

**QUANTIFICAÇÃO DE CROMO TOTAL E ANÁLISES
ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms (AGUAPÉ) DOS RIOS PARAÍBA DO SUL E IMBÉ**

LUISA BRITO PAIVA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO DE 2008**

**QUANTIFICAÇÃO DE CROMO TOTAL E ANÁLISES
ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms (AGUAPÉ) DOS RIOS PARAÍBA DO SUL E IMBÉ**

LUISA BRITO PAIVA

**“Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Naturais.”**

Orientador: Prof^o. Dr. Marcelo Gomes da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Ângela Pierre Vitoria

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO DE 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF
32/2008

Paiva, Luisa Brito

Quantificação de cromo total e análises ecofisiológicas em plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) dos rios Paraíba do Sul e Imbé / Luisa Brito Paiva. – Campos dos Goytacazes, 2008.

xiii, 88 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Físicas. Campos dos Goytacazes, 2008.

Orientador: Marcelo Gomes da Silva.

Co-orientadora: Ângela Pierre Vitória.

Área de concentração: Química e física do meio ambiente

Bibliografia: f. 75-87

1. Rio Paraíba do Sul 2. Rio Imbé 3. Cromo trivalente 4. Cromo hexavalente 5. Ecofisiologia I. Universidade Estadual do Norte

**QUANTIFICAÇÃO DE CROMO TOTAL E ANÁLISES
ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms (AGUAPÉ) DOS RIOS PARAÍBA DO SUL E IMBÉ**

LUIZA BRITO PAIVA

**“Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Naturais.”**

Aprovada em 22 de fevereiro de 2008.

Banca Examinadora:

Prof. Ricardo Antunes de Azevedo (Dr. Bioquímica de plantas) - ESALQ/USP

Prof. Marcelo Silva Sthel (Dr. Física) - UENF/LCFIS

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Dr. Biologia Vegetal) - UENF/LMGV

Prof. Marcelo Gomes da Silva - (Dr. Física) - UENF/LCFIS

(Orientador)

**“E se alguém ama a justiça,
seus trabalhos são virtudes,
ela ensina a temperança e a prudência,
a justiça e a força,
não há ninguém que seja mais útil aos homens na vida”.**

Livro da Sabedoria 8,7.

Aos meus pais, Maria da Penha e Clementino

Ao meu irmão Alexandre

Aos meus amigos e mestres

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por saber trabalhar perfeitamente com ferramentas insuficientes como eu.

Aos meus maravilhosos pais, Maria da Penha e Clementino que amo infinitamente, exemplos de luta e perseverança. Ao meu irmão Alexandre e a minha avó Maria de Lourdes. Obrigada por confiarem em mim, por me apoiarem e torcerem em todos os momentos da vida.

A Angela mais uma vez e sempre. Por depositar em mim sua confiança para conduzir mais um trabalho. Pela sua disposição em me ajudar, em me ensinar e por ter me mostrado que posso ser capaz de superar as coisas que considero como desafiadoras. Pelos anos de amizade, respeito e compreensão. Por ser meu espelho de profissionalismo e competência, entre outras tantas qualidades.

Ao Marcelo, uma excelente pessoa e, acima de tudo, um raro profissional, sempre disposto ajudar. Por ter aceitado conduzir esse trabalho. Por tantos conhecimentos passados. Pela paciência e etc. Também meu espelho de profissionalismo e competência, entre outras tantas qualidades.

A todos do LCA. As novas amigadas. Aos momentos de diversão e muito trabalho. Pelas grandes ajudas. Em especial, ao Leonardo, Fred (essencial nas análises ecofisiológicas), Juliana, Flávia e Aline, Thiago, Bruno Esteves e Gustavo. Cada um contribuindo de modo particular e indispensável.

Ao Douglas. Meu querido amigo, sua ajuda foi imprescindível. Sabemos o quanto suamos (literalmente) com todo o trabalho. Não consigo nem pensar o que seria de mim sem sua preciosa mão. De todo o meu coração: muito obrigada!

A todos do LCFIS, de maneira particular, ao Milton, Willy, as Milenas. Por terem sido imensamente prestativos no decorrer do meu trabalho dentro deste laboratório.

A todos do LCQUI, por alguns reagentes e equipamentos que utilizei nas análises das minhas amostras, além dos amigos, é claro.

A todos os funcionários, colegas e professores, que embora não citados não deixaram de ser importantes para minha formação e realização deste trabalho.

As fontes financiadoras PIBIC/UENF, FAPERJ e FAPESP indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii

CAPÍTULO 1 - QUANTIFICAÇÃO DE Cr TOTAL E HEXAVALENTE EM PLANTAS DE AGUAPÉ DO RIO PARAÍBA DO SUL..... 1

1.1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1.1 - O rio Paraíba do Sul e sua importância.....	1
1.1.2 - Metais pesados e poluição ambiental.....	4
1.1.3 - Mecanismos de tolerância a metais pesados em plantas.....	7
1.1.4 - Cr e estresse em plantas.....	8
1.1.5 - <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms e estresse ambiental.....	11
1.2 – JUSTIFICATIVA.....	15
1.3 – OBJETIVOS.....	16
1.3.1. Objetivo geral.....	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	16
1.4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	16
1.4.1 - Material vegetal e local de coleta.....	17
1.4.2 - Preparo da amostras para quantificação de Cr.....	18
1.4.3 - Método colorimétrico da 1,5 difenilcarbazida (quantificação de Cr ⁺⁶).....	19
1.4.4 – Análise dos resultados.....	19
1.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
1.5.1 - Quantificação de Cr total.....	20
1.5.2 – Quantificação de Cr ⁺⁶	22
1.6 – CONCLUSÕES.....	23

CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DO LIMITE INFERIOR DE DETECÇÃO DE Cr⁺⁶ NA PRESENÇA DE Fe⁺³	24
2.1 – INTRODUÇÃO.....	24
2.1.1 - Presença de ferro no rio Paraíba do Sul e rio Imbé.....	24
2.2 – JUSTIFICATIVA.....	26
2.3 – OBJETIVOS.....	27
2.3.1 – Objetivos Gerais.....	27
2.4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.6 – CONCLUSÕES.....	33
CAPÍTULO 3 - ANÁLISES ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE AGUAPÉ SUBMETIDAS A Cr⁺³ e Cr⁺⁶	34
3.1 – INTRODUÇÃO.....	34
3.1.1 - Emissão da fluorescência da Clorofila <i>a</i>	34
3.1.2 - Trocas Gasosas.....	37
3.1.3 - Pigmentos Fotossintéticos.....	38
3.1.4 - Alterações ecofisiológicas de plantas na presença de cromo	39
3.2 – JUSTIFICATIVA.....	41
3.3 – OBJETIVOS.....	43
3.3.1. Objetivo geral.....	43
3.3.2. Objetivos específicos.....	43
3.4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.4.1 - Material vegetal e local de coleta.....	43
3.4.2 - Condições de cultivo.....	43
3.4.3 - Preparo das soluções nutritivas.....	44
3.4.4 - Preparo das soluções de Cr.....	45
3.4.5 - Parâmetros Ecofisiológicos.....	46
3.4.5.1 – Indicativo do conteúdo de cor ver.....	47

3.4.5.2 – Quantificação dos Pigmentos Fotossintéticos.....	47
3.4.5.3 – Cinética de Emissão de Fluorescência da Clorofila <i>a</i> .	48
3.4.5.4 – Trocas Gasosas.....	48
3.4.6 - Preparo da amostras para quantificação de Cr.....	49
3.4.7 - Análises dos dados.....	49
3.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.5.1 - Alterações morfológicas.....	50
3.5.2 - Quantificação de Cr total.....	52
3.5.3 - Espectros no UV-visível.....	56
3.5.4 - Clorofila Total.....	60
3.5.5 – Conteúdo dos Pigmentos Fotossintéticos.....	61
3.5.6 – Emissão da fluorescência da clorofila <i>a</i>	63
3.5.7 - Trocas Gasosas.....	69
3.6 – CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1-** a) Estruturas de *E. crassipes* (Mart.) Solms, 1- flor, 2- limbo foliar, 3- pecíolo, 4- rizoma, 5- raiz e 6- estolão. b) Foto de um banco *E. crassipes* (Mart.) Solms mostrando os limbos foliares e as flores..... 13
- Figura 1.2** - Locais de coleta do material ao longo RPS e do rio Imbé. (1) rio Imbé (controle), (2) baixo RPS, (3) médio RPS e (4) alto RPS..... 17
- Figura 2.1** – Espectro de absorção de solução de 1 ppm de Cr^{+6} com DFC em meio ácido e sem DFC..... 29
- Figura 2.2** – Convoluções dos espectros de 0,5 ppm de Cr^{+6} puro de Fe^{+3} em diferentes em meio contendo DFC e ácido. a) 5 ppm de Fe^{+3} e b) 85 ppm Fe^{+3} . OBS: As concentrações são referentes à mistura, ou seja metades das concentrações originais..... 30
- Figura 2.3** - Gráfico das concentrações de Fe^{+3} pelas áreas de Cr^{+6} em unidades arbitrárias (u.a.) para as soluções de Cr^{+6} e Fe^{+3} em meio ácido contendo DFC. As concentrações de Fe^{+3} mostradas são a metades das originais. Fe^{+3} 200 ppm não foi mostrada..... 31
- Figura 3.1** – Experimento realizado na casa de vegetação. Recipientes contendo as macrófitas, da esquerda para a direita: controle, 1mM de Cr^{+3} , 10mM de Cr^{+3} , 1mM de Cr^{+6} e 10mM de Cr^{+6} 44
- Figura 3.2** - Aspectos morfológicos das plantas de aguapé: Coluna da esquerda: 2 dias de tratamento; coluna da direita: 4 dias de tratamento. a e b – plantas-controle; c e d - plantas expostas a Cr^{+3} 1 mM; e e f - plantas expostas a Cr^{+3} 10 mM; g e h - plantas expostas a Cr^{+6} 1 mM; i e j - plantas expostas a Cr^{+6} 10 mM..... 51
- Figura 3.3** – Espectros de absorção para partes aéreas e raízes de aguapé do controle (a) e após quatro dias de exposição a Cr^{+6} 1 mM (b) e Cr^{+3} 1 (c) e 10 mM (d). As amostras são as plantas digeridas e 57

