyte that has great potential for the accumulation of metals. However, the intracellular accumulation of heavy metals in plants can induce physiological effects in metabolism, cellular anatomy, and ultrastructure. Previous studies of our research group found higher CO<sub>2</sub> assimilation in this species when exposed to 1 mM of Cr<sup>+3</sup>. The aim of this study was to assess whether this improvement was related to photosynthetic ecophysiological (photochemical and pigments), anatomical, and/or ultrastructural changes. Another aspect investigated was whether *E. crassipes* individuals from three rivers that differ in pollution (Paraíba do Sul, Muriaé, and Pomba) would present different responses to exposure to Cr<sup>+3</sup>. Chlorophyll *a* fluorescence parameters, photosynthetic pigment content, anatomical changes in roots, and ultrastructural changes in leaves were evaluated in individuals exposed to 1mM Cr<sup>+3</sup> (for 4 and 8 days). *Eichhornia crassipes* individuals from the three rivers exposed to 1 mM of Cr<sup>+3</sup> did not change in most fluorescence parameters of chlorophyll *a* during the experiment. The quantum yield (Fv/Fm) remained stable (between 0.84 and 0.88) and within the values stipulated in the literature for healthy plants, suggesting that the presence of metal did not affect the operation of photosystem II. Variation in the content of photosynthetic pigments was also observed. Anatomical changes in *E. crassipes* roots of the three streams exposed to 1 mM Cr<sup>+3</sup>, such as increasing the number of idioblasts, thickening of the exodermis, and the emergence of calcium oxalate crystals, possibly provided protection to the shoot. Leaf ultrastructural analysis in *E. crassipes* exposed to 1 mM Cr<sup>+3</sup> suggests normality in the photosynthetic process (presence of starch grains) and responses to damage resulting from stress (increased number of plastoglobules, mitochondria and peroxisomes, and stromal volume) aiding plant protection. Ecophysiological, anatomical, and ultrastructural variations were observed related to the presence and the time of exposure to 1 mM of Cr<sup>+3</sup>, but not to river of origin.

## 1. Introdução

Diversos estudos relatam que a presença de metais como o Cr prejudica o desenvolvimento das macrófitas, causando prejuízos no seu metabolismo (RAI et.al., 2004; NICHOLS et al., 2000; VAJPAYEE et al., 2001; PANDA & CHOUDRY, 2005). Entretanto, nosso grupo de pesquisa verificou a melhoria da assimilação de carbono em *E. crassipes* expostas a  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (Paiva et al. 2009). Acreditamos que avaliações ecofisiológicas (fotoquímica e pigmentos) anatômicas e ultraestruturais possam contribuir para a melhoria na fotossíntese de *Eichhornia crassipes* na presença de  $\text{Cr}^{+3}$ . Frente ao exposto, alguns questionamentos, os quais deram origem a este trabalho:

1. O que capacitaria esta espécie a se desenvolver melhor quando submetida a 1 mM  $\text{Cr}^{+3}$ ?
2. Alterações anatômicas e ultraestruturais estariam envolvidas nesta resposta?
3. Indivíduos de locais mais antropizados teriam melhores condições de tolerar e crescer na presença de  $\text{Cr}^{+3}$ ?

### 1.1. Metais e sistemas aquáticos

Os elementos metálicos estão presentes naturalmente em formações rochosas e são liberados lentamente no solo e lixiviados para ecossistemas aquáticos na presença de chuvas. Entre os fatores que mais contribuem para o seu aumento no sistema aquático estão fontes antrópicas, como descargas de efluentes domésticos e industriais não tratados em rios ou lagos, processo de mineração, aplicação de pesticidas na agricultura, manipulação urbana (controle de algas em piscinas e aquários) e precipitação em áreas com poluição atmosférica (PEREIRA et al., 2006).

Os sistemas aquáticos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística. Entretanto, estes corpos de água sofrem com poluição por

metais, sendo esta considerada um grave problema ambiental. Metais não são biodegradados, ao contrário de alguns poluentes orgânicos complexos que perdem toxicidade com a biodegradação. Os metais contaminam o ambiente, provocando também diferentes danos à biota. Metais em concentrações tóxicas são uma ameaça não só a saúde do ecossistema aquático, mas também a saúde humana através da contaminação de água potável e bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (HU *et al.*, 2007; QIAN *et al.*, 2009).

Dentre os metais alguns são considerados micronutrientes essenciais às plantas (Zn, Cu, Fe Cu, Ni e Mn) e outros são considerados não-essenciais (Cd, Cr, Hg, e Pb) (TAIZ & ZAIGER, 2009; FU E WANG, 2011). Entretanto, todos podem ser tóxicos a depender da concentração (CLEMENS, 2006), por terem a capacidade de causar efeito danoso a organismos vivos (HODGSON, 2004).

Com objetivo de controlar a qualidade de ambientes aquáticos, foram estabelecidos limites de concentração de elementos químicos considerados tóxicos baseados no tipo de ambiente e destino da água de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005.

No sistema aquático as macrófitas aquáticas estão sendo utilizadas como alternativa para soluções de contaminações oriundas de diversas atividades industriais e agrícolas, como a contaminação da água por metais (OLIVEIRA, 2001).

## **1.2. Macrófitas Aquáticas**

As macrófitas aquáticas podem ser definidas como “plantas macroscópicas” que habitam ambientes aquáticos ou terras úmidas. Possuem elevadas taxas de produção primária e habitam diversos ecossistemas aquáticos, dulcícolas e salobros, temporários ou permanentes, ambientes de água pouco movimentada ou corrente (WETZEL, 1981). O grupo abrange macroalgas, briófitas, pteridófitas e angiospermas. Entre suas características, podemos citar seu hábito aquático, capacidade de acumular biomassa, acelerar a ciclagem de nutrientes, ação como filtro ecológico e adubo (POMPÊO, 2008).

Algumas das macrófitas aquáticas mais amplamente estudadas no Brasil são aguapés (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), alface ou repolho d'água (*Pistia stratiotes* L.) e salvinia (*Salvinia auriculata*), pois são espécies nativas e as mais citadas por apresentarem problemas de crescimento descontrolado em reservatórios (THOMAZ, 2002). Esse grande desenvolvimento e abundância das macrófitas é decorrente da eutrofização natural, em função da introdução de nutrientes oriundos dos ecossistemas terrestres adjacentes por escoamento superficial ou pela introdução direta de despejos domésticos e industriais nos corpos d'água (TAVARES *et al.*, 2004).

Macrófitas aquáticas apresentam grande potencial de acúmulo de metais e por isso são utilizadas para estudos de qualidade da água e remoção destes elementos (MISHRA & TRIPATHI, 2008). A absorção de metais depende da forma química disponível no ambiente e do tipo ecológico da macrófita (submersa, flutuante livre, enraizada, entre outras) (TANNER, 2001).

Ao processo de absorção de metais pelas macrófitas aquáticas com objetivo de eliminá-los do meio aquático é dado o nome de fitorremediação. O uso de macrófitas aquáticas tem sido difundido, principalmente, devido a necessidade de alternativas mais viáveis do ponto de vista ecológico e econômico, de despoluição de ecossistemas aquáticos.

Entretanto, o acúmulo intracelular de metais nas espécies vegetais pode induzir efeitos drásticos no metabolismo fisiológico. Cada espécie tem capacidade de tolerar níveis diferenciados de diversos contaminantes (KAMAL *et al.*, 2004). Plantas que toleram e absorvem elevados níveis de determinados metais, que podem ser tóxicos a diversos organismos, são consideradas hiperacumuladoras (ZAVODA *et al.*, 2001). Estas apresentam, como característica, a hipertolerância a estes metais (CHANEY *et al.*, 1997; CLEMENS *et al.*, 2002).

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é uma macrófita aquática flutuantes, amplamente distribuída pelo mundo. Esta espécie possui grande capacidade de retenção de nutrientes, metais e sedimentos (PALMA-SILVA *et al.*, 2012), facilitando a remoção de impurezas da água (BRANCO *et al.*, 1985), apresentando eficiência como hiperacumuladora de metais. Estudos têm apresentado respostas tanto benéficas quanto maléficas de *E. crassipes* expostas a metais como o Cromo em diferentes concentrações. Entretanto, não é compreendido plenamente



o que a capacita a viver em condições muitas vezes restritivas a outras espécies vegetais (MISHRA & TRIPATHI, 2008; HU *et al.*, 2007).

### 1.3. Cromo (Cr) e sua fitotoxicidade

O Cr é um importante contaminante ambiental liberado em corpos aquáticos devido ao seu enorme uso industrial como na fabricação de pigmentos têxteis, conservantes, tintas, produtos de proteção da madeira, de acabamento de metais, em galvanoplastia e agentes de processo de curtumes (NATH *et al.*, 2005). Este elemento químico não é encontrado na natureza como um metal isolado, ocorrendo sempre como um mineral de cromo, oxigênio e ferro conhecido como "cromita" ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ). Apenas duas formas oxidativas,  $\text{Cr}^{+3}$  e  $\text{Cr}^{+6}$ , são suficientemente estáveis para ocorrer naturalmente. Estes são diferentes na carga, nas propriedades físico-químicas, bem como na reatividade química e bioquímica (KOTAS & STASICKA, 2000).

A natureza tóxica do Cr depende do seu estado de valência: a maior parte da literatura conclui que  $\text{Cr}^{+6}$  é mais tóxico do que o  $\text{Cr}^{+3}$ , por causa da sua solubilidade (SHANKER *et al.*, 2005). A absorção de Cr pode ocorrer via carreadores usados para a absorção de elementos essenciais para o metabolismo vegetal como  $\text{Fe}^{+3}$  e Al (SHANKER *et al.*, 2005). Embora efeito benéfico de pequenas concentrações de Cr no metabolismo vegetal tenha sido relatado, como maior assimilação de carbono (TERRY, 1981; BONET *et al.*, 1991, PAIVA *et al.*, 2009), ainda não há nenhuma evidência conclusiva de como se daria sua ação. Plantas expostas a Cr podem apresentar também vários danos ao metabolismo, tais como, redução de crescimento, indução de clorose em folhas jovens, redução do conteúdo de pigmentos e da taxa fotossintética, alteração das funções enzimáticas, danos nas células da raiz, como plasmólise, e modificações ultraestruturais nos cloroplastos e membrana celular (PANDA & PATRA, 1997; HU *et al.*, 2004).

Nas macrófitas, os metais são capazes de afetar sua fisiologia, como, alterações na membrana dos cloroplastos, degradação de pigmentos (clorofila e carotenóides), alteração na assimilação de  $\text{CO}_2$  e modificação na fluorescência da clorofila *a* (VAJPAYEE *et al.*, 2000; VERNAY *et al.*, 2007)

#### 1.4. Fotossíntese e metais

A toxicidade por metais comprometendo a fotossíntese pode ocorrer devido a diversos fatores, como, alterações do fluxo de elétrons na fase fotoquímica (RASHID, 1994), alteração da atividade enzimática nas reações da fase bioquímica (CHUGH & SAWHNEY, 1999), mudanças estruturais dos tilacóides, entre outros (MOLAS, 2002).

Análises da emissão da fluorescência da clorofila *a* e quantificação de pigmentos fotossintéticos constituem importantes ferramentas para estudos ecofisiológicos em plantas submetidas a estresse por metais.

Tais parâmetros vêm sendo largamente utilizados por oferecerem vantagens, como a rápida obtenção de resultados e alta sensibilidade (VAN KOOTEN & SNEL, 1990). Técnicas de fluorescência permitem a medida imediata do rendimento quântico dos fluxos de elétrons através do fotossistema II (FSII) e fornecem uma indicação de estresse da planta.

A determinação do rendimento quântico do FSII expressa a capacidade do sistema em converter energia luminosa em energia química. O rendimento quântico revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons do FSII (BOLHAR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). O FSII é susceptível a alguns tipos de estresse, incluindo os metais (OUZOUNIDOU *et al.*, 1997; PANDEY *et al.*, 1999).

Os parâmetros que em geral são registrados nas medições da fluorescência da clorofila *a* são: fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ), rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ), *quenching* fotoquímico ( $q_P$ ) e *quenching* não-fotoquímico ( $q_N$ ). Entre estes parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, a taxa  $F_v / F_m$  tem sido o mais amplamente utilizado para o medidor de tipo diferente de estresse (BOLHAR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989, OLIVEIRA *et al.*, 2002; DHIR *et al.*, 2008). Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão  $F_v/F_m$  deve variar entre 0,75 e 0,85 (BUTLER & KITAJIMA, 1975). A queda nos valores desta razão reflete a ocorrência de danos no centro de reação do FSII. O *quenching* fotoquímico ( $q_P$ ) indica a dissipação de luz (na forma de

fluorescência) para o processo fotossintético, o qual fornece um indicativo da proporção de centros de reação do PS II que estão abertos, ou seja, de centros de reação oxidados, capazes de transportarem elétrons ao absorverem a energia luminosa, ou ainda, capazes de serem reduzidos enquanto o *quenching* não-fotoquímico (qN) refere-se ao processo de dissipação de energia na forma de calor (região do infravermelho no espectro eletromagnético) (MAXWELL & JOHNSON, 2000; LICHTENTHALER & RINDERLE, 1988). Neste aspecto, a dissipação de energia na forma de calor atua como um mecanismo para minimizar condições estressantes no processo fotossintético (DEMMIG-ADAMS *et al.*, 1989), de modo que este excesso de energia luminosa absorvida não sobrecarregue e cause danos ao aparelho fotossintético.

Estudos tem investigado os efeitos dos metais sobre a fluorescência da clorofila *a* evidenciando a redução das razões de Fv/Fm, Fv/F0 e do *quenching* fotoquímico (qP) quando plantas são expostas a estes elementos (OUZOUNIDOU *et al.*, 1996; BURZYŃSKI & KLOBUS, 2004; VERNAY *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2014).

Associados aos dados de fluorescência da clorofila *a*, a quantificação de pigmentos fotossintéticos também contribui para estudos avaliando o efeito de metais (SINHA *et al.*, 2005; VITÓRIA *et al.*, 2011).

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético (TAIZ & ZEIGER, 2009). O acúmulo de metais pode reduzir a quantidade de pigmentos fotossintéticos, diminuindo o crescimento de plantas (PANDA & CHOUDHURY, 2005). A substituição dos íons de Mg<sup>2+</sup> nas moléculas de clorofila por certos metais, tais como Cu, Zn, Cd, Cr ou Hg têm sido observada em plantas expostas a metais, resultando em queda da taxa fotossintética (KÜPPER *et al.*, 1996). Plantas de aguapé submetidas a concentrações de cádmio de 0,1; 25; 50; 75 e 100 µg/mL apresentaram redução no conteúdo da clorofila *a* e *b* (MISHRA *et al.*, 2007).