complexadas com 1,5-DFC em meio ácido.....	
Figura 3.4 - Espectros de absorção para plantas de aguapé após quatro dias de exposição a Cr^{+6} 1 mM e Cr^{+3} 1 e 10 mM. a- partes aéreas e b-raízes. As amostras são as plantas digeridas e complexadas com 1,5-DFC em meio ácido.....	59
Figura 3.5 – Indicativo do conteúdo de cor verde em plantas de aguapé expostas a diferentes concentrações de Cr^{+3} e Cr^{+6} no tempo zero, dois e quatro dias de tratamento. As barras representam o desvio padrão. Letras maiúsculas comparam entre o mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição. Letras minúsculas, entre diferentes tratamentos no mesmo tempo.....	60
Figura 3.6 – Curva de resposta a luz para Condutância estomática e Assimilação fotossintética (eixo esquerdo e direito das ordenadas, respectivamente) pela <i>PAR</i> (radiação fotossinteticamente ativa) para plantas de aguapé.....	70
Figura 3.7 - Efeitos de Cr^{+3} e Cr^{+6} sobre a Assimilação Fotossintética (a), o Carbono interno (b), a condutância estomática (c) e a evapotranspiração (d) de plantas de aguapé. Controle (\circ), Cr^{+3} 1 mM (\square), Cr^{+3} 10 mM (Δ), Cr^{+6} 1 mM (\blacksquare) e Cr^{+6} 10 mM (\blacktriangle). Os valores são médias \pm o desvio-padrão.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Concentrações de Cr total ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) para plantas de aguapé (partes aéreas e raízes) coletadas do rio Imbé e RPS durante dois anos (4 coletas).....	21
Tabela 2.1 - Concentrações de Fe^{+3} , Cr^{+6} , reagentes e os volumes utilizados no preparo das amostras.....	28
Tabela 3.1 - Sais utilizados no preparo da solução de cultivo de micronutrientes e de Fe+EDTA (Smart e Barko, 1985).....	45
Tabela 3.2 - Sais utilizados no preparo da solução de cultivo de macronutrientes (Hoagland e Arnon, 1950).....	46
Tabela 3.3 - Equipamentos utilizados nas leituras de clorofila total ⁽¹⁾ , pigmentos fotossintéticos ⁽²⁾ , cinética de emissão da clorofila <i>a</i> ⁽³⁾ e trocas gasosas ⁽⁴⁾	47
Tabela 3.4 - Concentrações de Cr total ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) para plantas de aguapé expostas a Cr^{+3} 1 e 10 mM e Cr^{+6} 1 mM após quatro dias de tratamento.	52
Tabela 3.5 - Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$): clorofila <i>a</i> (clo <i>a</i>), clorofila <i>b</i> (clo <i>b</i>) e carotenóides (Carot.) para plantas de aguapé expostas a Cr^{+3} 1 e 10 mM e Cr^{+6} 1 mM após quatro dias de tratamento.....	61
Tabela 3.6 - Valores de fluorescência da clorofila <i>a</i> para as plantas de aguapé expostas a diferentes tratamentos com Cr^{+3} e Cr^{+6} nas concentrações de 1 e 10mM nos períodos de 2 e 4 dias. F_0 - fluorescência mínima; F_m - fluorescência máxima; F_v - fluorescência variável; F_v/F_m - eficiência quântica potencial; F_v/F_0 - eficiência da capacidade fotossintética; qP - quenching fotoquímico; qN e NPQ - quenching não-fotoquímico. Análise estatística (Tukey, $p < 5\%$): as letras (a, b, c, d e e) representam a estatística para comparação entre os tratamentos.	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Al - alumínio
As - arsênio
CaCl₂ - cloreto de cálcio
CBB - Centro de Biociências e Biotecnologia
CCT - Centro de Ciência e Tecnologia
Cd - cádmio
Ci - carbono interno
Clo - clorofila
Clo *a* - clorofila *a*
Clo *b* - clorofila *b*
cm³ - centímetro cúbico
Cr - cromo
Cr⁺² - cromo divalente
Cr⁺³ - cromo trivalente
Cr⁺⁵ - cromo pentavalente
Cr⁺⁶ - cromo hexavalente
Cr₂O₃ - trióxido de cromo
Cu - cobre
CuSO₄ - sulfato de cobre
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucleico
EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético
et al. - e colaboradores
F₀ - fluorescência inicial
Fe - ferro
FeCl₃ - cloreto férrico
Fe(NO₃)₃.9H₂O – nitrato férrico nonaidratado
F_m - fluorescência máxima

FS II - fotossistema II

F_v - fluorescência variável

F_v/F_m - rendimento quântico máximo

g - grama

g_s - condutância estomática

h - hora

H_2SO_4 – ácido sulfúrico

Hg - mercúrio

$K_2Cr_2O_7$ - dicromato de potássio

K_2SO_4 - sulfato de potássio

Kg - quilograma

KH_2PO_4 – fosfato ácido de potássio

$KHCO_3$ – carbonato ácido de potássio

L - litro

m - metro

m^{-2} – por metro quadrado

mg - miligrama

$MgSO_4$ - sulfato de magnésio

min - minuto mL - mililitro

mM - milimolar

Mn - manganês

$MnSO_4$ - sulfato de manganês

Mo – molibdênio

MPS – material particulado em suspensão

N - normal

$NaHCO_3$ - carbonato ácido de sódio

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – molibdato de amônio tetraidratado

NH_4NO_3 - nitrato de amônio

Ni - níquel

nm - nanômetro

P - fósforo

PAR - radiação fotossinteticamente ativa

Pb - chumbo

ppm - parte por milhão

PSI - fotossistema I

PSII - fotossistema II

qN e NPQ - coeficientes de extinção de fluorescência não-fotoquímico

qP - coeficiente de extinção de fluorescência fotoquímica

RJ - Rio de Janeiro

ROS - espécies reativas de oxigênio

RPS – rio Paraíba do Sul

s⁻¹ – por segundo

Se - selênio

SO₄ - sulfato

t_f - temperatura da folha

Zn - zinco

ZnSO₄ - sulfato de zinco

1,5 - DFC - 1,5 - Difenilvarbazida

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µmol - micromol

µmolfotons - micromol de fótons

% - porcentagem

RESUMO

O rio Paraíba do Sul (RPS) tem um papel decisivo no Estado do Rio de Janeiro, abastecendo de água cerca de 80% da população e recebendo efluentes industriais e urbanos. Na composição desses efluentes estão presentes alguns metais pesados, como o Cr. Devido ao grande uso desse elemento (mais especificamente na sua forma Cr^{+6}) pelo setor siderúrgico, faz-se necessária a detecção dessa forma química. Tal íon metálico é o estado de oxidação mais tóxico do Cr, o que coloca em risco as espécies animais e vegetais relacionados ao rio. O presente trabalho objetivou a determinação da concentração de cromo total e hexavalente em plantas de *Eichhornia crassipes*. Esta espécie vegetal, presente em grande quantidade no RPS e com alta capacidade de acumular metais pesados sem comprometer seu metabolismo, permite seu próprio uso na avaliação de contaminação do ambiente. As plantas foram coletadas nas regiões do alto, médio e baixo RPS e no rio Imbé (considerado como ambiente controle). Separadas as suas partes (raízes e partes aéreas), as análises foram conduzidas em espectrofotômetro de absorção atômica (120 Varian Techtron). Foi possível quantificar Cr total nas amostras, entretanto a obtenção dos resultados para Cr^{+6} esbarrou na alta presença de Fe (principal interferente do Cr^{+6}) dessas amostras. Para tanto, foi necessário estabelecer o limite inferior de detecção de Cr^{+6} na presença de Fe. Com essa finalidade, foram preparadas misturas de soluções padrões de Fe^{+3} em diferentes concentrações e uma solução de 0,5 ppm de Cr^{+6} em 1,5-DFC. A partir dos resultados obtidos, foi conduzido um experimento em casa de vegetação, no qual as plantas citadas foram cultivadas durante um período de quatro dias em soluções de Cr^{+6} e Cr^{+3} nas concentrações de 1 e 10 mM. Análises ecofisiológicas de trocas gasosas, emissão de fluorescência da clorofila *a* e conteúdo dos pigmento fotossintéticos foram feitas em indivíduos adultos de aguapé. Os resultados mostraram que as concentrações de Cr total foram maiores para as raízes que para as partes aéreas quando se utilizou a forma hexavalente do Cr. Os espectros obtidos no Uv-Visível para as mostras tratadas com Cr^{+3} foram claramente diferentes daqueles obtidos para o Cr^{+6} . As

análise ecofisiológicas mostraram que a presença de Cr^{+3} nas concentrações de 1 e 10 mM foi capaz de estimular a assimilação fotossintética, evapotranspiração e condutância estomática nas plantas analisadas em 2 dias de experimento. Porém as plantas expostas a Cr^{+6} 1 e 10 mM sofreram queda nos parâmetros fotossintéticos avaliados para o mesmo tempo de exposição ao metal pesado. Quando analisadas em 4 dias, as plantas do tratamento com Cr^{+3} 1 e 10 mM e Cr^{+6} 1mM apresentam queda dos parâmetros supracitados em relação às plantas controle. Ao final do experimento os indivíduos expostos a Cr^{+6} 10 mM encontravam-se bastante necrosados de forma que os resultados não foram mostrados.

Palavras-chave: rio Paraíba do Sul, rio Imbé, Cr^{+6} , Cr^{+3} , Fe e ecofisiologia.

ABSTRACT

The Paraíba do Sul river (PSR) has a decisive role in the Rio De Janeiro State. It supplies about 80% of the population and receives industrial and urban effluents. In the composition of these effluents there are some heavy metals as the chromium (Cr). Due to the large use of the Cr (more specifically in its Cr⁺⁶ form) by the siderurgical sector, the detection of this chemical form is necessary. Such metallic ion is the most toxic Cr oxidation state, what it puts at risk the animal and vegetal species related to the river. The present work had as objective determinate the concentration of total and hexavalent Cr in plants of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth). This vegetal species has high capacity to accumulate heavy metals without compromising its metabolism, allowing to be used in the evaluation of environmental contaminations. The plants has been collected in the regions of the higher, medium and lower PSR and in the Imbé river (considered as surrounding control). It was possible to quantify total Cr in these samples, however the attainment of the results for Cr⁺⁶ to came up against in the high presence of iron (Fe) (main Cr⁺⁶ interferent) of these samples. Thus, it was necessary to establish the Cr⁺⁶ detection minimum limit in the presence of Fe⁺³. From these results, water hyacinth was exposed to Cr⁺³ and Cr⁺⁶ in the 1 and 10 mM concentrations during four days. The plants had its ecophysiologic parameters (photosynthetic pigments, net photosynthetic rate, transpiration, stomatal conductance, substomal CO₂ concentration and chlorophyll *a* fluorescence) and the Cr concentrations in roots and shoot tissues were analyzed. The results showed that more significant concentrations of Cr in the roots than in the shoots of all plants for both chemical species. The higher concentration of chemicals to which the plants were exposed correlated with the higher amount that was found in its tissues. The Uv-Visible spectras for the cultivated samples with Cr⁺³ were clearly different of those obtained for the Cr⁺⁶. The ecophysiologics analysis has shown that Cr⁺³ 1 mM and 10 mM were able to stimulate net photosynthetic rate, transpiration and stomatal conductance in the plants exposed during two days. The

plants exposed to Cr^{+6} 10 mM had died in the end of the experiment. It was found that the substomal CO_2 concentration data followed the negative standard of the stomatal conductance.

Keywords: Paraíba do Sul river, Imbé river, Cr^{+6} , Cr^{+3} , Fe and ecophysiology.

CAPÍTULO 1

QUANTIFICAÇÃO DE Cr TOTAL E HEXAVALENTE EM PLANTAS DE AGUAPÉ DO RIO PARAÍBA DO SUL

1.1 - INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades. No entanto, nas últimas décadas, esses recursos vêm sendo intensamente ameaçados pelas ações indevidas do homem. O setor industrial constitui-se na principal e mais diversificada fonte de introdução de substâncias tóxicas, sobretudo metais pesados, nestes ambientes.

A contaminação de corpos hídricos por metais pesados tem sido largamente estudada e descrita por diversos autores (Prasad, 1995, Foster e Charlesworth, 1996; Chaoui *et al.*, 1997; Lagriffoul *et al.*, 1998; Kefala *et al.*, 1999). Em sistemas fluviais, os diferentes compartimentos abióticos e bióticos podem ser utilizados como fontes de informações sobre a qualidade da água através da dinâmica e, ou das interações físico-químicas, que dirigem os processos de disponibilidade dos metais pesados ao longo do curso d'água.

Muitas plantas aquáticas absorvem e acumulam metais pesados em concentrações relativamente altas sem comprometimento aos seus processos metabólicos, funcionando como filtros naturais e indicadores biológicos da contaminação de sistemas fluviais. Essa capacidade tem sido intensamente explorada em estudos de monitoramento de poluição ambiental de modo geral (Jordão *et al.*, 1999).

1.1.1 - O rio Paraíba do Sul e sua importância

O rio Paraíba do Sul (RPS) atravessa três estados economicamente importantes e populosos do Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, percorrendo aproximadamente 1.145 Km ao longo do seu curso com uma bacia hidrográfica de aproximadamente 55.400 km² (CEIVAP, 2002).

Os principais afluentes do RPS são os rios Paraitinga e Paraibuna no estado de São Paulo, Pirai e Paraibuna em Minas Gerais e os rios Pomba, Muriaé e Dois Rios no estado do Rio de Janeiro. De acordo com as regiões que o curso d'água do RPS percorre, recebe as denominações de alto, médio e baixo Paraíba (CEIVAP, 2002).

Da nascente do rio, situada na Serra da Bocaina (SP), à cidade de São José dos Campos (SP), é constituída a região do alto Paraíba com uma área de drenagem de 13.900 km². Desta cidade até o município de Itaocara, já no Estado do Rio de Janeiro, o rio recebe a denominação de médio Paraíba, totalizando uma superfície drenada de 20.800 km². A partir desta localidade até o município de São João da Barra na região Norte fluminense, correspondendo a uma área drenada de 20.700 km², o rio recebe a denominação de baixo Paraíba (SEMADS, 2001; CEIVAP, 2002).

As características sazonais, climáticas e constituintes dos solos variam dentro das regiões acima descritas. Em geral, o clima é subtropical com um regime de precipitação bem caracterizado com maior intensidade de chuva entre os meses de novembro e janeiro. A média da temperatura estimada para toda a bacia varia entre 26 e 28°C. A temperatura atinge valores mais elevados no médio e baixo Paraíba, com máximas variando entre 32 e 34°C. Os solos originais da bacia do RPS são considerados férteis, pois grande parte de sua extensão foi coberta pela vegetação da floresta da Mata Atlântica, que hoje encontra-se praticamente extinta devido a diferentes atividades de origem antrópicas (Carvalho e Torres, 2002).

O RPS é de suma importância para as cidades localizadas ao longo do seu curso. Suas águas são utilizadas principalmente na agricultura, na indústria e para o consumo humano (cerca de 20 milhões de pessoas). Para o Estado do Rio de Janeiro, o RPS desempenha um decisivo papel sócio-econômico, uma vez que sua bacia ocupa metade da extensão deste Estado e abastece cerca de 80% da população fluminense. Contudo, é relevante salientar que a própria utilização do rio para tais fins implica na contaminação de suas águas, já que elas recebem

efluentes de todas as atividades humanas, geralmente sem tratamento ou com tratamento insuficiente.

Historicamente, o curso d'água do RPS sofreu as conseqüências dos diferentes “ciclos econômicos” (cana-de-açúcar, café e industrial). Primeiramente, o plantio da cana-de-açúcar no baixo curso do Paraíba e o cultivo do café nas porções média e alta impactaram consideravelmente a cobertura vegetal dos solos e de suas águas com o uso intensivo de agroquímicos. Posteriormente, em meados do século XX, o avanço industrial das regiões do médio e baixo Paraíba, com a construção da represa do Funil (Itatiaia, RJ) e da barragem de Santa Cecília em Barra do Piraí (RJ) reduziram substancialmente as vazões líquidas do rio (UFRJ, 2002).

De maneira geral, a qualidade da água do RPS muda em função da região. Próximo a nascente, na região do alto Paraíba, Estado de São Paulo, onde as cidades são pequenas e de pequeno porte industrial, o rio ainda é utilizado para turismo (Carvalho *et al.*, 1999; Salomão *et al.*, 2001).

Merece atenção a região do médio Paraíba, sobretudo no município de Volta Redonda, com destaque para o parque industrial onde se encontra a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), com elevado potencial contaminante do rio, principalmente, por metais pesados. Já no baixo Paraíba, uma região pouco industrializada, onde a agricultura é a atividade principal, os resíduos de fertilizantes a base de substâncias tóxicas são também lançados no rio.

Adicionalmente ao despejo de dejetos das atividades industriais e agrícolas, há o despejo no rio de esgoto doméstico em todas essas regiões. Entretanto, a poluição de origem industrial na bacia do RPS é apontada por diversos estudos como um dos principais fatores responsáveis pela degradação dos recursos hídricos. A carga poluidora total de origem orgânica que a bacia do Paraíba recebe, apenas no Estado do Rio de Janeiro, com 4.000 indústrias ao longo da extensão da bacia, equivale à 330 toneladas por dia, dos quais cerca de 50% derivam de efluentes domésticos e 45% industriais (CEIVAP, 2002). Para o trecho

fluminense (cerca de 700 indústrias), o despejo de substâncias tóxicas em geral nas águas do rio é bastante significativo (UFRJ, 2002).

Em relação ao rejeito de metais pesados, o impacto causado ao ambiente e às formas de vida existentes neste, dependem das concentrações e dos estados de oxidação (formas químicas) em que estes metais se encontram. Estas características são alteradas ao longo do rio. Além disto, os metais pesados sofrem sedimentação e podem ter sua concentração diluída pela entrada de água de afluentes menos contaminados. Na maioria das vezes, os baixos valores de metais pesados encontrados em água de rios podem ser explicados pelo papel concentrador da vegetação ribeirinha, demonstrando sua importância na dinâmica dos metais pesados.

1.1.2 - Metais pesados e poluição ambiental

Os metais pesados representam um grupo de elementos químicos com algumas características bem definidas, como: alta densidade (em comparação à outros metais comuns), toxicidade e transporte através do ar, por gases, ou pela sua adsorção/absorção em partículas (Baird, 2002). Alguns autores, ainda, preferem classificá-los como aqueles elementos químicos com densidade igual ou superior a 5 g.cm^{-3} (Malavolta, 1994; Nies, 1999).

Deste grupo de elementos fazem parte o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb), o cromo (Cr), o molibdênio (Mo), o níquel (Ni), entre outros. Cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) são micronutrientes para organismos, plantas e animais. Porém, em altas concentrações, podem ser tão danosos quanto aqueles que não têm seu papel biológico definido (Welch, 1995).

Os metais pesados podem ser introduzidos no ambiente por alguns mecanismos de deposição atmosférica, intemperismo de rochas e solos, erosão da matriz geológica e fontes termais ou através de fontes antropogênicas. Os efluentes (das indústrias de beneficiamento de ferro e aço e agroquímicas) contendo principalmente Cr, Cu, Pb, Ni, Zn e Cd, constituem as diversas fontes antropogênicas de entrada de metais pesados nos ecossistemas aquáticos (Carvalho e Gomes, 1993).

Em geral, os metais pesados se diferenciam de compostos orgânicos tóxicos por não serem degradáveis, podendo se acumular nos compartimentos do ambiente, principalmente solos e sedimentos, onde manifestam sua toxicidade. A toxicidade destes elementos depende, em grande medida, da forma química do próprio elemento, isto é, de sua espécie ou, ainda, do seu estado de oxidação. Para alguns destes metais, como o mercúrio, a forma mais tóxica é aquela ligada a grupos alquilas, dado que muitos desses compostos são solúveis no tecido animal e podem passar através de membranas biológicas (Baird, 2002).

A espécie química em que um metal pesado está presente num meio natural determina a sua interação física ou química com este meio e, conseqüentemente, sua toxicidade. Esta, por sua vez, depende do pH e da quantidade de carbono dissolvido e em suspensão, já que interações como complexação e adsorção podem remover de forma satisfatória alguns íons metálicos e eliminar sua atividade biológica potencial. Porém, em altas concentrações esses íons podem se tornar fitotóxicos e afetar o desenvolvimento de organismos (Vitória *et al*, 2001; Baird, 2002).