Estudos tem mostrado que há um decréscimo na síntese de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, e carotenoides) promovidos por um aumento da concentração de Cr na solução nutritiva (BOONYAPOOKANA *et al.*, 2002; MCGRATH, 1982; TRIPATI & SMITH, 2000). As concentrações de clorofilas *a* e *b*, carotenoides e razão clorofila *a/b* foram reduzidas significativamente em *Salvinia mínima* expostas a 1 e 2 mg/L (0,0089 e 0,018 mM) de Cr (NICHOLS *et al.*, 2000).

Os carotenóides são exemplos de pigmentos fotossintéticos que atuam como fotoprotetores, agindo como mecanismo de segurança e evitando danos ao organismo (DEMING-ADAMS *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2006). Algumas plantas aquáticas apresentaram aumento no conteúdo de carotenóides quando expostas a tratamento com Cr (TRIPATI & SMITH, 2000; VAJPAYEE *et al.*, 2000). Esse aumento provavelmente tem relação com sua ação antioxidante, uma vez que espécies reativas de oxigênio são geradas como resultado da toxicidade do Cr. Em estudo com *Eichhornia crassipes* exposta a 1mM Cr<sup>+3</sup> por 4 dias, não foi verificada alteração nas concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenóides (PAIVA *et al.*, 2009). Os mesmos autores verificaram também o aumento da assimilação de carbono, porém, o que capacitaria esta espécie a melhorar seu desempenho fotossintético quando exposta a Cr ainda não é sabido. Mas, é possível que alterações anatômicas e ultraestruturais estejam envolvidas, como já foi verificado para a mesma espécie quando avaliada após crescimento em condições “in situ” (rios mais e menos poluídos) (LAGE-PINTO *et al.*, 2008).

### **1.5. Anatomia vegetal e metais**

Uma das principais estratégias das plantas em resposta a presença de metais é evitar a translocação destes metais a parte aérea (ALLUÉ *et al.*, 2013). De fato, grande parte dos metais traços que entram nas plantas são mantidas nas células radiculares, onde são detoxificados por complexação com aminoácidos, ácidos orgânicos ou peptídeos ligantes de metais e ou sequestrados pelos vacúolos (BENAVIDES *et al.*, 2005). Este fato restringe a translocação dos

metais aos órgãos aéreos, protegendo os tecidos foliares, e, conseqüentemente protege o metabolismo fotossintético dos danos.

Apesar destas estratégias, inúmeras modificações anatômicas nas raízes são frequentemente relatadas na literatura como consequência da presença de metais. Por exemplo, o aumento na espessura da epiderme, do córtex, da endoderme, no tamanho das células, no xilema, no floema, no cilindro vascular e na proporção de aerênquima das raízes (CASTRO *et al.*, 2009; VASELLATI *et al.*, 2001).

Experimentos com o Cr indicam acúmulo preferencial nas paredes celulares e em vacúolos no córtex de células radiculares (LIU & KOTTKE, 2003; MANGABEIRA *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2009). Entretanto, o mesmo elemento já foi encontrado em partes aéreas de *Eichhornia crassipes*, (KLUMPP *et al.*, 2002; SOLTAN & RASHED, 2003; MANGABEIRA *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2009).

A presença de metais nos tecidos da parte aérea, em concentrações mais elevadas do que normalmente tolerado pelo metabolismo da planta, pode inibir o crescimento por interferir em processos fisiológicos importantes como fotossíntese e a respiração (YRUELA, 2005). Conseqüências anatômicas sobre os tecidos foliares descrevem alterações na densidade estomática, no índice estomático, no tamanho dos estômatos, na espessura da epiderme, na cutícula, no parênquima paliçádico e modificações nos tecidos vasculares (CASTRO *et al.*, 2009; GRISI *et al.*, 2008). Alterações na ultraestrutura dos cloroplastos indicam desorganização dos tilacóides, perda de grãos de amido, formação de grânulos e/ou plastoglóbulos no cloroplasto (REBECHINI & HANZELY, 1974; CORRADI & BASSI, 1987; PANDA & CHOUDHURY, 2005) aumento do volume do estroma, o rompimento das membranas do cloroplasto (LIU & KOTTKE, 2004). Também já foram relatadas redução das cristas mitocondriais e plasmólise (LIU & KOTTKE, 2004) que podem acarretar na alteração das trocas gasosas e parâmetros da fluorescência da clorofila *a* (VERNAY *et al.*, 2007).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar aspectos ecológicos, fotossintéticos, anatômicos e ultraestruturais que capacitam a espécie *Eichhornia crassipes* a melhorar a assimilação de CO<sub>2</sub> quando expostas a 1mM de Cr<sup>3+</sup>.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar as respostas ecofisiológicas de *E. crassipes* exposta a 1mM de Cr<sup>3+</sup> por 4 e 8 dias;

Avaliar as alterações anatômicas e ultraestruturais de *E. crassipes* quando expostas a 1mM de Cr<sup>3+</sup> por 4 e 8 dias;

Verificar se indivíduos de *E. crassipes* oriundos de três rios, que diferem quanto a antropização (Paraíba do Sul, Muriaé e Pomba), apresentando diferentes respostas a exposição a Cr<sup>3+</sup>.

### 3. Hipóteses

1- Indivíduos submetidos a 8 dias de exposição a 1 mM de  $\text{Cr}^{3+}$  apresentam redução do rendimento fotossintético e pigmentos fotossintéticos quando comparados aos indivíduos submetidos a 4 dias, devido ao maior tempo de exposição e ao efeito cumulativo do metal nos organismos.

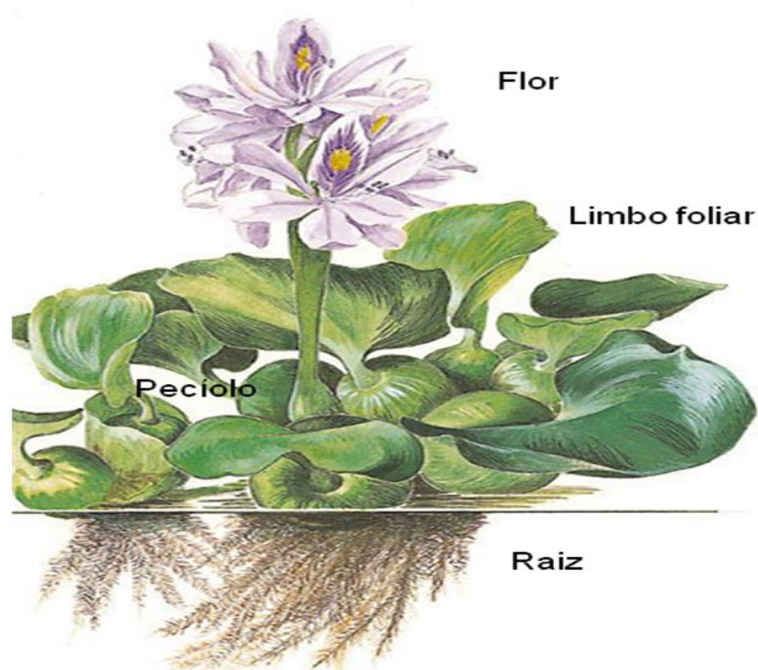
2- A melhoria da assimilação de  $\text{CO}_2$  de *E. crassipes* exposta a 1mM de  $\text{Cr}^{3+}$  envolve alterações nas raízes e ultraestruturais no cloroplasto tais como, aumento do número e tamanho destas organelas e variação na disposição das grana.

3- Indivíduos provenientes de rios mais antropizados apresentarão maior tolerância a este metal em função de adaptações anatômicas e ultraestruturais pré-existentes.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Material Vegetal

*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) é uma monocotiledônea da família Pontederiaceae, abundante em rios e em áreas de inundação fluviais, solos argilosos e siltosos férteis. Nativa da América do Sul tropical, esta espécie foi introduzida em todos os continentes (GOPAL, 1987), tendo se tornado uma espécie invasora. *Eichhornia crassipes* é descrita morfológicamente pela presença de rizoma, pecíolo, limbo foliar, raiz adventícia e estolão (caule flutuante). O pecíolo pode ser ocasionalmente inflado. As flores apresentam pétalas de coloração lilás. Esta espécie possui tanto propagação vegetativa quanto reprodução sexuada. A propagação vegetativa constitui-se na formação de um estolão na base do pecíolo de onde surge uma nova planta que mais tarde irá se desprender da planta mãe. A reprodução sexuada é considerada secundária nesta espécie (GOPAL, 1987).



**Figura 1.** Características Morfológicas e estruturais de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé). Fonte: Adaptado de [www.tropica.com](http://www.tropica.com)





**Figura 2.** *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé). Fonte: Registro pessoal.

## **4.2. Locais de Coletas**

As coletas dos indivíduos de *E. crassipes* foram realizadas em três rios: Rio Paraíba do Sul, rio Muriaé e rio Pomba. Os rios Muriaé e Pomba são afluentes do rio Paraíba do Sul.

### **4.2.1. Rio Paraíba do Sul (RPS)**

O rio Paraíba do Sul (RPS) tem sua nascente na Serra da Bocaina, no Estado de São Paulo, e sua foz em Atafona (São João da Barra), no Norte Fluminense. O RPS atravessa os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Alguns afluentes do rio Paraíba do Sul são o Jaguari, o Buquira, o Paraibuna, o Piabanha, o Pomba e o Muriaé. Efluentes domésticos não tratados e os resíduos sólidos e industriais oriundos das bacias de drenagem são a maior fonte de poluição do RPS (INEA, 2011; SOUZA *et al.*, 2010). O RPS atravessa importantes polos

industriais do eixo Rio-São Paulo, o Paraíba do Sul apresenta um evidente comprometimento em alguns de seus trechos. A maior concentração industrial encontra-se localizada entre os municípios de Resende e Volta Redonda (RJ), destacando-se indústrias químicas, siderúrgicas e alimentícias. Também trechos da bacia localizados em Minas Gerais e São Paulo, como as regiões de Juiz de Fora, Jacareí e Taubaté, respectivamente, estão entre aqueles de maior criticidade, principalmente quanto ao nível de recebimento de despejos de origem industrial. Além do evidente agravamento decorrente da expansão industrial em áreas já comprometidas, a expansão demográfica a ela associada, resulta num aumento dos problemas relacionados com os esgotos domésticos. Segundo dados da FEEMA, o rio Paraíba do Sul, somente no Estado do Rio de Janeiro, recebe os lançamentos de esgotos de uma população estimada em cerca de 1,5 milhões de habitantes (1980), sem qualquer tipo de tratamento. Os metais oriundos dos despejos industriais e demais fontes antropogênicas, contaminam todos os compartimentos do RPS, sejam abióticos (SALOMÃO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002) ou bióticos (CAMPANELI *et al.*, 2010).

O local de coleta das plantas de aguapé foi na porção inferior do Rio Paraíba do Sul (baixo RPS) na região central do município de Campos dos Goytacazes, situado no norte do Rio de Janeiro (S: 21°76'03", W: 41°28'15").

#### **4.2.2. Rio Muriaé**

O Rio Muriaé surge da confluência dos ribeirões Samambaia e Bonsucesso, no Município de Miraflores do Sul-MG. Possui cerca de 250 km de extensão e uma área de drenagem de 7.980km<sup>2</sup>. É um afluente da margem esquerda do Rio Paraíba do Sul. Sua bacia hidrográfica é interestadual, e está localizada em parte dos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. A atividade econômica desta região é baseada na pesca, pecuária, lavoura de arroz e cana-de-açúcar. A qualidade da água deste rio vem sendo comprometida pela ausência de tratamento prévio de esgotos domésticos, além dos efluentes provenientes das atividades agrícolas e industriais, lançados *in natura* nos cursos d'água e também acidentes ambientais como, um vazamento da lama resultante do tratamento da bauxita.

A coleta foi realizada no município de Cardoso Moreira, localizado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro (S: 21°49'00°, W: 41°63'26°).

#### 4.2.3. Rio Pomba

O Rio Pomba tem sua nascente nas proximidades de Barbacena, MG, na Serra da Mantiqueira, em trecho denominado Serra da Conceição, a 1.100 m de altitude, percorrendo aproximadamente 290 km no sentido sudeste até sua afluição no Rio Paraíba do Sul. Recebe vários afluentes ao longo do percurso. A sub-bacia do Rio Pomba drena uma área de 8.700 km<sup>2</sup> e abrange cidades de Minas Gerais e Rio de Janeiro, entre as quais se destacam no território mineiro Leopoldina, Cataguases e Ubá. O rio Pomba tem sido destino de graves impactos ambientais devido à extração de rochas ornamentais e também pela influência de um importante pólo industrial nas áreas têxtil, de papel e celulose, química e mecânica no processamento de bauxita. Destacam-se, ainda, indústrias de móveis e alimentos (CARVALHO *et al.*, 2002). O local de coleta foi no município de Santo Antônio de Pádua, situado ao noroeste do Estado do Rio de Janeiro (S: 21°53'63°, W: 42°15'55°).

**Tabela 1.** Valores de concentrações em mg. L<sup>-1</sup> de metais presente em águas dos rios Paraíba do Sul, Muriaé e Pomba.

Locais	Al	Cr	Mn	Fe	Cd	Ni	Pb	Cu	Referência
RPS	0,32	0,22	0,029	0,64	0,0012	0,064	0,021	NI	Primo, 2006
Muriaé	NI	0,09	NI	0,5	NI	NI	NI	0,01	INEA
POMBA	NI	0,03	NI	NI	NI	NI	NI	0,01	Carvalho <i>et al.</i> , 2009

\*NI indica dado não investigado.

#### 4.3. Experimento e número amostral

Indivíduos de *E. crassipes* foram coletados em julho de 2013 nos rios supracitados com auxílio de barco ou canoa. As plantas foram coletadas manualmente e acondicionadas em caixas plásticas com água do próprio rio ainda na embarcação e, posteriormente levadas ao Laboratório

de Ciências Ambientais (UENF) onde foram lavadas sob água corrente para retirada de material aderido. Posteriormente, as plantas foram encaminhadas para a casa de vegetação do campus Leonel Brizola da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) onde as plantas foram acondicionadas coletivamente em caixas plásticas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) e aeração artificial por 7 dias em casa de vegetação para aclimação (Figura 2).

Após a aclimação, seis indivíduos de *E. crassipes* foram acondicionados individualmente em recipientes plásticos (unidade experimental) com seis litros de solução nutritiva e em cada unidade experimental foram adicionadas soluções contendo 0 ou 1 mM de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ( $\text{Cr}^{+3}$ ). Durante os tempos de experimento (0, 4 e 8 dias) foram monitorados parâmetros físico-químicos da água e se mantiveram estáveis, fluorescência da clorofila *a*, além de retiradas amostras para microscopia e pigmentos fotossintéticos.