É sabido que o grande desenvolvimento industrial é um dos principais responsáveis pela contaminação por metais pesados das águas fluviais e solos. A negligência no tratamento de rejeitos contendo estes elementos, além de acidentes e descuidos cada vez mais freqüentes, têm exposto os organismos vivos a ambientes poluídos quimicamente complexos. O estudo da toxicidade dos metais pesados causados aos animais e às plantas é de extrema importância para avaliar os impactos nestes e ao ambiente e, desta forma, vem atraindo a atenção de muitos cientistas de diferentes áreas tecnológicas (Prasad, 1995; Jordão *et al.*, 1999).

Paralelamente ao grande crescimento das indústrias nas últimas décadas, a rápida urbanização concentrou populações de baixo poder aquisitivo em periferias carentes de serviços essenciais de saneamento, as quais vieram desenvolvendo diversas atividades clandestinas. Isto contribuiu para gerar poluição concentrada e sérios problemas de drenagem agravados pela inadequada deposição de lixo,

assoreamento dos corpos d'água e conseqüente diminuição na velocidade de escoamento das águas, aumentando, assim, as concentrações dos poluentes químicos despejados nestes ambientes (Moraes e Jordão, 2002).

Em sistemas fluviais, a concentração de metais pesados é geralmente maior na fração particulada do que na fração dissolvida, embora a partição desses elementos dependa fortemente das características do íon. A importância relativa da fração dissolvida para a carga total transportada em suspensão, em geral, aumenta com o incremento da concentração total de metais pesados, particularmente em rios contaminados por efluentes industriais (Foster e Charlesworth, 1996).

Nos rios brasileiros, a carga em suspensão é bem maior que a carga dissolvida, sobretudo nos meses da estação chuvosa, como pôde ser evidenciado nas medições realizadas no RPS no município de Barra do Piraí, onde o rio transportava 43 g/m^3 de material dissolvido contra 550 g/m^3 de material particulado em suspensão na estação seca: e 10 g/m^3 de material dissolvido e 1200 g/m^3 de particulado na estação chuvosa (Gonçalves, 2003a *apud* Christofolletti, 1981).

Outros estudos feitos na região do baixo Paraíba indicaram uma sazonalidade nas concentrações de metais pesados nas frações dissolvidas e particuladas, onde concentrações mais elevadas para as frações dissolvidas foram encontradas na estação seca. Uma relação direta entre estas concentrações com a concentração de carbono também foi estabelecida, indicando ser a matéria orgânica um importante fator na dinâmica dos metais pesados na referida região de estudo (Salomão, 1999).

Gonçalves (2003a) verificou que existe diferença na concentração de metais pesados (Al, Mn, Fe, Cd, Cr, Cu e Pb) nas frações dissolvida e particulada no RPS. Cerca de 99% das concentrações desses metais estiveram associados à fração particulada. Foi possível observar também algumas variações temporais em relação aos dois períodos de vazão fluvial (alta/chuvosa e baixa/seca), bem como o fluxo destes metais nas referidas frações. Cr, Cd e Pb apresentaram uma

distribuição sazonal, com concentrações médias mais elevadas no período de baixa vazão do rio. Al, Fe e Mn tiveram suas concentrações aumentadas no período chuvoso. Durante a vazão alta as concentrações de Cr, Cd e Pb no particulado estiveram abaixo do limite de detecção médio utilizado no estudo.

Hg, Pb, Cd e Cr são os metais pesados poluentes que apresentam maiores riscos ambientais em razão de seu uso intenso, toxicidade e ampla distribuição (Baird, 2002). Como discutido anteriormente, a especiação desses elementos é de extrema importância, pois irá determinar o grau de toxicidade de cada elemento no meio onde eles se encontram presentes. De maneira geral, eles são indiscriminadamente absorvidos pelas plantas e podem promover uma série de danos ao seu funcionamento (Koricheva *et al.*, 1997).

1.1.3 - Mecanismos de tolerância a metais pesados em plantas

Para sobreviverem em ambientes poluídos, as plantas desenvolveram algumas estratégias cuja função primordial é combater o estresse oxidativo causado pela presença de metais pesados, evitando e/ou minimizando os possíveis danos. De forma geral, o princípio de tolerância das plantas a metais pesados consiste em passivar tais elementos, isto é, torná-los menos ou não reativos.

Metais pesados são absorvidos e acumulados principalmente nas raízes. Esta é uma das várias estratégias de defesa contra a toxicidade destes elementos químicos, uma vez que raízes e microrganismos da rizosfera podem diminuir a biodisponibilidade dos metais tanto para o ambiente quanto para a própria planta (Mench *et al.*, 1994). Adicionalmente, os processos que determinam a absorção e o acúmulo de metais variam com a espécie vegetal e com o ambiente químico onde ela se encontra.

Alguns mecanismos de detoxificação, a nível celular, podem ser distinguidos: exclusão do metal; compartimentalização ou translocação, em geral para o vacúolo, de complexos solúveis envolvendo o metal pesado e moléculas biorgânicas. Tais mecanismos diminuem a quantidade de metal que seria

translocada para a parte aérea, conseqüentemente, amenizando os danos provocados a biossíntese da clorofila e a fotossíntese (Vögeli-Lange e Wagner, 1990; Chaoui *et al.*, 1997; Prasad, 1995).

Além destes, outros mecanismos de detoxificação utilizados pelas plantas como defesa à ambientes poluídos por metais pesados são a complexação no citoplasma (com ácidos orgânicos, fitoquelantes ou outros peptídeos), ativação e/ou produção de uma série de enzimas antioxidantes que podem se ligar aos metais pesados, diminuindo assim, os efeitos citotóxicos destes (Vitória *et al.*, 2001) e a ligação de metais às paredes das células. Esta ligação é mais facilmente promovida quando não há competição entre alguns metais quimicamente semelhantes pelos mesmos sítios de troca de íons nas paredes celulares (Krämer *et al.*, 2000). De modo geral, a imobilização de metais pesados pelas plantas se deve principalmente a sua complexação, compartimentalização e ligação com as paredes celulares, principalmente, no sistema radicular (Speiser *et al.*, 1992).

Desta forma, a capacidade de algumas plantas resistirem à ambientes poluídos por metais pesados, é, muitas vezes, aproveitada para removê-los do próprio ambiente. Tal característica faz dessas plantas excelentes alternativas para o monitoramento de poluição por metais pesados do meio circundante (Lacerda *et al.*, 1985).

Várias espécies vegetais, principalmente macrófitas submersas, vêm sendo utilizadas em diversos estudos como bioindicadoras da contaminação por metais pesados por causa de sua abundância relativa e da grande biomassa produzida (Schneider *et al.*, 1995; Mazen e El Maghraby, 1998; Mohanty *et al.*, 2006). Essas espécies possuem a capacidade de acumular metais não essenciais, como Cr, em concentrações que não comprometem o seu metabolismo.

1.1.4 - Cr e estresse em plantas

Cr (do grego *chrôma* = cor) é o vigésimo primeiro elemento mais abundante em peso (122 ppm) na crosta terrestre. Possui número e massa atômica equivalente a 24 e 52 unidades de massa atômicas, respectivamente. À

temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido. À baixas temperaturas é inerte por ser revestido por uma fina camada de óxido. Contudo, em elevadas temperaturas é oxidado a Cr_2O_3 (Gonçalves, 2003b).

O Cr é um importante contaminante ambiental liberado em corpos aquáticos devido ao seu enorme uso industrial. O único minério de Cr de importância comercial é a cromita (FeCr_2O_4). Alguns de seus subprodutos são empregados principalmente em metalurgia para aumentar a resistência à corrosão e para compor ligas metálicas, como por exemplo, o aço inoxidável, que possui cerca de 8% de Cr. Esse metal é ainda utilizado em indústrias de eletrodeposição. Nas formas de óxidos e cromatos é bastante utilizado como catalisadores na produção de amoníaco (NH_3), na preservação de madeira, em corantes e pinturas, e nas formas de sais, como mordentes. Misturas contendo H_2SO_4 e Cr (misturas sulfocrômicas) são usadas para a limpeza de vidrarias em laboratório. Outros compostos à base de Cr podem ser empregados como material refratário pelo seu alto ponto de fusão e pequeno coeficiente de dilatação térmica (Gonçalves, 2003b). No curtimento de couros é freqüente empregar compostos contendo Cr, principalmente o hidroxissulfato de cromo III [$\text{Cr}(\text{OH})(\text{SO}_4)$] (Jordão *et al.*, 1999).

O Cr existe na natureza em dois estados de oxidação: hexavalente (Cr^{6+}) e trivalente (Cr^{3+}). Ambos diferem entre si em termos de mobilidade, biodisponibilidade, capacidade de oxidação e toxicidade. Existem ainda alguns poucos compostos de Cr^{2+} e Cr^{5+} , entretanto, estes são instáveis e se convertem à compostos de Cr^{3+} e Cr^{6+} . A espécie hexavalente é fortemente oxidante e mais tóxica que a trivalente uma vez que forma cromato e dicromato, que são compostos altamente solúveis em água e encontram-se mais disponíveis para o meio ambiente. Por outro lado, Cr^{3+} é menos solúvel em água e, portanto, mais estável e menos tóxico que Cr^{6+} , sendo requerido em quantidades na nutrição de animais (Lytle *et al.*, 1998). Entretanto, ambas as formas têm a capacidade de formar complexos com outras espécies (Bartlett, 1991) podendo alcançar níveis variáveis de toxicidade.

Independente de a forma trivalente ser a predominante nos efluentes industriais, reações químicas naturais de oxidação de Cr^{3+} à Cr^{6+} podem ser favorecidas por algumas características do corpo d' água receptor (pH, concentração de O_2 dissolvido e a concentração do próprio metal), colocando em risco todas as espécies vivas que utilizam estas águas, inclusive o homem. Embora a forma hexavalente, em geral, apresente-se em menores concentrações, a possibilidade de despejos de compostos de Cr contendo a forma trivalente deve ser considerada, uma vez que, mesmo não sendo tão nociva, pode causar efeitos maléficos em elevadas concentrações.

A forma hexavalente de Cr é um estado de oxidação tóxico biologicamente, não existindo evidências indicando que esta desempenhe algum tipo de função ou participação em rotas metabólicas em plantas. Tal espécie química é conhecida por sua intensa ação mutagênica e carcinogênica, e embora o mecanismo citotóxico deste elemento ainda não esteja completamente entendido, alguns estudos revelam que ela possa induzir o estresse oxidativo, danos ao DNA e alterar a expressão gênica (Bagchi *et al.*, 2002; Panda e Choudhury, 2005).