Seis réplicas foram utilizadas para cada tempo e tratamento ( $n=6$ ) com o total de 36 plantas para cada rio supracitado e 108 plantas para todo o experimento.

Para as análises de microscopia foram retirados seis discos foliares (1 de cada unidade experimental) e seis fragmentos radiculares de cada tratamento ( $n=6$ ). Para avaliação dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, duas folhas de cada indivíduo foram utilizadas, sendo seis indivíduos por tratamento no total de 12 repetições ( $n=6$ ). Para a determinação de valores de pigmentos fotossintéticos dois discos foram retirados independentemente de cada indivíduo, sendo seis indivíduos ( $n=6$ ), no total de 12 repetições.

Em colaboração com a doutoranda Maria Angélica da Conceição Gomes foram conduzidas análises de trocas gasosas ( $n=6$ ) e quantificação de Cr nos órgãos (folhas e raízes) das plantas (Anexos 1 e 2).





**Figura 3.** Acclimação dos indivíduos de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms a casa de vegetação (A) Experimentos em casa de vegetação com *Eichhornia crassipes* submetida a 1mM de  $\text{Cr}^{+3}$ (B, C e D), retirada de amostras para microscopia e quantificação de metais (E).

#### 4.4. Fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas entre 12:00 h – 13:00 h utilizando-se um fluorímetro modulado portátil (FMS2 da Hansatech, UK). Após 30 minutos de adaptação ao escuro (com auxílio de pinças) folhas fotossinteticamente ativas (intactas e completamente expandidas) foram posteriormente expostas a luz vermelha modulada de baixa intensidade (aproximadamente  $6 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  no comprimento de 660 nm) seguida de pulso de 0,8 segundos de luz actínica saturante ( $10\text{-}000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) adaptado de Genty et al. (1989) e Van Kooten e Snel (1990). Os seguintes parâmetros da emissão de fluorescência foram registrados e submetidos à análise: F0 (fluorescência mínima), Fm (fluorescência máxima), Fv (fluorescência variável), Fv/Fm (rendimento quântico potencial do fotossistema II), qP (dissipação fotoquímica), qNP (dissipação não-fotoquímica) e NPQ (dissipação não-fotoquímica).

#### 4.5. Pigmentos Fotossintéticos

No terço médio das mesmas folhas utilizadas para análises de fluorescência da clorofila *a* foram retirados dois discos ( $8 \text{ mm}^2$  de área total) para determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos, utilizando 5 mL de solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO) como proposto por Welburn, (1994). As amostras foram transportadas em caixas abrigados da luz, para o Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) e após 5 dias armazenadas no escuro, uma alíquota de 1,0 mL do DMSO foi submetida a leitura em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu modelo UV-1800), nos comprimentos de onda de 480 (carotenoides), 649 (clorofila *a*) e 665 (clorofila *b*) nm (WELLBURN, 1994). Os valores obtidos nas leituras foram utilizados para a determinação do teor dos pigmentos. Todo o procedimento em espectrofotômetro foi realizado em ambiente com baixa luminosidade. Os valores são expressos em  $\text{nmol/ cm}^2$ . Para a determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos segundo Wellburn (1994) foram utilizados seguintes fórmulas:

$$[\text{Clorofila } a] (\mu\text{g} / \text{mL}) = 12,19A665 - 3,45A649$$

$$[\text{Clorofila } b] (\mu\text{g} / \text{mL}) = 21,99A649 - 5,32A665$$

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

Onde A = absorvância

#### **4.6. Preparo de amostra para Microscopia**

##### **4.6.1. Fixação**

Fragmentos do terço mediano da folha e zona de absorção da raiz foram coletadas e pré-fixadas em temperatura ambiente, em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2.

##### **4.6.2. Pós-fixação e desidratação da lâmina foliar**

Os materiais foram levados ao laboratório (LBCT) onde as amostras foram lavadas três vezes no mesmo tampão utilizado na fixação e o material foi pós-fixado por 1 h em uma solução de tetróxido de ósmio 1 % com tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após três lavagens de 45 min no mesmo tampão foi realizado a série crescente de desidratação com acetona: 50 %, 70 %, 90 %, 100 % e duas vezes em acetona super seca 100 %, por 1 h cada etapa (Da Cunha *et al.*, 2000).

##### **4.6.3. Infiltração e Inclusão da lâmina foliar**

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

##### **4.6.4. Fixação e desidratação da zona de absorção da raiz**

Os materiais foram levados ao laboratório (LBCT) onde as amostras foram submetidas a processos de lavagem três vezes no tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura

ambiente com intervalos de 45 minutos. Em seguida, foi realizada série crescente de desidratação com álcool: 50 %, 70 %, 90 %, 100 % e mais duas vezes com álcool 100%, por uma hora de intervalo.

#### **4.6.5. Infiltração e Inclusão da zona de absorção da raiz**

Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à etapa de infiltração na qual o álcool é substituído gradualmente por resina hidrofílica Historesina®) para obtenção dos blocos (BOZZOLA & RUSSEL, 1992).

#### **4.6.6. Microscopia Óptica**

Secções transversais de aproximadamente 1 µm com um ultramicrotomo (Reichert Ultracut S) foram retiradas da região de emissões de raízes laterais e região da coifa em microtomo rotativo com faca de tungstênio. Em ambos os casos as secções foram coradas com azul de toluidina 1,0 % por 1 minuto. As lâminas foram seladas com Entelan® e observadas em microscopia de campo claro, acoplado a câmera (Axioplan ZEISS).

#### **4.6.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Após a infiltração e inclusão do material descritas anteriormente, foram retirados cortes ultrafinos (70 – 90nm) em ultramicrotomo Reichert, com auxílio de faca de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. A contrastação de rotina foi realizada com acetato de uranila 5,0 % por 20 minutos e solução de citrato de chumbo por 5 minutos em temperatura ambiente. O material foi observado acoplado a câmera e com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão ZEISS – TEM 900, a uma aceleração de voltagem de 80 KV.



#### **4.6.8. Histoquímica**

Cortes histológicos foram feitos na zona de absorção das raízes à mão livre com auxílio de lâminas. Os cortes foram submetidos aos testes Histoquímicos com Sudam IV para detecção de compostos lipídicos e foi realizada a coloração com Cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

#### **4.7. Análises estatísticas**

Para a comparação dos dados ecofisiológicos (fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos) foi realizado uma análise multivariada (MANOVA) no programa Statistica (Stasoft).

## 5. Resultados

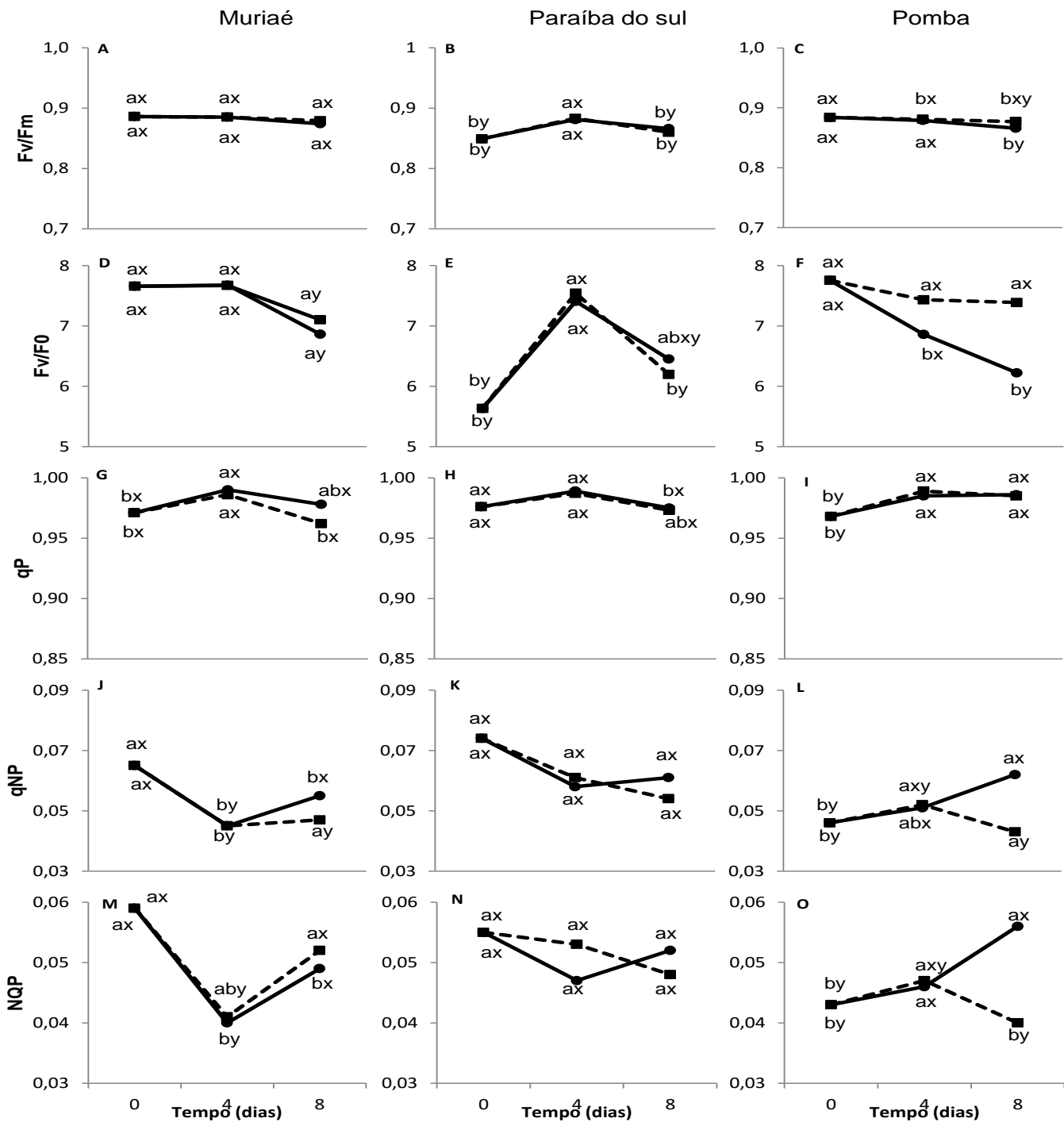
### 5.1. Fluorescência da clorofila *a*

A Figura 4 e o Apêndice 1 apresentam os dados dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de *E. crassipes* coletadas nos rios Muriaé, Paraíba do sul e Pomba, expostas a uma concentração de 1mM de Cr<sup>+3</sup> durante os períodos de 0, 4 e 8 dias de exposição. Os valores de Fv/Fm ( Figura 4A, 4B e 4C) se mantiveram estáveis ao longo do experimento. Entretanto, os valores de Fv/F0 (Figura 4D, 4E e 4F) após 8 dias mostraram-se menores para todos os rios. Nas plantas do rio Paraíba do Sul, Fv/F0 apresentou valor máximo no 4° dia, nas plantas do rio Muriaé o tempo zero e o 4° dia de exposição não apresentaram diferenças e nas plantas do rio Pomba o controle apresentou quedas dos valores Fv/F0 ao longo do experimento.

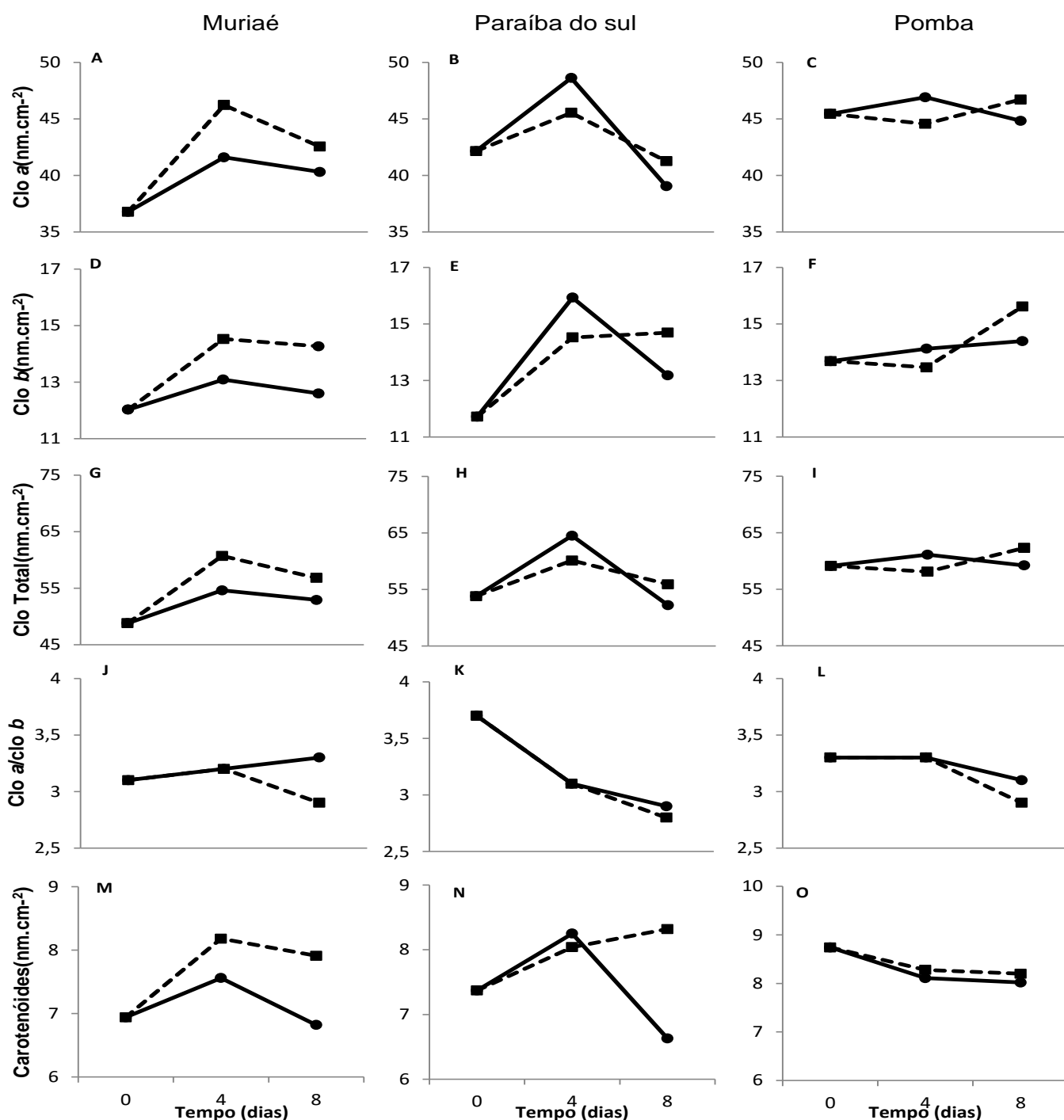
Os valores de Qp (Figura 4G, 4H e 4I) se apresentaram estáveis durante todo experimento, sem diferenças significativas. Os indivíduos expostos a Cr apresentaram uma tendência a redução dos valores de Qnp (Figura 4J, 4K e 4L) e NQP (Figura 4M, 4N e 4O). Nas plantas do rio Muriaé, os valores de qNP e NQP apresentaram aumento no 8° dia de exposição a Cr.