Quantidades traço de Cr são necessárias na dieta dos mamíferos. O Cr^{3+} e a insulina estão envolvidos na manutenção do nível adequado de glicose no sangue. Em casos de deficiência desta espécie, a velocidade de remoção da glicose do sangue é a metade da velocidade normal. Alguns casos de diabetes podem decorrer de problemas no metabolismo de Cr. Porém, o aspecto biomédico mais preocupante em relação aos sais de Cr (cromatos e dicromatos) é o caráter cancerígeno dos mesmos, quando ingeridos ou em contato com a pele, em quantidades relativamente (Lee, 1999).

Em vegetais, o Cr tende a se acumular nas raízes, entretanto, o estresse oxidativo induzido por este envolve peroxidação de lipídeos, causando danos severos às membranas celulares de toda a planta. Outra alteração é a degradação de pigmentos fotossintéticos, levando à diminuição do crescimento. Em altas concentrações, o Cr pode causar distúrbios a estrutura dos cloroplastos e, conseqüentemente, afetar o processo fotossintético (Panda e Choudhury, 2005).

Contudo, algumas plantas aquáticas podem remover Cr do ambiente, apesar da presença deste metal diminuir sua biomassa (Staves e Knaus, 1985).

Corradi e colaboradores (1993) trataram plantas e sementes de *Salvia sclarea* L. com concentrações diferentes de Cr hexavalente. A germinação das sementes *in vivo* não foi afetada, porém quando o sistema radicular das plantas permaneceu em contato com as soluções de Cr, o crescimento destas foi inibido, embora a parte aérea tenha se desenvolvido normalmente. Transcorridos 48 h de experimento, os conteúdos de clorofilas e carotenóides foram reduzidos, demonstrando o estresse que o Cr hexavalente pode provocar quando as plantas ficam expostas por tempos relativamente curtos à esta espécie química.

Para estudar as respostas da exposição de Cr⁺⁶ em sementes, raízes e folhas de *Zea mays* L., *Lycopersicon esculentum* e *Brassica oleracea*, principalmente em termos de alterações estruturais, acumulação de Cr no vacúolo, e produção de fitoquelatinas, Toppi e colaboradores (2002) fizeram um tratamento com concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ de Cr⁺⁶. A porcentagem de germinação não diferiu significativamente entre as amostras tratadas e o controle para todas as espécies examinadas. Entretanto, foi verificada uma diminuição no crescimento das raízes e partes aéreas. Através da microscopia eletrônica de transmissão iônica e de raio-X, foram observadas alterações ultraestruturais e a presença de precipitados contendo Cr nos tecidos foliares. Em plantas de *Lycopersicon esculentum* não houve produção de fitoquelatina nas raízes ou nas folhas.

1.1.5 - *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms e estresse ambiental

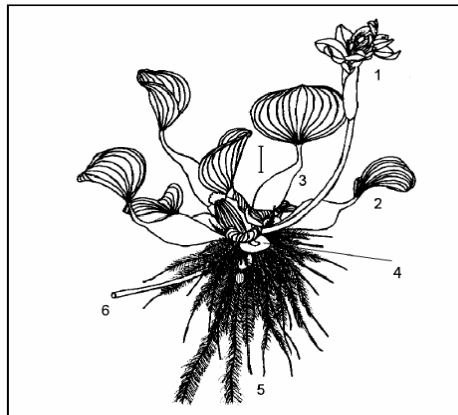
Eichhornia crassipes (Mart.) Solms pertence a família Pontederiaceae. Essa é uma pequena família de ampla distribuição pantropical, sendo composta por 10 gêneros com cerca de 30 espécies, encontradas apenas em ambientes aquáticos, principalmente nas regiões tropicais (Souza e Lorenzi, 2005). Os gêneros mais comuns no Brasil são: *Eichhornia*, *Pontederia* e *Heteranthera*. Kunth, um cientista alemão, foi o primeiro a estabelecer, em 1842, o gênero *Eichhornia*. O nome dado ao gênero foi uma homenagem a Jonh Albert Friedrich Eichhorn, ministro da Educação, Cultura e Saúde da Alemanha na época.

E. crassipes (Mart.) Solms é abundante em rios e em áreas de inundação fluvial, solos argilosos e siltosos férteis. Essa espécie é nativa da América do Sul tropical e foi introduzida em todos os continentes (Gopal, 1987). Dependendo da região encontrada é conhecida por diferentes nomes: camalote ou mururé na Amazônia, baronesa, aguapé ou gigoga na região sudeste, jacinto de água na Espanha e water hyacinth nos EUA.

A planta em questão é muitas vezes apresentada como “praga” e outras vezes como agente despoluidor. Quando a planta é cultivada de forma correta, do ponto de vista técnico-científico, a mesma pode ser um agente de despoluição, como já descrito. Quando, no entanto, a planta cresce de forma descontrolada e sem manejo adequado, pode se transformar em um problema ambiental (Manfrinato, 1991). Um aspecto interessante é que em condições climáticas favoráveis (calor e luminosidade tropicais), a planta cresce na razão de uma tonelada a cada dez mil metros quadrados por dia (Pompêo, 1996).

Segundo Pott e Pott (2000), *E. crassipes* (Mart.) Solms pode ser caracterizada como erva aquática flutuante, livre, estolonífera e perene. Esta espécie possui tanto propagação vegetativa quanto reprodução sexuada. A primeira é usada porque ocorre de forma extremamente rápida favorecendo a dominância da espécie em ambientes onde tenha sido introduzida ou mesmo em áreas onde as condições ambientais passem a favorecer o seu desenvolvimento. Esta forma de desenvolvimento 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 pela maioria dos autores como secundária e só ocorre nas áreas onde a mesma é nativa (Gopal, 1987; Nunes, 2003).

Morfologicamente, a espécie é descrita pela presença de rizoma, pecíolo, limbo foliar, raiz adventícia e estolão. O caule flutuante é rastejante e forma estolões. O pecíolo pode ser ocasionalmente inflado. As flores apresentam pétalas de coloração lilás e ocorrem quase o ano todo (Figuras 1.1a e 1.1b).



a



b

Figura 1.1- a) Estruturas de *E. crassipes* (Mart.) Solms, 1- flor, 2- limbo foliar, 3- pecíolo, 4- rizoma, 5- raiz e 6- estolão. b) Foto de um banco de *E. crassipes* (Mart.) Solms mostrando os limbos foliares e as flores.

Uma importante utilização da *E. crassipes* (Mart.) Solms, dentre suas características já apresentadas, como, sua resistência à ambientes poluídos, é como “agente purificador” em hidroponia - cultivo de vegetais em água sem solo onde as raízes das plantas ficam submersas e as partes aéreas acima do nível da água. As raízes absorvem nutrientes da água, o que facilita a purificação desta, melhorando a qualidade dos efluentes onde são colocadas (Branco *et al.*, 1985).

E. crassipes (Mart.) Solms também é utilizada para retirar do meio circundante metais pesados, fenóis e outras substâncias. A eficiência da remoção

é determinada, principalmente, por parâmetros físico-químicos do meio como o pH. O pH do meio está relacionado diretamente com a disponibilidade de nutrientes para as plantas, influenciando uma série de reações, definindo mecanismos de sorção e alterando o equilíbrio químico (Forstner e Wittman, 1981).

Em estudos sobre absorção de metais pesados provenientes de rejeitos de indústrias químicas, Schneider e colaboradores (1995) utilizaram a biomassa seca de plantas de *E. crassipes* (Mart.) Solms e verificaram que as raízes foram excelentes órgãos acumuladores de íons de metais em solução e, portanto, tais plantas poderiam ser utilizadas como agentes biosorvedores de baixo custo na remoção destes elementos químicos.

Através da técnica de espectrometria de massa indutivamente acoplada a um plasma (ICP-MS), Mangabeira e colaboradores (2004) determinaram as concentrações de Cr em água, no sedimento e em amostras de raízes de plantas de *E. crassipes* (Mart.) Solms coletados no rio Cachoeira no Estado da Bahia. Os resultados obtidos mostraram que o Cr está presente em altas concentrações principalmente nas raízes (média de $70 \mu\text{g.g}^{-1}$) e que tal espécie é uma bioindicadora de poluição. Os valores de Cr na água e no sedimento foram de $0,38 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $63 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

Mohanty e colaboradores (2006) utilizando soluções de amostras de biomassa dessa mesma espécie de planta como biosorvente, demonstraram a porcentagem de remoção de uma concentração definida de Cr^{6+} como uma função do pH. Os resultados obtidos revelaram que quanto menor o valor de pH (soluções ácidas), maior é a eficiência da remoção do metal pela planta.

Com o objetivo de entender a absorção quantitativa e o acúmulo de Cr pela *E. crassipes* (Mart.) Solms e pela *Pistia stratiotes* L., Satyakala e Jamil (1992) submeteram-nas em concentrações de 20, 50 e $100 \mu\text{M}$ de uma solução de cromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Após o tratamento, as plantas foram separadas em folhas, pecíolos e raízes. A quantificação de Cr foi feita em espectroscopia de absorção atômica. Os resultados revelaram que houve um aumento linear da

absorção de Cr com o aumento das concentrações. A ordem de acumulação do metal foi: raiz > pecíolo > folha para as amostras de *E. crassipes* (Mart.) Solms, e raiz > folha > pecíolo para *Pistia stratiotes* L.

A redução de metais pesados *in situ* pelas plantas pode ser um mecanismo de detoxificação útil para as mesmas. Utilizando espectroscopia de raio-X, Lytle e colaboradores (1998) mostraram que *E. crassipes* (Mart.) Solms cultivada em soluções contendo Cr^{6+} acumularam Cr^{3+} nas raízes. A redução de Cr^{6+} à Cr^{3+} parece ocorrer no sistema radicular da planta. O Cr^{3+} foi translocado para as folhas complexados a cristais de oxalato de cálcio. Desta forma, diferentes caminhos de redução de Cr^{6+} podem estar relacionados à mecanismos de reações realizados abioticamente com íons aquosos, por transferência de elétrons em superfícies minerais, redução com substâncias húmicas e outras moléculas orgânicas e/ou por várias enzimas e microorganismos presentes nos próprios tecidos das plantas.

1.2 - JUSTIFICATIVA

Macrófitas habitantes em corpos aquáticos poluídos têm sido amplamente utilizadas para estudos de poluição ambiental por Cr por acumularem este metal em concentrações variáveis nas diferentes partes das plantas. Diversos estudos vêm sendo realizados visando a determinação da concentração de Cr total nestes organismos, entretanto, sem a determinação da concentração da espécie química mais tóxica (Cr^{+6}).

Neste trabalho, plantas de aguapé foram utilizadas para a determinação das concentrações de Cr total e Cr^{+6} em diferentes partes da mesma. A escolha desta espécie de planta é justificada pelo fato da mesma apresentar indivíduos em todas as regiões do RPS (alto, médio e baixo) e rio Imbé (local com menor grau de impacto antrópico em relação às regiões do RPS), o que tornará possível a comparação dos dados entre as diferentes regiões. A determinação das concentrações de Cr^{+6} nesta espécie é de extrema importância, uma vez que tal estado de oxidação é potencialmente tóxico aos organismos vivos expostos a ele.

1.3 - OBJETIVOS

1.3.1 – Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a quantificação de Cr total e Cr⁺⁶ em raízes e partes aéreas de plantas de aguapé coletadas em diferentes locais ao longo do RPS: alto, médio e baixo Paraíba e rio Imbé durante dois anos de coleta.

1.3.2 – Objetivos específicos

- quantificar Cr total e hexavalente nas raízes e nas partes aéreas de amostras de plantas de aguapé;
- comparar os resultados obtidos entre as partes vegetais analisadas;
- inferir o local de maior contaminação por Cr dentre as regiões do RPS estudadas;
- atribuir às concentrações de Cr encontradas as estações do ano em que as plantas foram coletadas.

1.4 - MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 – Material vegetal e pontos de coleta

As análises foram feitas utilizando a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. Foram utilizadas partes aéreas e raízes. As partes aéreas constaram de limbos foliares e pecíolos.

As áreas de trabalho estabelecidas para as coletas do material compreenderam as seguintes regiões (Figura 1.2):

- Alto Paraíba - São José dos Campos (SP) (S: 23° 11' 229"; W: 45° 55' 495");
- Médio Paraíba – Volta Redonda (RJ) (S: 22° 28' 937"; W: 44° 04' 702");
- Baixo Paraíba – Campos dos Goytacazes (RJ) (S: 21° 45' 288"; W: 41° 19' 348");
- Rio Imbé - Campos dos Goytacazes (RJ) (S: 21° 47' 750"; W: 41° 33' 375").

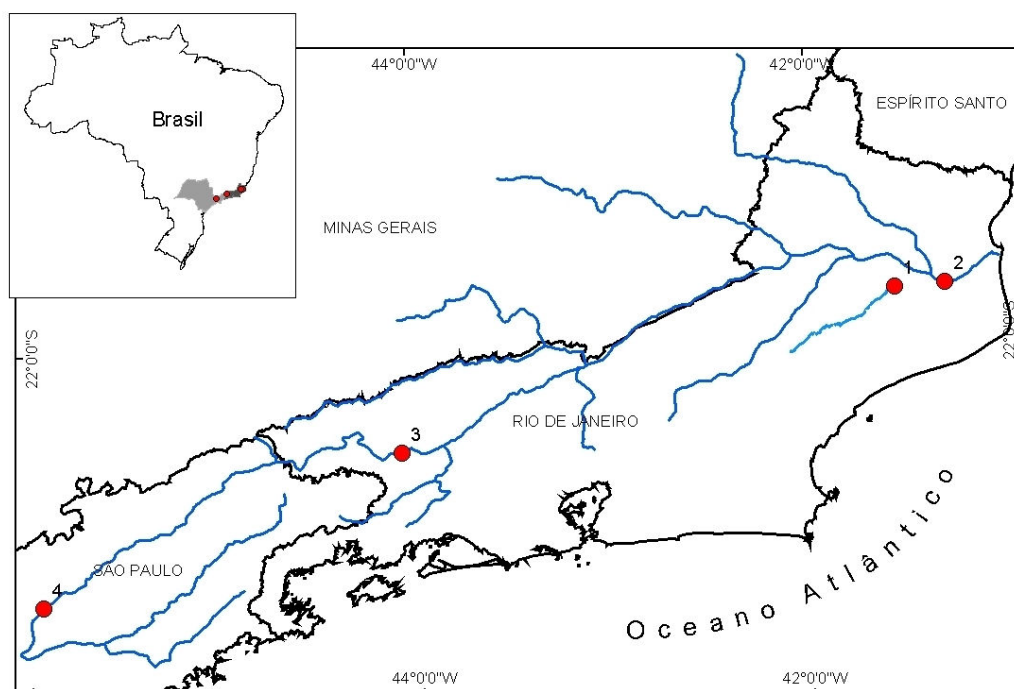


Figura 1.2 - Locais de coleta do material ao longo RPS e do rio Imbé. (1) rio Imbé (“controle”), (2) baixo RPS, (3) médio RPS e (4) alto RPS.

Foram feitas quatro coletas em duas épocas do ano: duas no final da estação seca e duas no final da estação chuvosa nas regiões descritas acima. Os meses e os anos das coletas foram: outubro de 2005 (estação seca), março de 2006 (estação chuvosa), outubro de 2006 e março de 2007.

Os parâmetros físico-químicos, pH, condutividade elétrica, temperaturas da água e atmosférica e oxigênio dissolvido foram determinados no campo durante as coletas das plantas. Tais dados foram extraídos do trabalho de Campaneli (2008) e encontram-se em anexo.

1.4.2 - Preparo da amostras para quantificação de Cr

Após a coleta nos locais anteriormente descritos, as plantas foram levadas para o Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde foram lavadas com água destilada para retirar o material

particulado em suspensão e parasitas que se alojam nas raízes e separadas em parte aérea e raíz. Este material foi congelado para posterior liofilização.

A liofilização de cada amostra durou em média 48h. Após este processo, as amostras completamente desidratadas foram maceradas em nitrogênio líquido (N_2) e, em seguida, acondicionadas em tubos plásticos rosqueáveis.

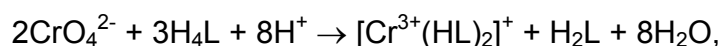
Quinhentos miligramas de cada material vegetal foram acondicionados em bombas de teflon, onde foram adicionados 10mL de ácido fluorídrico 48% e 10 mL de ácido nítrico 65% (em capela). As bombas foram colocadas em blocos digestores por 12h a 150°C. Posteriormente as bombas foram abertas para que a solução 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 (\varnothing 12,50 \pm 0,10 cm) faixa branca, 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). Para a quantificação de Cr^{+6} foi seguido o método colorimétrico da 1,5 DFC e as leituras feitas utilizando Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (SHIMADZU, UV-160A).

1.4.3 - Método colorimétrico da 1,5 difenilcarbazida (quantificação de Cr^{+6})

Resumidamente, os métodos colorimétricos são baseados na variação da cor de um sistema em função da concentração. A colorimetria visa determinar a concentração de uma substância pela medida da absorção relativa da luz, tomando como referência a absorção da substância numa concentração conhecida. Os métodos colorimétricos acoplados aos métodos fotométricos proporcionam um meio simples para determinar pequenas quantidades de um elemento químico.

O composto 1,5 difenilcarbazida (1,5-DFC) é um reagente altamente seletivo para a determinação espectrofotométrica de Cr^{+6} em meio ácido (pH variando aproximadamente entre 1,6 e 2,2). O Cr hexavalente é determinado colorimetricamente através de sua reação com a difenilcarbazida, formando um complexo de cor vermelho-violeta, com absorção máxima em 540 nm. A reação da 1,5-DFC com o Cr^{+6} é seletiva e ocorre de acordo com a seguinte equação:



onde H_4L representa a 1,5-DFC e H_2L a 1,5 difenilcarbazona (Lima, 1999).

Das amostras preparadas como no item 4.2 foram retirados 5 mL e adicionados 400 μL de solução de 1,5-DFC. Esta por sua vez, foi preparada dissolvendo 0,1 g do composto em 10 mL de acetona em grau analítico e acondicionada em frasco escuro.

As misturas das soluções (amostras + 1,5-DFC) foram feitas 1 h antes do início das leituras em Uv-Vis para garantir a total formação do complexo com Cr^{+6} .

1.1.4 – Análises dos resultados

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar as diferenças entre os dados de quantificação de Cr total. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados referentes a Cr^{+6} foram tratados através de convoluções dos espectros das amostras puras aos espectros das misturas com o auxílio do programa MATLAB (Versão 6.2).

1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 – Quantificação de Cr total

A tabela 1.1 mostra os valores das concentrações de Cr total nas amostras de partes aéreas e raízes das plantas do rio Imbé e das três regiões (Alto, Médio e Baixo) do RPS para as quatro coletas realizadas durante os dois anos de estudo.

Os resultados mostram que as concentrações de Cr total nas raízes foram sempre superiores à parte aérea. As concentrações de Cr total variaram entre o limite mínimo de detecção da metodologia empregada ($0,07 \mu\text{g.g}^{-1}$) à $106,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca do vegetal. Nas partes aéreas, não foi detectado Cr para a maior parte das amostras, sendo $2,67 \mu\text{g.g}^{-1}$ o maior valor encontrado.

Para a maioria das amostras não foi possível estabelecer um padrão sazonal de concentração do metal pesado estudado, exceto as provenientes do Baixo RPS, onde as mesmas foram maiores na estação seca. Em geral, as maiores concentrações de Cr foram encontradas no Médio e Baixo RPS.

Para as amostras do rio Imbé, Baixo e Médio RPS, os resultados estatísticos quanto à sazonalidade do primeiro ano de coleta tenderam a se repetir no segundo ano. As amostras do alto RPS não apresentaram um padrão de sazonalidade na bioacumulação de Cr e seus resultados não se repetiram durante os anos de coleta.

Macrófitas como aguapés são consideradas importantes componentes de ecossistemas aquáticos não apenas como fonte de alimento para invertebrados, mas, sobretudo como agentes acumuladores eficientes de metais pesados (Vardanyan e Ingole, 2006).

Tabela 1.1 - Concentrações de Cr total ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) para plantas de aguapé (partes aéreas e raízes) coletadas do rio Imbé e RPS em 4 coletas durante dois anos.