### 5.2. Pigmentos fotossintéticos

A Figura 5 e o Apêndice 2 apresentam os dados dos pigmentos fotossintéticos de *E. crassipes* coletadas nos rios Muriaé, Paraíba do sul e Pomba, expostas a uma concentração de 1mM de Cr<sup>+3</sup> durante 4 e 8 dias. Não foi observada diferença significativa entre os pigmentos fotossintéticos nos tratamentos nos três rios (figura 5) durante 4 e 8 dias. Houve apenas uma exceção, os indivíduos provenientes do rio Muriaé apresentaram maiores valores nos parâmetros clorofila *a* e clorofila *b* e carotenoides após exposição de 4 dias a 1 mM Cr<sup>+3</sup>. Não foi encontrada diferença significativa na comparação entre os três rios.



**Figura 4.** Parâmetros de Fluorescência da clorofila *a*: Fv/Fm = rendimento quântico potencial do FSII (A, B e C) Fv/Fo = eficiência da capacidade fotossintética (D, E e F) qP = quenching fotoquímico (G, H e I); qNP (J, K e L) e NPQ (M, N e O) = dissipação não-fotoquímica em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Muriaé, Paraíba do Sul (RPS) e Pomba exposto a 1 mM Cr<sup>+3</sup> por 0, 4 e 8 dias. Linhas cheias representam as plantas controle e as linhas pontilhadas as plantas expostas a 1mM Cr<sup>+3</sup>. Letras a e b diferença entre os rios. Letras x e y diferença entre os tempos. Ausência de letras = ausência de diferenças estatísticas (p<0,05).



**Figura 5.** Pigmentos Fotossintéticos ( $\text{nm.cm}^{-2}$ ): clorofila a (A, B e C) clorofila b (D, e E F), clorofila total (G, H e I) clorofila a/clorofila b (J, K e L) e carotenóides (M, N e O) determinados em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Muriaé, Paraíba do Sul (RPS), e Pomba, exposta a  $1 \text{ mM Cr}^{+3}$  por 0, 4 e 8 dias. Linhas cheias representam as plantas controle e as linhas pontilhadas as plantas expostas a  $1 \text{ mM Cr}^{+3}$ . Não houve diferença significativa entre tratamentos, rios e tempos ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Histoquímica

A tabela 1 apresenta resultados dos testes histoquímicos da região de absorção de raízes de *E. crassipes* coletadas nos rios Muriaé, Paraíba do sul e Pomba, expostas a uma concentração de 1mM de Cr<sup>+3</sup> durante 4 e 8 dias de exposição. Através do uso do reagente Cloreto férrico foi evidente a predominância de compostos fenólicos na região do córtex nos indivíduos de *E. crassipes* dos 3 rios submetidos a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> por 4 e 8 dias (tabela 1). O reagente Sudan IV indicou a presença compostos lipídicos em *E. crassipes* quando expostas a 4 e 8 dias a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> nos três rios em estudo. Entretanto, plantas do rio Pomba já apresentaram lipídeos antes da exposição a Cr na região do córtex.

**Tabela 2.** Teste histoquímicos realizados na zona de absorção das raízes *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Pomba, Muriaé e Paraíba do Sul (RPS), exposto a 1 mM Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias.

Teste Histoquímico				
Rios	Tratamentos	Dias	Compostos Fenólicos	Lipídeos
MURIAÉ	Controle	0	+	-
	1mM Cr <sup>+3</sup>	4	+	+
	1mM Cr <sup>+3</sup>	8	+	+
POMBA	Controle	0	+	+
	1mM Cr <sup>+3</sup>	4	+	+
	1mM Cr <sup>+3</sup>	8	+	+
RPS	Controle	0	+	-
	1mM Cr <sup>+3</sup>	4	+	+
	1mM Cr <sup>+3</sup>	8	+	+

#### 5.4. Comparação anatômica das raízes

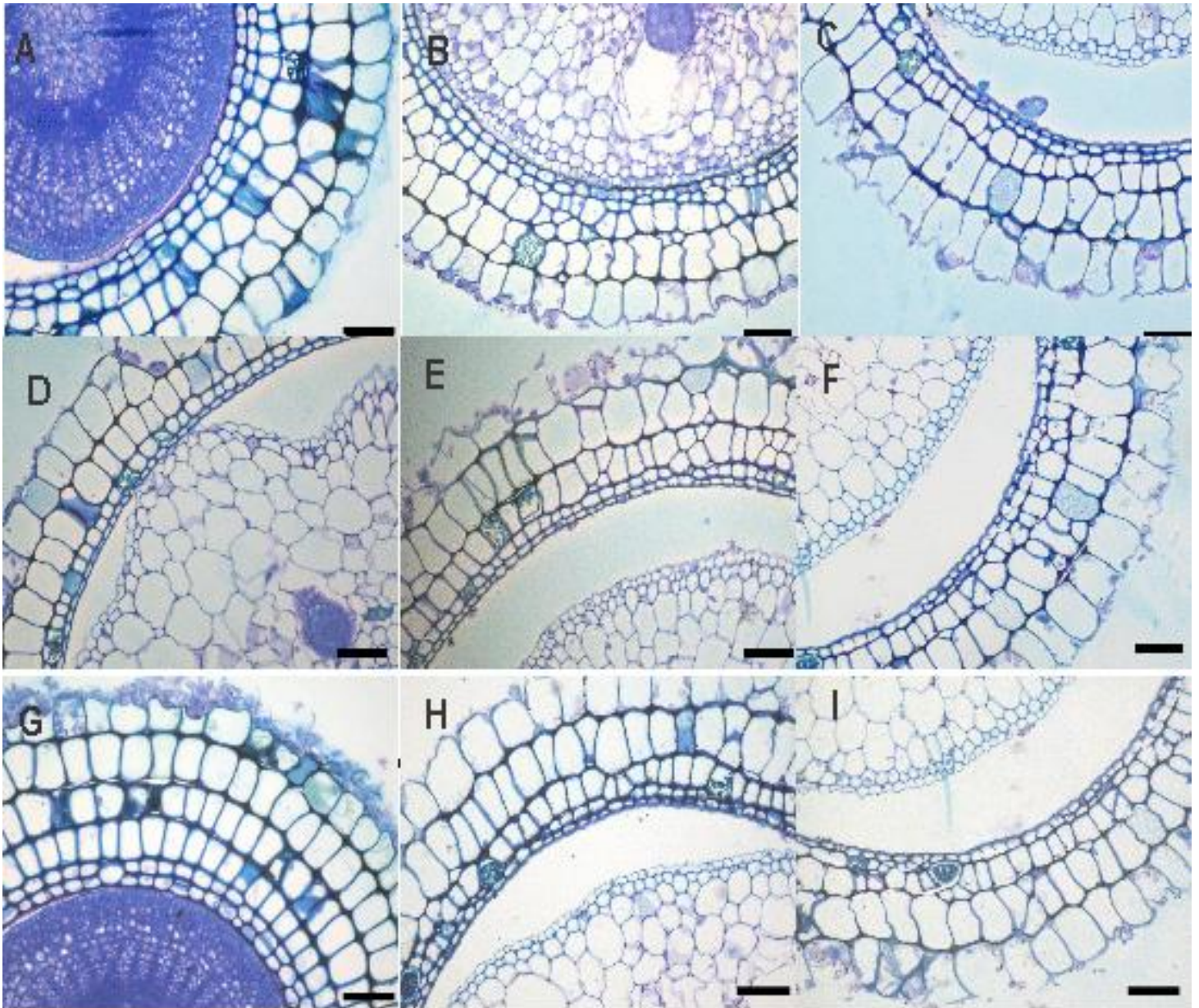
As figuras 6,7 e 8 apresentam comparações de indivíduos de *E. crassipes* oriundos respectivamente dos rios Muriaé, RPS e Pomba expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 e 8 dias em casa de vegetação. Indivíduos de *E. crassipes* oriundos dos três diferentes rios, apresentaram diferença nas respostas anatômicas com aumento do tempo de exposição ao metal. Entretanto não foi observado diferença nas respostas anatômicas quanto aos locais de origem. O local de origem não interferiu nas respostas anatômicas.

Seções transversais da região das coifas dos indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  (Figura 6B, 6C, 6E, 6F, 6H e 6I) apresentaram idioblastos e células desorganizadas em comparação aos indivíduos controles (Figuras 6A, 6D e 6G ).

Seções transversais de zonas de absorção de indivíduos controle de *E. crassipes* ( Figuras 7A, 7D e 7G) apresentam epiderme unisseriada, córtex parenquimático constituído de aerênquima, delimitado pela endoderme e exoderme, ao centro está o cilindro vascular, com polos de protoxilema e presença de idioblastos.

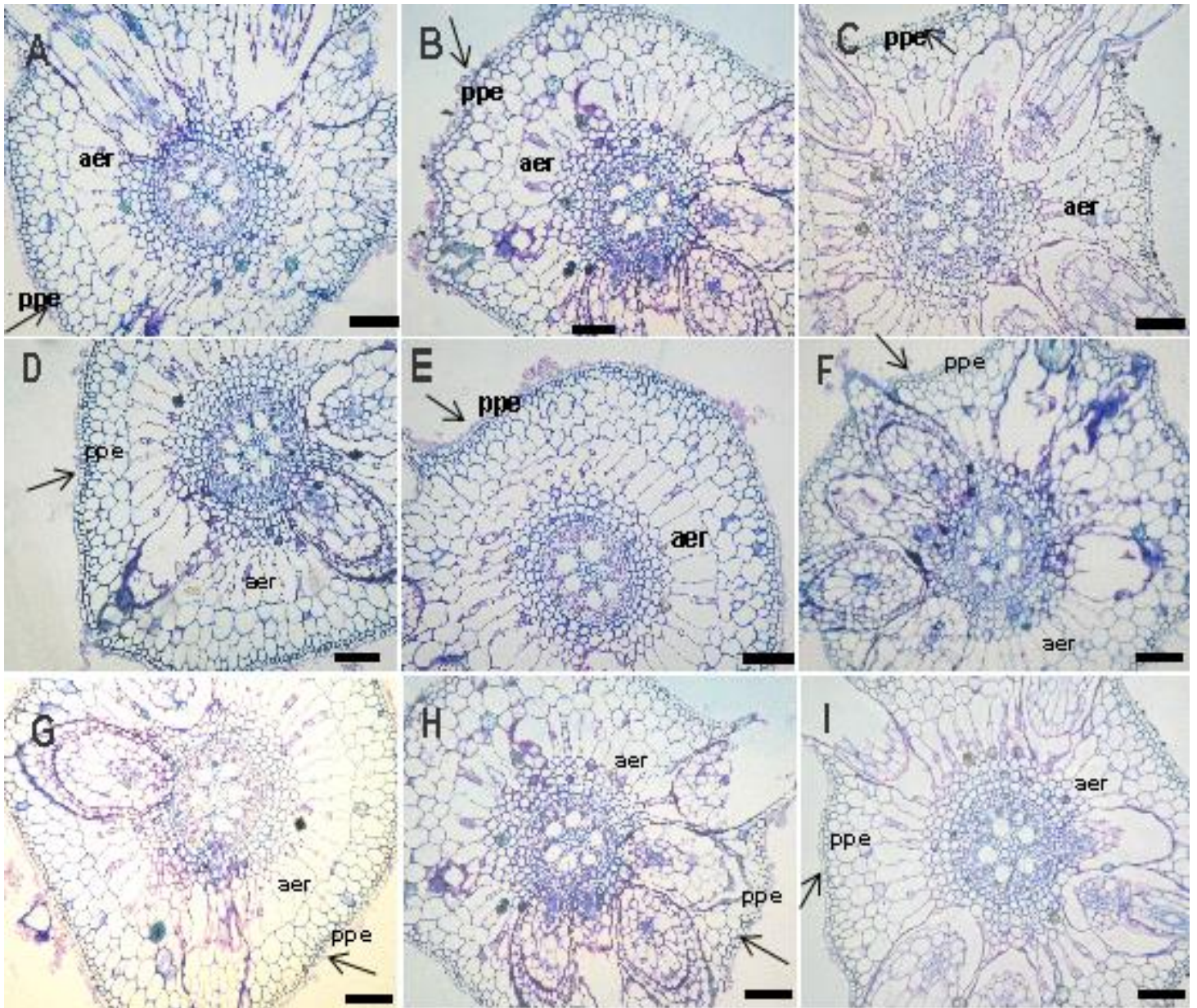
As figuras 7B, 7E, 7H, 8B, 8E e 8H apresentam indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias, sendo observado pequeno aumento no turgor celular em diferentes tecidos, promovendo variações na parede periclinal externa de planas, côncavas a convexas, aumento dos espaços intercelulares nas camadas mais internas do córtex e espessamento da exoderme em comparação com indivíduos do tratamento controle. Os indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 8 dias apresentaram o turgor celular máximo (Figuras 7C, 7F, 7I, 8C, 8F e 8I). No oitavo dia, a epiderme apresentou parede periclinal externa acentuadamente convexa; células do córtex das camadas mais externas com formas mais regulares e isodiamétricas; aerênquima com paredes mais planas e organizadas; maiores espaços intercelulares nas camadas mais interna do córtex; endoderme mais túrgida. Também foram observadas mais emissões de raízes laterais assim como maior número de idioblastos no cilindro vascular em comparação com controle e indivíduos expostos a Cr por 4 dias e também foi observado paredes menos espessas na exoderme dos indivíduos expostos 8 dias ao  $\text{Cr}^{+3}$  (Figuras 8C, 8F e 8I). Foi observado presença de compostos

fenólicos tanto em indivíduos controle quanto em indivíduos expostos a Cr (Tabela 1). Indivíduos controle de *E. crassipes* não apresentaram compostos lipídicos, entretanto indivíduos expostos a Cr apresentaram tais compostos.



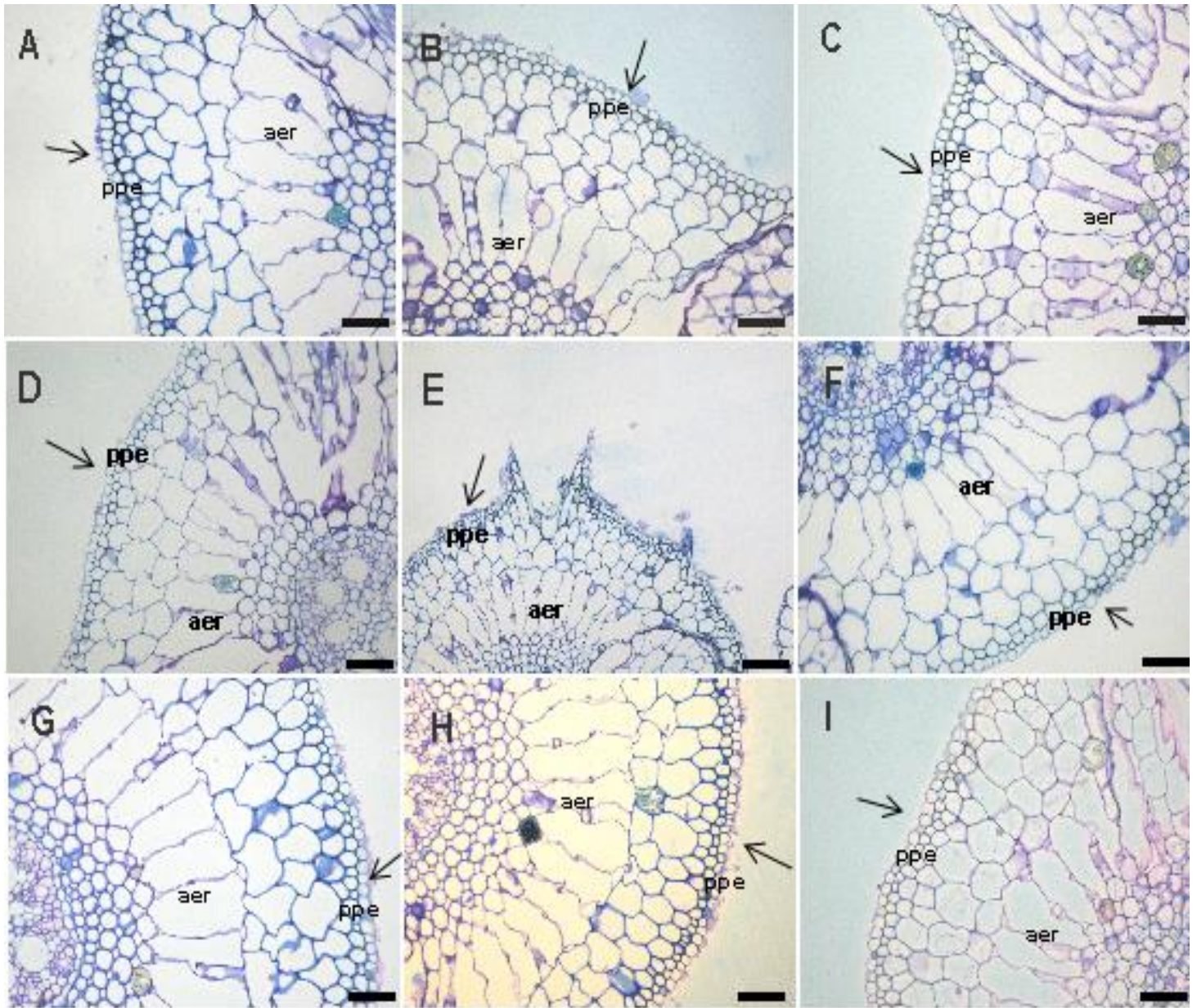
**Figura 6.** Seções transversais de região da coifa de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Muriaé.; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Pomba ; G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul Barras Horizontais 50  $\mu\text{m}$ ..





**Figura 7.** Seções transversais da região com emissão de raízes laterais de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $Cr^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Muriaé; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $Cr^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Pomba G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $Cr^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul. Barras Horizontais 50µm. Arênquima (aer), Parede periclinal externa (ppe).





**Figura 8.** Seções transversais da região da epiderme e córtex de *E. crassipes*. A, B e C – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Muriaé; D, E e F – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Pomba G, H e I – indivíduos controle, 4 e 8 dias expostos a  $\text{Cr}^{+3}$  respectivamente, provenientes do rio Paraíba do Sul. Barras Horizontais 100  $\mu\text{m}$ . Arênquima (aer), Parede periclinal externa (ppe).

**Tabela 3.** Descrição das alterações anatômicas da raiz através da Microscopia Óptica de indivíduos de *E. crassipes* oriundos dos rios Muriaé, Pomba e Paraíba do Sul expostos a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> por 4 e 8 dias.

Tratamentos	Rios		
	Muriaé	Pomba	RPS
Controle	Epiderme unisseriada; presença do aerênquima; presença de idioblastos.	Epiderme unisseriada; presença do aerênquima; presença de idioblastos.	Epiderme unisseriada; presença do aerênquima; presença de idioblastos.
1mM de Cr <sup>+3</sup> ( 4 dias)	Aumento no turgor celular; variações na parede periclinal externa; espessamento da exoderme; aumento do número de idioblastos.	Aumento no turgor celular; variações na parede periclinal externa; espessamento da exoderme; aumento do número de idioblastos.	Aumento no turgor celular; variações na parede periclinal externa; espessamento da exoderme; aumento do número de idioblastos.
1mM de Cr <sup>+3</sup> ( 8 dias)	Aumento pronunciado do turgor celular; parede periclinal externa acentuadamente convexa; aerênquima com paredes mais planas e organizadas; endoderme mais túrgida; aumento da emissões de raízes laterais; maior número de idioblastos; redução da exoderme.	Aumento pronunciado do turgor celular; parede periclinal externa acentuadamente convexa; aerênquima com paredes mais planas e organizadas; endoderme mais túrgida; aumento da emissões de raízes laterais; maior número de idioblastos; redução da exoderme.	Aumento pronunciado do turgor celular; parede periclinal externa acentuadamente convexa; aerênquima com paredes mais planas e organizadas; endoderme mais túrgida; aumento da emissões de raízes laterais; maior número de idioblastos; redução da exoderme.

### 5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da folha

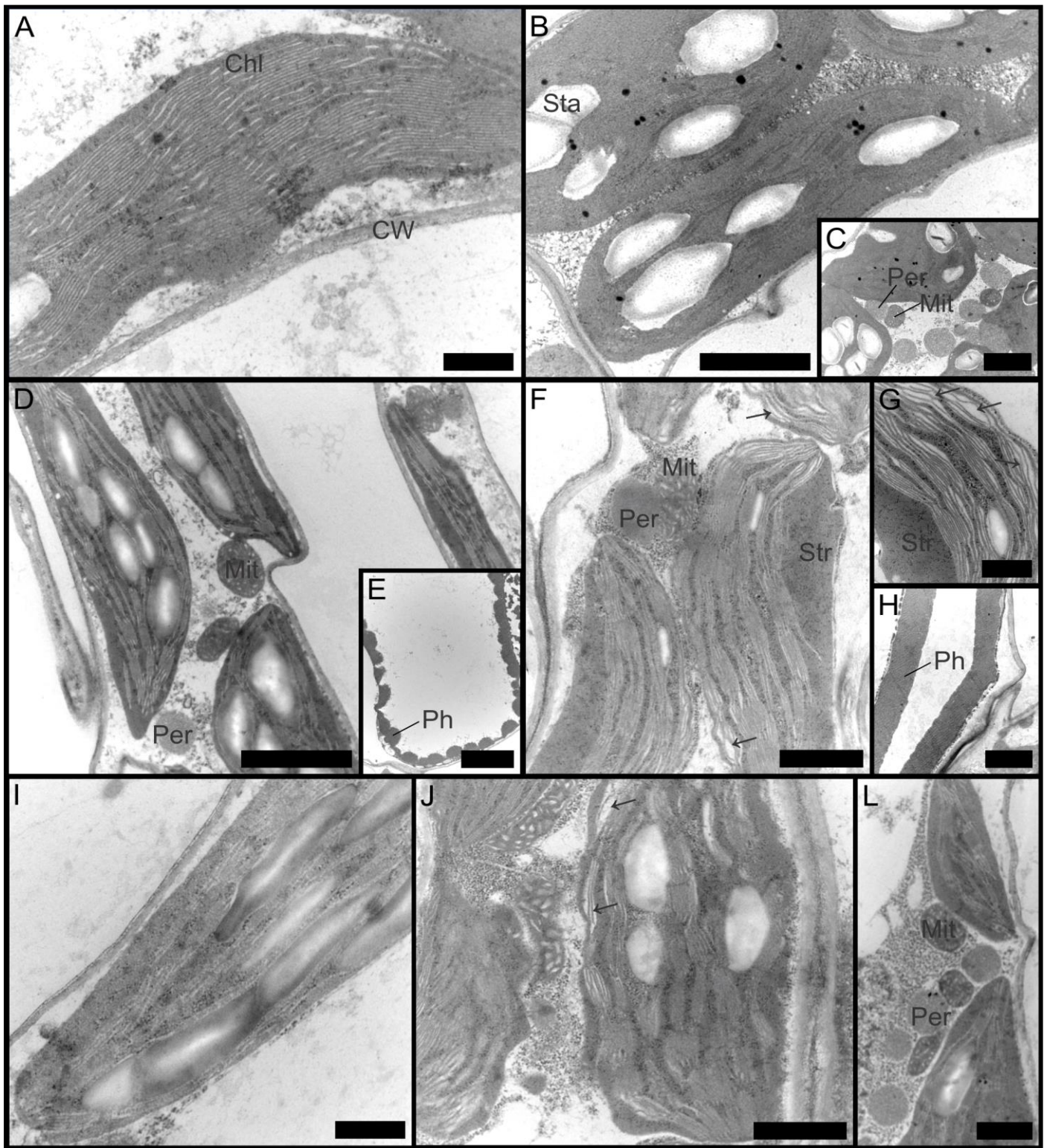
A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada apenas em indivíduos de *E. crassipes* controle e indivíduos expostos a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> por 4 dias oriundos dos rios Muriaé, Pomba e RPS, para verificação das alterações ultraestruturais dos cloroplastos que possibilitaram um aumento da assimilação de carbono neste tempo de exposição ao Cr. A figura 9 e tabela 2 apresenta a MET das células do parênquima paliádico da lâmina foliar com foco sobre a estrutura do cloroplasto dos indivíduos oriundos dos 3 rios supracitados. Os cloroplastos dos indivíduos controle exibiram uma estrutura típica com presença de tilacóides organizados em membranas tilacoidais e estroma.

Grãos de amido foram observados na maioria dos indivíduos (Figura 9). Indivíduos do tratamento com Cr provenientes do Rio Muriaé apresentaram ligeiro aumento do estroma, presença de grãos de amido e aumento do número de plastoglóbulos (Figura 9B), reduzida

formação de grana e presença acentuada de peroxissomos e mitocôndrias próximos ao cloroplasto em comparação aos indivíduos controle. Os cloroplastos de indivíduos de *E. crassipes* expostos a Cr oriundos do rio Pomba, apresentaram um aumento no volume do estroma, lamelas com integridade prejudicada com desorganização dos tilacóides e diminuição do empilhamento dos tilacóides em comparação com indivíduos controle. Nestes indivíduos foi evidenciado maior desorganização entre os tilacóides em relação aos indivíduos dos demais rios. Também se observou a presença de compostos fenólicos no vacúolo, na região limítrofe subjacente ao tonoplasto das células paliçádicas do tratamento com Cr.

Em indivíduos de *E. crassipes* provenientes do rio Paraíba do Sul quando submetidos a Cr foi possível notar abundante presença de grãos de amido, presença acentuada de peroxissomos e mitocôndrias próximos ao cloroplasto quando comparados aos indivíduos controle oriundos do rio Paraíba do Sul.





**Figura 9.** Microscopia Eletrônica de Transmissão de limbo foliar de *E. crassipes* oriundos dos rios Muriaé indivíduos controle (A) e indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (B e C), rio Pomba indivíduos controle (D e E) e indivíduos expostos 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (F, G e H) e rio Paraíba do Sul controle (I) e indivíduos expostos 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (J e L). Foi evidenciado mitocôndria (Mit), cloroplasto (Chl), estroma (Str) peroxissomos (Per), parede celular (CW) grãos de amido (Sta), compostos fenólicos (Ph) e desorganização dos tilacóides (setas).),

**Tabela 4.** Descrição das alterações ultraestruturais do limbo foliar através da Microscopia Eletrônica de Transmissão de indivíduos de *E. crassipes* oriundos dos rios Muriaé, Pomba e Paraíba do Sul expostos a 1 mM de Cr<sup>+3</sup> por 4 dias.

Tratamento	Rios		
	Muriaé	Pomba	RPS
Controle	Presença de pilhas de tilacóides, grãos de amido e plastoglóbulos.	Presença de pilhas de tilacóides, grãos de amido, plastoglóbulos e compostos fenólicos.	Presença de pilhas de tilacóides, grãos de amido e plastoglóbulos.
1mM de Cr <sup>+3</sup> (4 dias)	Aumento do volume do estroma, dos grãos de amido, dos plastoglóbulos e do número de mitocôndrias e peroxissomos; redução das pilhas de tilacóides.	Aumento pronunciado do volume estroma; aumento de plastoglóbulos, compostos fenólicos e do número de mitocôndrias e peroxissomos; redução das pilhas dos tilacóides.	Aumento do volume do estroma, dos grãos de amido, dos plastoglóbulos e do número de mitocôndrias e peroxissomos; redução das pilhas de tilacóides.

## 6. Discussão

A presença de metais tóxicos em plantas pode induzir redução do rendimento quântico da fotossíntese, diminuindo a assimilação de CO<sub>2</sub> e comprometendo o metabolismo da planta (ELFADL & LUUKKANEN, 2006). A espécie *E. crassipes* tem sido objeto de estudo sobre acúmulo de metais e tem demonstrado que, em ambientes com grandes quantidades de metais, é capaz de absorvê-los da água sem apresentar sinais de intoxicação (DELGADO *et al.*, 1994; DING *et al.*, 1994).