Partes Vegetais	Locais de coleta	1º Coleta (seca/2005)	2º Coleta (chuvosa/2006)	3º Coleta (seca/2006)	4º Coleta (chuvosa/2007)
Aérea	rio Imbé	1,42 ± 0,23 AbY	< 0,07 AcY	1,64 ± 0,25 AaY	< 0,07 AaY
	Baixo RPS	0,49 ± 0,29 AcY	0,09 ± 0,09 AbY	< 0,07 AcY	< 0,07 AbY
	Médio RPS	1,30 ± 1,30 AcY	< 0,07 AcY	0,80 ± 0,80 AcY	< 0,07 AcY
	Alto RPS	< 0,07 AbY	< 0,07 AcY	< 0,07 AbY	< 0,07 AcY
	rio Imbé	11,9 ± 0,53 CaY	10,0 ± 0,48 BaY	4,25 ± 2,00 DaY	3,78 ± 2,00 DaY
	Baixo RPS	45,9 ± 1,58 BaY	9,00 ± 0,40 BaZ	30,3 ± 1,25 BaY	11,6 ± 0,97 CaZ
	Médio RPS	106 ± 2,31 AaY	17,0 ± 1,12 AbZ	58,0 ± 1,00 AaY	31,4 ± 2,00 AaZ
	Alto RPS	10,9 ± 1,10 CaY	7,00 ± 0,80 BaY	13,8 ± 0,60 CaZ	18,6 ± 0,42 BaY

Os resultados são médias de três replicatas \pm o desvio padrão. Letras maiúsculas comparam a mesma estação do ano entre os diferentes pontos de coleta. Letras minúsculas, as partes da planta na mesma estação do ano e local de coleta. Y e z representam a comparação entre as estações do ano para um mesmo local de coleta (Análise estatística, Tukey, $p \leq 0,05$).

A capacidade de acumulação de Cr em aguapé provenientes do rio Cachoeira (Brasil), ambiente intensamente afetado por atividades agroindustriais, foi de $70 \mu\text{g.g}^{-1}$ no tecido radicular das mesmas (Mangabeira *et al.*, 2004). Aqui nesse estudo, o maior valor encontrado ($106 \mu\text{g.g}^{-1}$), também no sistema radicular das plantas, se referiu a uma região (Médio RPS) de alta capacidade industrial, especificamente a indústria de aço, a qual o Cr faz parte da composição dos efluentes desse tipo de indústria. Tal resultado pôde apontar a contaminação desta região por Cr no ano de 2005.

De acordo com os resultados encontrados nas raízes das plantas das regiões do RPS (exceto a do Alto) e rio Imbé foi possível estabelecer uma variação sazonal para as concentrações de Cr, isto é, maiores nas estações secas e menores nas chuvosas. O aumento da disposição de MPS e a retenção de metais pesados durante o período de baixa vazão fluvial possibilitam maior ciclagem dos metais entre os compartimentos do ecossistema (Campaneli, 2008), o que pode explicar as maiores concentrações de Cr nas regiões do Médio e Baixo RPS na estação seca. Nas partes aéreas, entretanto, esta variação não pôde ser estabelecida, uma vez que os resultados não diferiram entre as estações.

1.5.2 - Quantificação de Cr⁺⁶

As amostras provenientes do RPS e rio Imbé apresentaram altos valores de Fe (Tabela 8 em Anexo). Tais valores não permitiram que as quantificações de Cr⁺⁶ nas mesmas pudessem ser realizadas, uma vez que Fe é o principal interferente nas medidas de Cr⁺⁶.

O método colorimétrico da 1,5-DFC é bastante utilizado para determinação de Cr⁺⁶ em diferentes amostras, principalmente amostras de efluentes. Em materiais biológicos, porém, a utilização deste método é bastante restrita devido à complexidade dos mesmos e da presença de interferentes que fazem parte da composição do próprio material e que podem ser encontrados em altas quantidades devido a atividades antrópicas ou não, como é o caso dos íons de Fe⁺³ (Milacic *et al.*, 1992; Walsh e O'Halloran, 1996; Jung *et al.*, 1997).

No Capítulo 2 deste trabalho (descrito a seguir) é apresentado um procedimento realizado com o intuito de se determinar o limite inferior de detecção de Cr⁺⁶ na presença de Fe⁺³ através de espectrometria no Uv-Visível e, assim, podermos inferir a possibilidade de quantificar Cr⁺⁶ nestas amostras.

1.6 – CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada foi possível determinar a concentração de Cr total nas amostras analisadas. A região do Médio RPS, município de Volta Redonda encontra-se contaminada por Cr, uma vez que teores significativos deste metal foram encontrados nas raízes das plantas, sobretudo na estação seca (ano de 2005). Entretanto, para a obtenção dos resultados da quantificação de Cr^{+6} nas mesmas amostras esbarrou-se nos altos teores de Fe encontrados e no limite de detecção da metodologia empregada. A metodologia utilizada na determinação de Cr^{+6} deve ser otimizada no sentido de ser aplicada a sistemas biológicos mais complexos como é o caso do aguapé.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DO LIMITE INFERIOR DE DETECÇÃO DE Cr⁺⁶ NA PRESENÇA DE Fe⁺³ USANDO A ESPECTROMETRIA NO UV-VISÍVEL

2.1 - INTRODUÇÃO

A presença de metais pesados em sistemas aquáticos se deve a diversos fatores de origem natural e antrópica, como discutido no Capítulo 1.

É importante ressaltar que elevadas concentrações de metais pesados podem ser naturalmente encontradas em diversos rios do mundo a depender de fatores como o clima, a geologia do local, a vegetação, regime de pluviosidade, entres outros. Esses processos contribuem significativamente para a inserção de metais, sobretudo ferro, alumínio e manganês, nos sistemas hídricos, uma vez que estes fazem parte da composição da maioria dos solos que, ao sofrerem intemperismo, podem ser facilmente lixivados e depositados nessas águas (Fösterner e Wittmann, 1983).

As concentrações de metais pesados são ainda regidas por características físico-químicas do meio, principalmente, pH, oxigênio dissolvido e temperatura. De forma que esses metais podem se apresentar em suas formas livres e, portanto, mais disponíveis para serem absorvidos pelas espécies animais e vegetais relacionadas ao próprio meio.

2.1.1 - Presença de ferro no rio Paraíba do Sul e rio Imbé

O Ferro (Fe), do latim *ferrum*, é o quarto elemento em abundância na Terra, representando 6,3% em peso da crosta terrestre. Possui massa e número atômicos equivalentes a 55,84 e 26 respectivamente (Gonçalves, 2003b). Tal elemento é considerado metal pesado por apresentar características referentes a este grupo de elementos químicos, como alta densidade (7,86 g.mL⁻¹), por exemplo. Entretanto, por ser necessário ao metabolismo adequado de organismos

vivos em pequenas concentrações, é dito como essencial ou elemento micronutriente.

O Fe faz parte da composição de enzimas envolvidas em processos de oxiredução. Sua deficiência em vegetais causa sérios distúrbios à organização de cloroplastos, eleva a síntese de ácidos orgânicos, afetando, conseqüentemente, a fotossíntese (Marschner e Romheld, 1994). Já o seu excesso, pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio via reação de Fenton (conversão de peróxido de hidrogênio em radical hidroxila - $\cdot\text{OH}$, superóxido - $\cdot\text{O}_2^-$ e hidroperóxido - $\cdot\text{O}_2\text{H}$, pela oxidação do Fe^{+2}). Os principais componentes celulares suscetíveis a danos por estas espécies químicas são proteínas, DNA, carboidratos e lipídios (Mithöfer *et al.*, 2004).

A absorção de Fe por organismos como plantas aquáticas, por exemplo, pode ser favorecida pela presença de elevadas concentrações deste elemento químico no meio onde estas vivem.

Os ecossistemas aquáticos são formados por diferentes compartimentos abióticos (material particulado em suspensão - MPS, sedimento e água) e bióticos (fauna e flora). Entre estes compartimentos, há uma tendência de um maior acúmulo de metais pesados em materiais particulados em suspensão. Em média, nos rios encontra-se cerca de 90% do ferro total associado ao MPS.

O RPS é um sistema hídrico que naturalmente apresenta altas concentrações de Fe. Estudos realizados na porção do Baixo RPS mostraram que a concentração deste elemento está em níveis maiores que a média mundial, porém próxima a de rios localizados em regiões de clima tropical (Salomão *et al.*, 1999).

Nas regiões do RPS, entretanto, o Fe está em sua maior parte na fase residual, ou seja, de 83 à 99% do total de Fe é encontrado no sedimento, mostrando que os solos da bacia de drenagem do RPS são ricos em minerais compostos por Fe (Almeida, 1998; Molisani, 1999; Pereira, 2004).

Maiores concentrações de Fe foram encontradas nos sedimentos da região do Baixo RPS, seguidas pela do Médio nos períodos de seca que na estação

chuvosa. Amostras de sedimentos provenientes da região do Alto RPS foram as que apresentaram menores concentrações de Fe, tanto na estação chuvosa quanto na seca, quando comparadas às demais regiões do RPS e rio Imbé (Campaneli, 2008).

Nas plantas de aguapé coletadas no Alto, Médio e Baixo RPS e no rio Imbé, os valores de Fe foram sempre maiores para as raízes das plantas provenientes da região do Baixo, seguidas pela região do Médio RPS, rio Imbé e Alto RPS considerando a estação seca. Na estação chuvosa, as concentrações de Fe seguiram a mesma tendência, com exceção para as maiores concentrações encontradas no rio Imbé em relação ao Alto RPS (Campaneli, 2008).

2.2 - JUSTIFICATIVA

Fe^{+3} é um dos principais interferentes na detecção de Cr^{+6} . Em altas concentrações, o Fe^{+3} compete com o composto 1,5-difenilcarbazida, utilizado para quantificação de Cr^{+6} , apresentando uma intensa superposição com as bandas de absorção do complexo Cr-DFC que deveria ser formado.

Estudos utilizando aguapés provenientes das regiões do Alto, Médio e Baixo RPS e rio Imbé durante dois anos de coleta (duas na estação seca e duas na chuvosa) revelaram altas concentrações de Fe nas raízes das referida plantas, sobretudo naquelas coletadas no Baixo RPS coletadas nas estações chuvosas (Campaneli, 2008).