A redução nos valores da concentração das clorofilas *a* e *b*, e carotenóides, é bem estabelecida em plantas sob estresse induzido por Cr (MCGRATH, 1982; TRIPATI & SMITH, 2000; VAJPAYEE *et al.*, 2000; PANDA, 2000; PANDA & CHOUDHURY, 2005). Em estudo com outra espécie vegetal (*Ocimum tenuiflorum*), foi observado que teores de clorofila total, clorofila *a*, *b* e carotenóides reduzidos quando expostas ao Cr (RAI *et al.*, 2004), com concentração inferior a deste estudo (10, 20, 50, 100µM). Estudo com *Salvinia minima* exposta a 1 e 2 mg/L de Cr, mostrou que esta espécie apresenta redução significativa nas concentrações de clorofilas *a* e *b* e razão clorofila *a* / *b* (NICHOLS *et al.*, 2000) em função da presença de Cr. Entretanto, algumas plantas aquáticas apresentam aumento no conteúdo de carotenóides quando expostas ao tratamento com Cr (TRIPATI & SMITH, 2000; VAJPAYEE *et al.*, 2001). Provavelmente isto é devido a ação antioxidante dos carotenóides, visando combater as espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas como resultado da toxicidade por Cr (PANDA e CHOUDHURY, 2005). Neste estudo, *E. crassipes* submetida a 1 mM Cr<sup>+3</sup> não apresentou redução do conteúdo de clorofilas ou aumento dos carotenoides como forma de proteção a toxicidade por Cr, sugerindo que a produção de Espécies reativas de Oxigênio não foi suficiente para alterar a composição dos pigmentos. Quando há alterações causadas por metais no teor de pigmentos totais, isso afeta diretamente a atividade fotoquímica por meio de redução ou inibição da absorção de luz e conseqüentemente transferência da energia radiante para os centros de reação, impedindo a conversão da energia luminosa em energia química. Já foi proposto que a toxicidade a Cr reduz o tamanho da parte

periférica do complexo antena, devido à desestabilização e degradação das proteínas desta porção periférica (SHANKER, 2005).

Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* ajudam a caracterizar o aparelho fotossintético frente a exposição a Cr. Os valores obtidos de Fv/Fm no presente estudo se encontram na faixa de referência pré-estabelecida (0,75-0,85), em que as plantas são consideradas saudáveis e sob condições normais de funcionamento (BUTLER & KITAJIMA, 1975), sugerindo que o rendimento quântico do PSII não foi alterado pela presença do metal no período de tempo estudado. Em estudo realizado com plantas de *Lolium perenne* cultivadas com Cr<sup>+6</sup>, a razão Fv/Fm não foi afetada na presença de 50 a 100 µM, mas quando expostas a 250 e 500 µM após 45 dias de experimento, houve um decréscimo (VERNAY et al., 2007). Na comparação entre Vernay et al. 2007 e os dados deste trabalho, podemos nos ater a diferença das espécies e ao tempo de exposição ao metal. No presente estudo, o tempo foi de até 8 dias, em estudo de Vernay et al. 2007, o tempo de exposição foi de 45 dias e em menores concentrações, obtendo sintomas de estresse para *L. perenne*. Sugerindo que após maior tempo de exposição o rendimento quântico da fluorescência sofre danos. O parâmetro Fv/F0 representa o rendimento quântico variável do PSII, sendo considerado bom indicador das razões de conversão quântica fotossintética, (VERNAY et al., 2007). Em plantas saudáveis os valores de Fv/F0 podem variar de 4 a 6 (ROHÁČEK, (2002). Os valores obtidos no presente estudo estão nesta faixa obtidas para plantas saudáveis, significando que não houve alteração na conversão quântica fotossintética de *Eichhornia crassipes* exposta a 1 mM de Cr<sup>+3</sup>. Quando há influência do metal no metabolismo fotossintético vegetal, a planta recorre a mecanismos para dissipar o excesso de energia luminosa absorvida para evitar danos no aparelho fotossintético, o que levaria um aumento do qNP ou NQP, através da transdução de energia luminosa em energia térmica, liberando calor (TAIZ e ZEIGER, 1998). A fluorescência dos *quenchings* não-fotoquímicos (qNP e NQP) em geral neste estudo não apresentaram alterações significativas, não houve incrementos nos valores dos conteúdos de qNP e NQP, indicando que não houve uma condição estressante para *Eichhornia crassipes*



submetidas a 1mM de  $\text{Cr}^{+3}$ . Inclusive nossos dados de trocas gasosas (Figura 10, Anexo 1) mostram aumento da assimilação de Carbono quando *E. crassipes* é exposta a Cr.

Diversos estudos, inclusive este, (Tabela 3, Anexo 2) com a espécie vegetal em questão observaram que há tendência de acúmulo dos metais nas raízes, podendo esta ser considerada uma estratégia para minimizar os danos no metabolismo das plantas causados por elementos metálicos (VITÓRIA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002; SKREBSKY *et al.* 2008) como, alteração fotossintética, e da síntese de pigmentos fotossintéticos. Em diversas espécies vegetais também tem sido observado um acúmulo preferencial de Cr em raízes do que nas folhas e outros tecidos vegetais da parte aérea (ZAYED *et al.*, 1998; SRIVASTAVA *et al.*, 1999; ODJEGBA & FASIDI, 2007; PAIVA *et al.*, 2009). Este acúmulo preferencial nas raízes pode ser explicado por uma localização espacial em um compartimento subcelular específico, como o vacúolo das células parenquimáticas das raízes (MANGABEIRA *et al.*, 2006). A compartimentalização vacuolar pode prevenir a livre circulação destes elementos no citosol, diminuindo assim seus efeitos citotóxicos na planta (SRIVASTAVA *et al.* 1999).

Em estudos com outras espécies é mostrado que o Cr é quelado por ácidos orgânicos, transportados e estocados em vacúolos e/ou em pequenas vesículas nas células vegetais (SRIVASTAVA *et al.*, 1999; LIU & KOTTKE, 2003; MANGABEIRA *et al.*, 2006). Esta compartimentalização espacial do Cr sugere a formação de vesículas especializadas nas células radiculares desta espécie, mantendo este elemento nas raízes e restringindo a sua translocação para a parte aérea evitando danos fisiológicos e fotossintéticos. Em resposta ao estresse causado por metais, as células vegetais podem responder com vários mecanismos de defesa, incluindo a quelação, imobilização, exclusão e compartimentalização no córtex radicular (HALL, 2002).

Outros processos ecofisiológicos, alterações bioquímicas, moleculares e anatômicas, também podem ser considerados mecanismos de defesa, o que capacita *E. crassipes* a tolerar condições adversas (VITÓRIA, *et al.*, 2010).

A presença da exoderme constitui uma importante barreira apoplástica (SCREIBER & FRANKE 2011) proporcionando a seletividade iônica na proximidade da periferia da raiz o que

pode impedir a concentração de substâncias potencialmente tóxicas no córtex ( ENSTONE, 2003) e então proporcionar uma tolerância ao metal. No quarto dia de exposição a  $\text{Cr}^{+3}$  *E. crassipes* apresentou espessamento na exoderme e endoderme. Este espessamento pode ser uma estratégia para minimizar a translocação de metais a parte aérea (LIU & KOTTKE, 2003; MANGABEIRA *et al.*, 2006), pois fornece uma maior área de retenção desses elementos metálicos (GOMES, 2011). Portanto, protege as células vegetais dos efeitos danosos de metais tóxicos. (GOMES, 2011; KRZESLOWSKA, 2011). Entretanto *E. crassipes* exposta a 8 dias a  $\text{Cr}^{+3}$  indicou redução do espessamento da exoderme, podendo sugerir maior translocação do metal a parte aérea.

Durante o estudo foi observado aumento no turgor celular. Este aumento e expansão celular é uma forma de compartimentalizar o metal no vacúolo e evitar íons metálicos livres na planta. Plantas expostas a condições de estresse produzem cristais, sendo uma forma de remoção do excesso de oxalato de cálcio que são complexados ao metal (SOUZA *et al.*, 2009). Os cristais de ráfide podem atuar na detoxificação, regulação de íons e proteção mecânica, evitando que danos maiores sejam causados ao metabolismo (FRANCESCHI & NAKATA, 2005). Neste estudo, *E. crassipes* apresentou maior presença de idioblastos quando expostas por mais tempo ao metal Cr. Já foi descrito que a mesma espécie exposta aos metais Cd, Pb apresenta aumento progressivo da formação de cristais de oxalato de cálcio (ráfides) (MAZEN & EL MAGHRABY (1997); SOUZA *et al.*, 2009). O aumento da ocorrência dos idioblastos é considerado um mecanismo de quelação e compartimentalização do metal na raiz, o que minimiza os danos causados pelos elementos metálicos (TIAN *et al.*, 2011).

Na macrófitas aquáticas flutuantes o turgor das células e o aerênquima assumem o principal papel na sua sustentação 70 % do seu volume é ocupado por ar (ESTEVES, 1998). O aerênquima permite a transferência de gases verticalmente da parte superior da planta até as raízes e vice versa, além de atuar como uma alternativa para adquirir  $\text{O}_2$ . Na presença de metais, é estimulada a produção de etileno ocasionando maior atividade da celulase, promovendo a desintegração das células e por fim o desenvolvimento do aerênquima (CHEN & KAO 1995; TOPPI *et al.*, 1998;

SOUZA *et al.*, 2009). Durante a exposição de *E. crassipes* a  $\text{Cr}^{+3}$  foi observado aumento do aerênquima com maior tempo de exposição ao metal, apresentando paredes mais planas e organizadas.

A presença de compostos fenólicos e compostos lipídicos (Tabela 1) está relacionada ao fato destes compostos atuarem na proteção do metabolismo vegetal contra estresse oxidativo (HUTZLER *et al.*, 1998), promovido pela presença do metal e por sua função como quelante, sendo considerados detoxificadores (LAVID *et al.*, 2001).

Quanto a parte aérea, a presença de Cr provocou alterações nos cloroplastos do parênquima paliçádico de *Eichhornia crassipes* submetidas a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  por 4 dias (Figura 9).

No presente estudo foi verificado o aumento no volume de estroma nas plantas expostas a Cr oriundas dos 3 rios em estudo, esta alteração é considerada uma característica das plantas submetidas a estresse (BERNAL *et al.*, 2006; RANGEL *et al.*, 2002). Estudo com *Eichhornia crassipes* oriundas de regiões mais industrializadas com presença de metais tóxicos, mostrou maior volume do estroma em comparação com plantas controle (LAGE-PINTO *et al.*, 2008), o mesmo é observado em cloroplastos de plântulas de arroz expostos a clorato (BORGES *et al.*, 2004). No presente estudo foi verificada desorganização das membranas dos tilacóides nos cloroplastos de indivíduos expostos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$ . Do mesmo modo, plantas de *Taxithelium nepalense* quando expostas a 1 mM de chumbo mostram severas alterações nas membranas do tilacóides (CHOUDHURY & PANDA, 2005) e plântulas de tomate submetidas também ao chumbo (0,75mM) também apresentam desorganização nas membranas dos tilacóides.

Os indivíduos de *E. crassipes* submetidos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$  apresentaram maior presença de plastoglóbulos quando comparados aos indivíduos controle. Os plastoglóbulos tem como função a biossíntese de corpos lipídicos e são subcompartimentos de armazenamento dos tilacóides, contendo substâncias como carotenóides, plastoquinonas e tocoferol (vitamina E) que atuam na proteção do aparato fotossintético contra os radicais livres (AUSTIN *et al.* 2006). Com isso, o aumento da presença de plastoglóbulos sugere um mecanismo de resposta ao estresse oxidativo, sendo considerada uma estratégia de resistência das plantas ao Cr, evitando danos no aparato

fotossintético. De fato, foi verificado aumento da presença dos grãos de amido nos cloroplastos dos indivíduos submetidos a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$ , evidenciando o bom funcionamento fotossintético. Entretanto mudanças na ultraestrutura do cloroplasto induzidas por Cr foram observadas em plantas como *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* e *Taxithelium nepalense*, conduzindo a inibição fotossintética (BASSI *et al.*, 1990; CHOUDHRY & PANDA, 2004). O aumento da presença de mitocôndrias e peroxissomos próximas aos cloroplastos indica presença da fotorrespiração e maior consumo de energia metabólica nas células (KEUNEN *et al.*, 2011). Além de respiração, mitocôndrias de plantas desempenham um papel no metabolismo de diversos aminoácidos, vitaminas e lipídios essenciais (KEUNEN *et al.*, 2011).

As alterações estruturais encontradas tanto nas raízes quanto nos cloroplastos auxiliaram na proteção do aparato fotossintético. O aumento dos números das organelas peroxissomos e mitocôndrias próximas aos cloroplastos sugerem que a fotorrespiração foi intensificada nestas plantas. Isso pode ter ocorrido em função do estresse gerado pela presença de  $\text{Cr}^{+3}$  e como forma de manter a assimilação fotossintética sob estas condições.

Tendo em vista os dados da fluorescência da clorofila *a* e pigmentos fotossintéticos que indicaram uma condição inalterada e saudável, pode ser sugerido que as alterações anatômicas das raízes e as alterações ultraestruturais dos cloroplastos preveniram danos no aparato fotossintético.

## 7. Conclusão

Indivíduos de *E. crassipes* provenientes dos três rios expostos a 1mM de  $\text{Cr}^{+3}$  não apresentaram redução no rendimento fotossintético ao longo do experimento (0 a 8 dias).

Alterações anatômicas na raiz (aumento dos idioblastos, espessamento da exoderme, surgimento de cristais de oxalato de Ca) de *E. crassipes* expostas a 1mM de  $\text{Cr}^{+3}$  possivelmente proporcionaram proteção a parte aérea pela manutenção destes metais nas raízes. Análises ultraestruturais foliares de *E. crassipes* expostas a 1mM de  $\text{Cr}^{+3}$  sugerem normalidade no processo fotossintético (presença de grãos de amido) e respostas contra danos decorrentes de estresse (aumento do número de plastoglóbulos, mitocôndria e peroxissoma, volume do estroma) auxiliando na proteção da planta.

Não houve variação ecofisiológica, anatômica e ultraestrutural em função do rio de origem de *E. crassipes*, apenas em função da presença e do tempo de exposição a 1 mM de  $\text{Cr}^{+3}$ . Todas as plantas apresentaram estratégias similares que proporcionaram proteção ao metabolismo fotossintético.

## 8. Referências

- ALLUÉ, J., GARCÉS, A. M., BECH, J., BARCELÓ, J., & POSCHENRIEDER, C. (2013). Fractionation of chromium in tannery sludge-amended soil and its availability to fenugreek plants. *Journal of Soils and Sediments*, p.1-6.
- AUSTIN, J. R., E. FROST, P. A. VIDI, F. KESSLER AND L. A. STAEHELIN. (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell*, vol. 18, p. 1693–1703.
- BASSI M, GRAZIA CORRADI M, REALINI M. (1990). Effect of Cr (VI) on two fresh water plants *Lemna minor* and *Pistia stratores*, 1. Morphological observation. *Cytobios*, p. 62:27-38.
- BENAVIDES, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Planta Physiology*, 17(1),p. 21-34.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P., BAKER, N.R. (1989). Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*. Vol. 3, p. 497-514.
- BONET A, POSCHENRIEDER C AND BARCELO J. (1991). Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. *Journal of Plant Nutrition*.14(4), p. 403–414.
- BOONYAPOOKANA, B., UPATHAM, E.S., KRUAETRACHUE, M., POKETHITIYOOK, P., SING-HAKAEW, S. (2002). Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *International Journal of Phytoremediation*. 4, p. 87–100
- BOZZOLA, J.J., RUSSEL, L.D. (1992). Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones & Bartlett, *Boston*. p. 542.
- BRANCO, S.M., BERNARDES, R.S., MATHEUS, C.E. (1985). Produção de alimentos, aproveitamento energético e reciclagem de nutrientes em um sistema ecológico de tratamento de resíduos orgânicos. *Revista DAE*, vol. 45 n. 143, p.390-394.
- BURZYŃSKI, M. E KŁOBUS, G. (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica* 42 (4), p. 505-510.
- BUTLER, W.L. E KITAJIMA, M. 1975. A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: *Proceedings of the 3rd International Congress on Photosynthesis* (ed. M. Avron) p.13-24.
- CARVALHO, E.A., CAMPOS, A.R., PEITER, C.C., ROCHA, J.C. (2002). Aproveitamento dos resíduos finos das serrarias de Santo Antônio de Pádua. Centro de tecnologia mineral.

Ministério da ciência e tecnologia coordenação de apoio à pequenas e médias empresas – CPME.

- CASTRO, E. D., PEREIRA, F. J., & PAIVA, R. (2009). Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos. *Lavras: UFLA*, p. 234.
- CHANEY, R. L., MALIK, M., LI, Y. M., BROWN, S. L., BREWER, E. P., ANGLE, J. S., & BAKER, A. J. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current opinion in Biotechnology*, 8(3), 279-284.
- CHEN, S. L., & KAO, C. H. (1995). Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Science*, 104(2), 135-138.
- CHOUDHURY, S., PANDA S.,K. (2004). Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead (Pb) and arsenic (As) Phytotoxicity. *Current Science*. 87, p. 342-348.
- CHUGH, L. K., & SAWHNEY, S. K. (1999). Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (4), p.297-303.
- CLEMENS, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88, p. 1707-1719.
- CONAMA, R. (2005). 357, de 17 de Março de 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA*, 357.
- CORRADI, M. G. & M. BASSI. (1987). Morphological alterations induced by Cr 6" in fresh water plants. 14th *Congres International Botaniste* de Berlin.
- DA CUNHA M, GOMES VM, XAVIER FILHO J, ATTIAS M, SOUZA W, MIGUENS FC. (2000). Laticifer System of *Chamaesyce Thymifolia*. A Closed Host Environment for Trypanosomatids. *Biocell* (Mendoza); 24, p. 123-132.
- DELGADO, M.; BIGERIEGO, M.; GUARDIOLA, E. (1993). Uptake of Zn, Cr and Cd by water hyacinths. *Water Research*. 27: 269-272.
- DEMMIG-ADAMS, B., WINTER, K., KRÜGER, A., & CZYGAN, F. C. (1989). Light response of CO<sub>2</sub> assimilation, dissipation of excess excitation energy, and zeaxanthin content of sun and shade leaves. *Plant physiology*, vol. 90, n. 3, p. 881-886.
- DHIR B, SHARMILA P, SARADHI PP. (2008). Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Braz. J. Plant physiology*. 20:61-70.
- DING, X.; WANG, W.Q.; JIANG, J.; RU B.G.; WANG Y.Y. (1994). The purification and rapid identification of heavy metal-binding peptides of water hyacinth. *Science China* 37, p. 303-309.

- ELFADL, M.A.; LUUKKANEN, O. (2006). Field studies on the ecological strategies of *Prosopis juliflora* in a dryland ecosystem. 1. A leaf gas exchange approach. *Journal of Arid Environments*, 66, p.1-15.
- ENSTONE, D. E., PETERSON, C. A., & MA, F. (2002). Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335-351.
- FRANCESCHI, V. R., & NAKATA, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual review of plant biology*, 56, p. 41-71
- FU, F., WANG, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*. 92, p. 407-418.
- 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, p. 87-92.
- GRISI, F. A., ALVES, J. D., CASTRO, E. D., OIVEIRA, C., BIAGIOTTI, G., & MELO, L. D. (2008). Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí'e'Siriema'submetidas ao estresse hídrico. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(06), p. 1730-1736.
- GOMES, M. P., MARQUES, T. C. L. L. D., E MELO, S., NOGUEIRA, M. D. O. G., CASTRO, E. M. D., & SOARES, Â. M. (2011). Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Scientia Agricola*, 68(5), 566-573.
- GONZÁLES, C. I., MAINE, M. A., CAZENEVE, J., SANCHEZ, C.G., BENAVIDES, M. P. (2014). Physiological and biochemical responses of *Eichhornia crassipes* exposed to Cr (III). *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-9.
- GOPAL, B. (1987). Water hyacinth. *Aquatic Plant Study*. P. 471.
- GUO, Y. P., GUO, D. P., ZHOU, H. F., HU, M. J. & SHEN, Y. G. (2006). Photoinhibition and xanthophyll cycle activity in bayberry (*Myrica rubra*) leaves induced by high irradiance. *Photosynthetica*, vol.44, n.3, p.439-446.
- HALL, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366), p. 1-11.
- HEUMANN, H. G. (1987). Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgar* & *Protoplasma*, vol.136, p.37-48.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soli. *Berkeley: California Agriculture Station*, p. 347 .
- HODGSON, E. (2004). Introduction to toxicology. *A textbook of modern toxicology*, 1.
- HU, W.; FENG, Z.; TANG, M.S. (2004). Chromium(VI) enhances (+/-)-anti- 7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,1 tetrahydrobenzo pyren induced cytotoxicity and



- mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair. *Biochemistry*. 43 (44), p. 14282- 14289.
- HU, C., ZHANG, L., HAMILTON, D., ZHOU, W., YANG, T. e ZHU, D. (2007). Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* (Mart.). *Hydrobiologia*, vol. 579, n. 1, p. 211-218.
- INEA. (2011). Instituto Estadual do Ambiente. <http://www.inea.rj.gov.br/fma/bacia-rio-paraiba-sul.asp>.
- KAMAL, M., GHALY, A. E., MAHMOUD, N., & COTE, R. (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment international*, 29(8), p. 1029-1039.
- KEUNEN, E., REMANS, T., BOHLER, S., VANGRONSVELD, J., & CUYPERS, A. (2011). Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *International journal of molecular sciences*, 12(10), p. 6894-6918.
- KLUMPP, A.; BAUER, K.; FRANZ-GERSTEIN, C.; MENEZES, M. (2002). Variation of nutrient and 454 metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia 455 (Brazil). *Environment International* 28, p. 165–171.
- KOTAS, J., STASICKA, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environment. Pollution*, vol. 107, p. 263–283.
- KRZESŁOWSKA, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), p. 35-51.
- KÜPPER, H., KÜPPER, F., SPILLER, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substitute chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, vol.47, p.259-266
- LAGE-PINTO, F., OLIVEIRA, J. G., DA CUNHA, M., SOUZA, C. M., REZENDE, C. E., AZEVEDO, R. A., & VITORIA, A. P. (2008). Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environmental and experimental botany*, 64(3), 307-313.
- LAVID, N.; BARKAY, Z. & TEL-OR, E. (2001). Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212, p. 313-322.
- LICHTENTHALER, H. K., RINDERLE, U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Reviews in Analytical Chemistry*, 19, p. 85.
- LIU, D.; KOTTKE, I (2003). Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. *Cell Biology and Toxicology*. 19, p. 299-311.

- LIU, D.; KOTTKE, I. (2004). Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *Bioscience Journal*, 29, p. 329-335
- LONG, S. P., HUMPHRIES, S., FALKOWSKI, P. G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, p. 633-662.
- MANGABEIRA, P.A.; MIELKE, M.S.; ARANTES, I.; DUTRUCH, L.; SILVA, D. DA. C.; BARBIER, F.; DE ALMEIDA, A.-A.F.; OLIVEIRA, A.H.; SEVERO, M.I.G.; LABEJOF, L.; ROCHA, D.C.; ROSA, T.S.; SANTANA, K.B.; GAVRILOV, K.L.; GALLE, P.; LEVI-SETTI, R.; GRENIER- LOUSTALOT, M.F. (2006). Bioaccumulation of chromium in aquatic macrophyte *Borreria scabiosoides* Cham. & Schltdl. *Applied Surface Science*. 252 (19), p. 6816-6819.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, n.345, p.659-668.
- MAZEN, A.M.A. & EL MAGHRABY, O.M.O. (1997). Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biologia Plantarum*. 40, p. 411-417.
- MCGRATH SP. (1982). The uptake and translocation of tri- and hexavalent chromium and effects on the growth of oat in flowing nutrient solution and in soil. *New Phytologist*, 92, p. 381–90.
- MISHRA, K.K., RAÍ, U.N., PRAKASH, O. (2007) Bioconcentration and Phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 130, p.237–243.
- MISHRA, K. V., TRIPATHI, D. B. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes . *Bioresource Technology* , vol.99 , p.7091–7097.
- MOLAS, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*. 47, p. 115-126.
- NATH, K., SAINI, S., & SHARMA, Y. K. (2005). Chromium in tannery industry effluent and its effect on plant metabolism and growth. *Journal of Environmental Biology*, vol. 26, n. 2, p. 197-204.
- NICHOLS, P. B., COUCH, J. D., AL HAMDANI, S. H. (2000). Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany*, 68, p. 313– 9.
- ODJEGBA, V. J.; FASADI, O. I. (2007). Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. *Environmental*, 27, p. 349-355.

- OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O. & JORDÃO, C. P. (2001). Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal*, vol.13 no.3, p. 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*, vol.14, n. 2, p. 95-104.
- OUZOUNIDOU, G., MOUSTAKAS, M., ELEFThERIOU, E. P. (1996). Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Environmental Contamination and Toxicology*, 32, p. 154–160.
- PAIVA, B. L., OLIVEIRA, G. J., AZEVEDO A. A. R., RIBEIRO, R. D., SILVA, G. M., VITÓRIA, P. A. (2009). Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr<sup>3+</sup> and Cr<sup>6+</sup>. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 65, p. 403-409.
- PALMA-SILVA, C., ALBERTONI, E. F., TRINDADE, C. R. T., FURLANETTO, L. M. E ACOSTA, M. C. (2012). Uso de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms para fitorremediação de ambientes eutrofizados subtropicais no sul do Brasil. *Perspectiva, Erechim*, vol.36, n.133, p.73-81.
- PANDA, S.K.; PATRA, H.K. (1997). Physiology of chromium toxicity in plants; A Review. *Plant Physiology and Biochemistry* . 24(1), p. 10-17.
- PANDA, S.K. (2000). Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in *Taxithelium* sp. *Current Agricultural Science and Technology*, 84, p. 631-633.
- PANDA, S.K. E CHOUDHURY, S. (2005). Chromium stres in plants. *BRAZ. J. PLANT PHYSIOLOGY.*, vol.17, n.1, p. 95-102.
- PANDEY, S., ASTHANA, R.K., KAYASTHA, A.M., SINGH, N., SINGH, S.P. (1999). Metal uptake and thiol production in *Spirodela polyrhiza* (L.) SP[20]. *Journal of Plant Physiology*. 154, p. 634-640.
- PEREIRA, G. L. G., MOLINA, S. M. G., LEA, P. L., AZEVEDO, R. A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil* 239, p. 123-132
- PEREIRA, M.O., CALZA, C., ANJOS, M.J., LOPES, R.T. E ARAÚJO, F.G. (2006). Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River(Brazil). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 296, n. 3, p.707-709.
- POMPÊO, M. (2008). Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecologia brasiliensis*, vol. 12,n. 3, p. 406-424.
- QIAN H., LI J., SUN L., CHEN W., SHENG GD., LIU W. e FU Z. (2009). Combined effecte of cooper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcriptiom. *Aquatic Toxicology*, vol. 94, n°1, p.56-61.

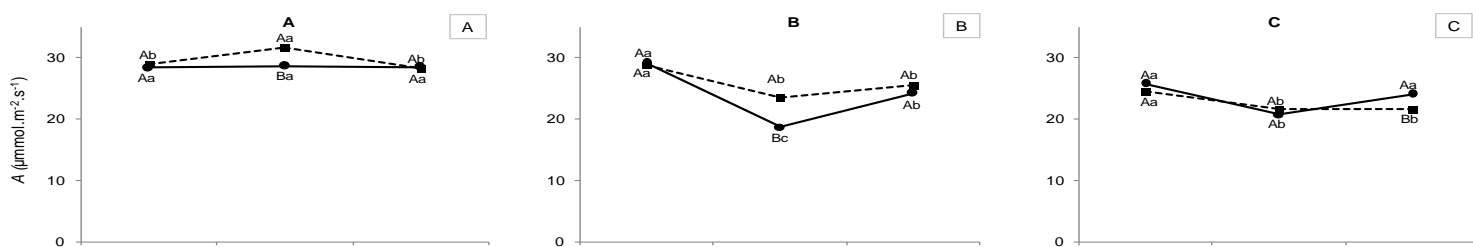
- RAI, V., VAJPAYEE, P., SINGH, S.N., MEHROTRA, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. – *Plant Science*, 167, p. 1159-1169,.
- RASHID, A., CAMM, E. L., EKRAMODDOULLAH, K. M. (1994). Molecular mechanism of action of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Letters*, 350, p. 296–298.
- REBECHINI, H. M., HANZELY, L. (1974). Lead-induced ultrastructural changes in chloroplasts of the hydrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, vol. 73, p.377-386.
- ROHÁČEK, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40, p. 13-29.
- 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, p. 587-593.
- SHANKER, A.K., CERVANTES, C., LOZA-TAVERA, H., AVUDAINAYAGAM, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, vol 31, p. 739–753.
- SINHA, S.SAXENA, R. SINGH, S. (2005). Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere*, v. 58, n. 5, p. 595-604.
- SKREBSKY, E. C., TABALD, I L. A., PEREIRA, L. B., RAUBER, R., MALDANER, J., CARGNELUTTI, D., GONÇALVES, J.F., CASTRO, G. Y., SHETINGER, M. R. C., NICOLOSO, F. T. (2008). Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. *Braz. J. Plant Physiology*. 20, p. 285-294.
- 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, p. 321-334.
- SOUZA, C.F., BACICURINSKI, I., SILVA, E.F.F. (2010). Water quality assessment of Paraíba do Sul River in Taubaté-SP. *Revista biociências*, 16 (1), p. 16-23.
- SOUZA, V. L., SILVA, D. D. C., SANTANA, K. B., MIELKE, M. S., ALMEIDA, A. F., MANGABEIRA, P. A. O., & ROCHA, E. A. (2009). Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. *Acta Botanica Brasilica*, 23, p. 343-354.
- SRIVASTAVA, S.; PRAKASH, S.; SRIVASTAVA, M.M. (1999). Fate of trivalent chromium in presence of organic acids. *Chemical Speciation & Bioavailability*. 10, p. 147-150.

- TAIZ, L. and ZEIGER, E. 2009. Fisiologia vegetal. Ed. Artimed. P. 819.
- TANNER, C. C. (2001). Plants as ecosystem engineers in subsurface- flow treatment wetlands. *Water Science and Technology* 44 (11–12), p. 9–17.
- TAVARES, K. S., ROCHA, O., ESPINDOLA, E. L. G., & DORNFELD, C. B. (2004). Composição taxonômica da comunidade de macrófitas aquáticas do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). *Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): caracterização, impactos e propostas de manejo*. Editora Rima, São Carlos, p. 239-252.
- TERRY N. (1981). An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to phytotoxic trace elements. II. Chromium. *Final report to the Kearney Foundation of Soil Science*.
- THOMAZ, S.M. (2002). Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 20, n. especial, p. 21-33.
- TIAN, S., LU, L., LABAVITCH, J., YANG, X., HE, Z., HU, H. & Brown, P. (2011). Cellular sequestration of cadmium in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. *Plant physiology*, 157(4), p. 1914-1925.
- 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, p. 119-129
- TRIPATI, R. D. E SMITH, S. (2000). Effect of chromium (VI) on growth and physiology of giant duckweed *Spirodella polyrrhiza* (L.) Schileiden. In: Yunus, M N, Singh, L, de Kok, J (eds), *Environmental Stress: Indication, Mitigation and Eco Conservation*, p.195-205.
- VAJPAYEE, P., TRIPATI, R. D., RAI, U. N., ALI, M. B., SINGH, S. N. (2000). Chromium accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere*, vol. 41, p.1075-1082.
- VAN KOOTEN, O., SNEL, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, vol. 25, p. 147-150.
- VASELLATI, V., OESTERHELD, M., MEDAN, D., & LORETI, J. (2001). Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. *Annals of Botany*, 88(3), p. 355-360.
- VERNAY, P.; GAUTHIER-MOUSSARD, C.; HITMI, A. (2007). Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosph.* 68, p. 1563-1575.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*. 57 (7), p. 701-710.
- VITÓRIA, A.P., LAGE-PINTO, F., CAMPANELI, L.B., ALMEIDA, 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. *Braz. J. Plant Physiology*, 22(1): 49-59.
- VITÓRIA, A.P., LAGE-PINTO, F., CAMPANELI, L.B.S., DA 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*, vol. 54, n.5, p. 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), p. 307-313.
- WETZEL, R. G. (1981). *Limnologia*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, p. 679.
- YRUELA, I(2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, n. 1, p. 145-156.
- ZAVODA, J., CUTRIGHT, T., SZPAK, J., & FALLON, E. (2001). Uptake, selectivity, and inhibition of hydroponic treatment of contaminants. *Journal of environmental engineering*, 127(6), p. 502-508.
- ZAYED, A.; Lytle, C.M.; Jin-Hong, Q.; Terry, N.; Qian, J.H. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in egetable crops. *Planta* 206, p. 293-299.

## 9. Anexo 1

As medidas de trocas gasosas foram realizadas na casa de vegetação utilizando um analisador de gás carbônico no infravermelho (IRGA) portátil, de circuito fechado, modelo CIRAS-2 (Portable Photosynthesis Systems, Hitchin, Hertfordshire, UK - LCA). As folhas foram clipeadas com o auxílio de uma cuveta Parkinson com conectada ao CIRAS-2. As medidas foram conduzidas na parte da manhã (entre 8:00 e 10:00 h). Luz artificial saturante, umidade e concentração de CO<sub>2</sub> foram ajustadas para 2000  $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de fótons, 80% e 375 ppm, respectivamente



**Figura 10.** Parâmetros de trocas gasosas em plantas de *Eichhornia crassipes* oriundas dos rios Paraíba do Sul (A); Muriaé (B) e Pomba (C) e expostas as concentrações de 0 e 1 mM de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. A – assimilação de CO<sub>2</sub>. Letras maiúsculas comparam tratamentos no mesmo tempo. Letras minúsculas comparam os tratamentos ao longo do tempo. Linhas cheias representam as plantas controle e as linhas pontilhadas as plantas expostas a 1mM Cr<sup>3+</sup> Dados cedidos pela Doutoranda do curso de Ecologia e Recursos Naturais/UENF, Maria Angélica da Conceição Gomes.

## 10. Anexo 2

As amostras de folhas e raízes desidratadas em estufa a 60 °C foram maceradas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e, em seguida, acondicionadas em tubos plásticos. Quinhentos miligramas de cada material vegetal foram acondicionados em bombas de teflon, onde foram adicionados 10mL de ácido fluorídrico 48% e 10 mL de ácido nítrico 65% (em capela). As bombas foram colocadas em blocos digestores por 12h a 150°C. Posteriormente as bombas foram abertas para que a solução evaporasse e atingisse um volume de aproximadamente 1mL. Em seguida as bombas foram retiradas do bloco digestor até resfriarem e então foram adicionados 10 mL de ácido nítrico a 0,5N. Após este procedimento, as amostras retornaram para o bloco digestor por mais 30 min a 80°C. Transcorrido este tempo, as amostras foram resfriadas, filtradas com filtro quantitativo Framex (12,50 ± 0,10 cm), acondicionadas em frascos de plástico e guardadas em geladeira para análise posterior. A quantificação de Cr total nas amostras foi realizada através da Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES).



**Tabela 5.** Quantificação de Cromo nas raízes e folhas de *Eichhornia crassipes* oriundas dos rios Paraíba do Sul ; Muriaé e Pomba expostas as concentrações de 0 e 1 mM de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Dados cedidos pela Doutoranda do curso de Ecologia e Recursos Naturais/UENF, Maria Angélica da Conceição Gomes.

Rios	Tempo (dias)	[Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] mM	Folha	Raíz
RPS	0	0	4,96 ax	21,53 ax
	4	0	2,06 Bax	18,30 Bay
		1	12,06 Aax	58,56 Abx
	8	0	2,59 Bax	12,69 Bax
		1	15,10 Aax	82,21 Aaz
	Muriaé	0	0	2,64 Aax
4		0	1,40 Aax	8,07 Baz
		1	5,29 Aax	63,41 Abx
8		0	1,88 Aax	12,42 Bax
		1	3,45 Aaz	92,59 Aay
Pomba		0	0	2,54 Aax
	4	0	3,71 Aax	23,23 Bax
		1	6,67 Aax	60,72 Abx
	8	0	4,76 Aax	17,25 Bax
		1	7,94 Aaz	129,50 Aax

## 11. Apêndice 1

**Tabela 6.** Parâmetros de Fluorescência da clorofila *a* Fv/Fm = rendimento quântico potencial do FSII; Fv/Fo = eficiência da capacidade fotossintética; qP = quenching fotoquímico; qNP = dissipação não-fotoquímica e NPQ = dissipação não-fotoquímica) em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Paraíba do Sul (RPS), Muriaé e Pomba, exposta a 1 mM Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Letras maiúsculas comparam Controle e Cr no mesmo rio e tempo. Letras minúsculas (a e b) comparam os tempos em cada tratamento e rio. Letras minúsculas (x e y) comparam rios no mesmo tempo e tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas. p<0,05. N = 6.

Parâmetros de Fluorescência							
Rios	Tratamentos	Tempo(dias)	Fv/Fm	Fv/F0	qP	qNP	NPQ
RPS	Controle	0	0,849 ± 0,006 Aby	5,633 ± 0,277 Aby	0,976 ± 0,006 Aax	0,074 ± 0,016 Aax	0,055 ± 0,005 Aax
		4	0,881 ± 0,002 Aax	7,405 ± 0,170 Aax	0,989 ± 0,003 Aax	0,058 ± 0,004 Aax	0,047 ± 0,004 Aax
		8	0,866 ± 0,004 Aaby	6,450 ± 0,189 Aabxy	0,975 ± 0,005 Abx	0,061 ± 0,006 Aax	0,052 ± 0,008 Aax
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	0,883 ± 0,004 Aax	7,539 ± 0,272 Aax	0,987 ± 0,005 Aax	0,061 ± 0,004 Aax	0,053 ± 0,005 Aax
		8	0,86 ± 0,010 Aby	6,196 ± 0,496 Aby	0,973 ± 0,011 Aax	0,054 ± 0,007 Aax	0,048 ± 0,006 Aax
		0	0,886 ± 0,007 Aax	7,656 ± 0,504 Aax	0,971 ± 0,004 Abx	0,065 ± 0,007 Aax	0,059 ± 0,006 Aax
MURIAÉ	Controle	4	0,885 ± 0,002 Aax	7,674 ± 0,141 Aax	0,990 ± 0,004 Aax	0,045 ± 0,005 Aby	0,040 ± 0,004 Aby
		8	0,874 ± 0,007 Aax	6,860 ± 0,393 Aay	0,978 ± 0,007 Aby	0,055 ± 0,002 Abx	0,049 ± 0,002 Abx
		0	0,884 ± 0,005 Aax	7,753 ± 0,311 Aax	0,968 ± 0,006 Aby	0,046 ± 0,006 Aby	0,043 ± 0,006 Aby
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	0,885 ± 0,003 Aax	7,669 ± 0,224 Aax	0,986 ± 0,004 Aax	0,045 ± 0,005 Aby	0,041 ± 0,005 Aaby
		8	0,879 ± 0,009 Aax	7,100 ± 0,50 Aay	0,962 ± 0,045 Abx	0,047 ± 0,007 Aby	0,052 ± 0,012 Aax
		0	0,879 ± 0,009 Aax	6,859 ± 0,617 Aax	0,985 ± 0,004 Aax	0,051 ± 0,006 Aaxy	0,046 ± 0,006 Aaxy
POMBA	Controle	4	0,866±0,005 Aby	6,222 ± 0,375 Abx	0,986 ± 0,004 Aax	0,062 ± 0,009 Aax	0,056 ± 0,009 Aax
		8	0,881 ± 0,004 Aax	7,432 ± 0,311 Abx	0,989 ± 0,005 Aax	0,052 ± 0,004 Aabx	0,047 ± 0,004 Aaxy
		0	0,877 ± 0,010 Aaxy	7,386 ± 0,214 Aay	0,985 ± 0,006 Aax	0,043 ± 0,005 Aby	0,040 ± 0,003 Aby
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	0,877 ± 0,010 Aaxy	7,386 ± 0,214 Aay	0,985 ± 0,006 Aax	0,043 ± 0,005 Aby	0,040 ± 0,003 Aby
		8	0,877 ± 0,010 Aaxy	7,386 ± 0,214 Aay	0,985 ± 0,006 Aax	0,043 ± 0,005 Aby	0,040 ± 0,003 Aby
		0	0,877 ± 0,010 Aaxy	7,386 ± 0,214 Aay	0,985 ± 0,006 Aax	0,043 ± 0,005 Aby	0,040 ± 0,003 Aby

## 12. Apêndice 2

**Tabela 7.** Conteúdos de Pigmentos Fotossintéticos (clorofila a (clo a), clorofila b (clo b) e carotenoides) determinados em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) provenientes de 3 rios = Paraíba do Sul (RPS), Muriaé e Pomba, exposta a 1 mM Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 0, 4 e 8 dias. Letras maiúsculas comparam tratamentos no mesmo rio e tempo (Teste não-paramétrico Mann-Whitney). Letras maiúsculas comparam Controle e Cr no mesmo rio e tempo. Letras minúsculas (a e b) comparam os tempos em cada tratamento e rio. Letras minúsculas (x e y) comparam rios no mesmo tempo e tratamento. Letras diferentes representam diferenças significativas. p≤0,05. N = 6.

Rios	Tratamentos	Tempos(dias)	Pigmentos Fotossintéticos (nmol.cm <sup>-2</sup> )				
			Clo a	Clo b	Carotenóides	Clo total	Cloa/Clob
RPS	Controle	0	42,15 ± 9,60 Aax	11,72 ± 3,28 Aax	7,37 ± 2,04 Aax	53,8 ± 12,7 Aax	3,7 ± 0,5 Aax
		4	48,61 ± 12,5 Aax	15,93 ± 3,15 Aax	8,25 ± 2,81 Aax	64,5 ± 15,6 Aax	3,1 ± 0,3 Aax
		8	39,04 ± 4,97 Aax	13,18 ± 1,85 Aax	6,63 ± 1,62 Aax	52,2 ± 6,50 Aax	2,9 ± 0,3 Abx
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	45,53 ± 6,02 Aax	14,52 ± 2,1 Aax	8,04 ± 1,05 Aax	60,1 ± 8,1 Aax	3,1 ± 0,1 Aax
		8	41,25 ± 10,1 Aax	14,69 ± 3,24 Aax	8,32 ± 2,62 Aax	55,9 ± 13,2 Aax	2,8 ± 0,2 Abx
MURIAÉ	Controle	0	36,78 ± 7,04 Aax	12,03 ± 1,93 Aax	6,94 ± 1,81 Aax	48,8 ± 8,72 Aax	3,1 ± 0,3 Aax
		4	41,59 ± 8,65 Aax	13,09 ± 2,31 Aax	7,56 ± 1,81 Aax	54,6 ± 11,1 Aax	3,2 ± 0,1 Aax
		8	40,30 ± 13,1 Aax	12,6 ± 4,73 Aax	6,82 ± 3,24 Aax	52,9 ± 17,7 Aax	3,3 ± 0,4 Aax
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0	32,21 ± 5,12 Abx	11,14 ± 1,33 Abx	5,67 ± 1,53 Aax	43,3 ± 5,8 Abx	2,9 ± 10,4 Aax
		8	42,54 ± 10,5 Aax	14,27 ± 2,90 Aax	7,91 ± 1,95 Aax	56,8 ± 13,2 Aax	2,9 ± 0,3 Aax
POMBA	Controle	0	45,44 ± 4,53 Aax	13,68 ± 1,45 Aax	8,74 ± 0,72 Aax	59,1 ± 5,9 Aax	3,3 ± 0,2 Aax
		4	46,91 ± 14,6 Aax	14,12 ± 4,54 Aax	8,11 ± 2,11 Aax	61,1 ± 19,2 Aax	3,3 ± 0,1 Aax
		8	44,82 ± 8,51 Aax	14,39 ± 3,01 Aax	8,02 ± 1,41 Aax	59,2 ± 11,5 Aax	3,1 ± 0,2 Aax
	1 mM Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	44,55 ± 8,39 Aax	13,46 ± 2,46 Aax	8,28 ± 1,54 Aax	58,1 ± 10,9 Aax	3,3 ± 0,1 Aax
		8	46,70 ± 8,11 Aax	15,61 ± 1,69 Aax	8,20 ± 1,06 Aax	62,3 ± 9,6 Aax	2,9 ± 0,3 Abx