Frente à dificuldade para realização das medidas de Cr^{+6} em plantas de aguapé, foi feito um estudo do limite inferior de detecção para 0.5 ppm de Cr^{+6} na presença de Fe^{+3} em diferentes concentrações, para que, desta forma, fosse estabelecido a proporção em que a espécie química +6 pudesse ser quantificada através de métodos analíticos convencionais, como a espectrometria no Uv-Visível, quando Fe está presente no mesmo meio.

2.3 – OBJETIVOS

2.3.1 – Objetivos Gerais

O objetivo desta etapa de trabalho foi determinar o limite inferior de detecção de 0.5 ppm de Cr^{+6} na presença de soluções de diferentes concentrações de Fe^{+3} utilizando a espectroscopia de absorção no UV-Visível.

2.4 - MATERIAL E MÉTODOS

As soluções de Cr^{+6} foram preparadas a partir de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e as de Fe^{+3} a partir de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada.

A concentração de Cr^{+6} foi fixada em 1 ppm e as de Fe^{+3} variando de 10 a 400 ppm. Como as soluções foram misturadas em proporções equivalentes (1:1), as concentrações finais das soluções eram a metade das iniciais. Estas soluções foram complexadas com 1,5-DFC como descrito no item 1.4.3 (Capítulo 1). Para evitar a possível redução de Cr^{+6} e ao mesmo tempo diminuir a interferência com os íons de Fe^{+3} , HNO_3 e 1,5-DFC foram simultaneamente adicionados as soluções pré-misturadas de Cr^{+6} e Fe^{+3} . Na tabela 2.1 estão representadas as concentrações e os volumes de todos os reagentes utilizados.

As amostras foram lidas em espectrômetro Uv-Visível (UV 160 1PC - SHIMADZU) com os comprimentos de ondas variando de 350 à 750 nm.

Os dados foram tratados através de ajustes dos espectros das amostras puras aos espectros das misturas com o auxílio do programa MATLAB (VERSÃO 6.2).

Tabela 2.1 - Concentrações de Fe^{+3} , Cr^{+6} , reagentes e os volumes utilizados no preparo das amostras.

Reagentes	Concentração (ppm)	Volumes (mL)	
Fe^{+3} ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	10	2,5	
	20	2,5	
	30	2,5	
	40	2,5	
	50	2,5	
	60	2,5	
	80	2,5	
	100	2,5	
	110	2,5	
	120	2,5	
	140	2,5	
	170	2,5	
	200	2,5	
Cr^{+6} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	1	2,5	
	*1,5-DFC	100 000	0,1
	HNO_3	450 000	0,05

* 100 000 ppm ou 1,5-DFC 10%.

2.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2.1 mostra o espectro para uma solução pura de 1 ppm de Cr^{+6} (sem DFC) e com DFC em meio ácido. Tal concentração de Cr^{+6} foi utilizada por ser aquela que apresentou o melhor sinal de absorção, comparado com concentrações menores. Foi ainda levado em consideração que essa concentração de Cr^{+6} seria reduzida a metade quando misturada em mesma proporção às soluções de Fe^{+3} .

Apenas na presença do reagente DFC e em meio ácido pôde ser observada a formação do complexo devido ao sinal da banda de absorção em 540 nm, aproximadamente, indicando a seletividade do composto 1,5-DFC em reagir com Cr^{+6} , como mostra a figura 2.1.

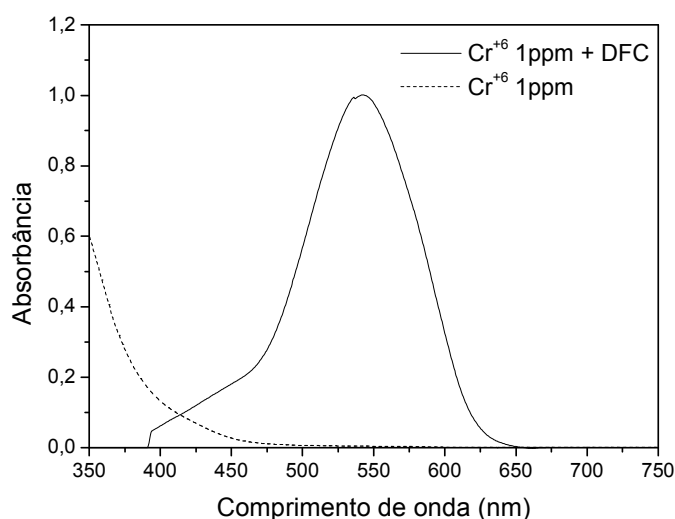


Figura 2.1 – Espectro de absorção de solução de 1 ppm de Cr^{+6} com DFC em meio ácido e sem DFC.

As figuras 2.2 a e 2.2 b mostram os resultados experimentais (curva preta) de uma amostra de 5 e 85 ppm de Fe^{+3} , respectivamente, em solução com 0,5 ppm de Cr^{+6} , DFC e meio ácido. As curvas verde e azul representam, respectivamente, os espectros experimentais para as soluções de Fe^{+3} e Cr^{+6} na faixa de 400 à 700 nm.. A curva vermelha representa o ajuste dos espectros das

soluções puras de Cr^{+6} e Fe^{+3} ao espectro experimental da mistura, considerando vários ajustes feitos através do Método dos Mínimos Quadrados.

O aumento da concentração de Fe^{+3} na mistura mascarou a contribuição do sinal referente ao Cr^{+6} no espectro resultante possível.

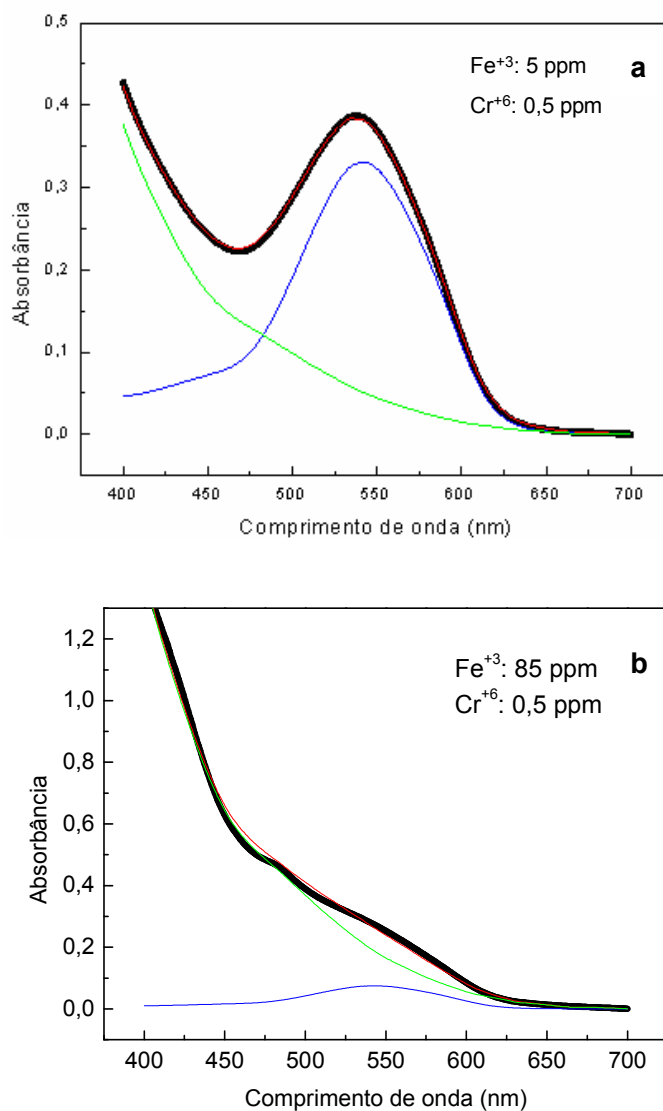


Figura 2.2 - Ajustes dos espectros de Cr^{+6} e de Fe^{+3} ao espectro experimental obtido das misturas das soluções desses metais em meio ácido contendo DFC. a) 0,5 ppm de Cr^{+6} + 5 ppm de Fe^{+3} e b) 0,5 ppm de Cr^{+6} + 85 ppm Fe^{+3} . OBS: As concentrações são referentes à mistura, ou seja metades das concentrações originais.

Com a finalidade de estimar a influência da presença de Fe^{+3} na solução, a área abaixo da banda de absorção do complexo Cr^{+6} -DFC foi calculada e dividida pela área total do espectro. Utilizando o mesmo procedimento para as demais misturas, foi obtido o comportamento linear da área relativa para o Cr^{+6} (figura 2.3).

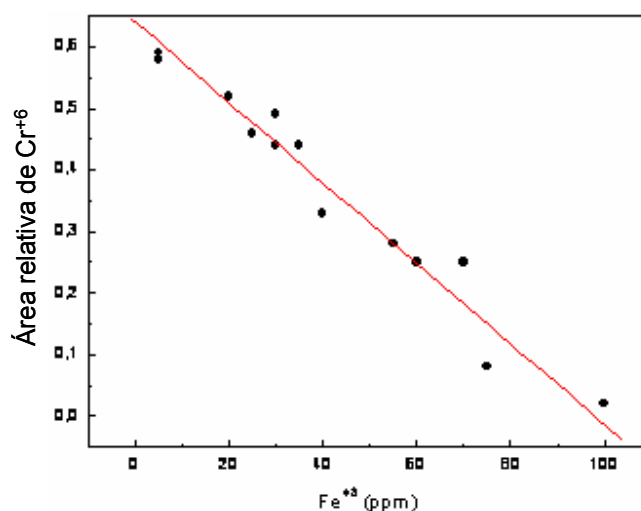


Figura 2.3 - Áreas relativa referente à banda de absorção do Cr^{+6} em função da concentração de Fe^{+3} (ppm). As soluções de Cr^{+6} e Fe^{+3} foram preparadas em meio ácido adicionando DFC. As concentrações de Fe^{+3} mostradas são a metades das originais.

A área relativa do complexo de Cr^{+6} diminuiu com o aumento da concentração de Fe^{+3} , indicando que esta espécie compete com o Cr^{+6} para a formação do complexo com a 1,5-DFC. Os resultados mostram também que a detecção de Cr^{+6} (0,5 ppm) torna-se inviável quando presente em concentrações de Fe^{+3} acima de 85 ppm. Através desses resultados, pôde ser estabelecida uma proporção $\text{Fe}^{+3}:\text{Cr}^{+6}$ de 170:1. Isto é, acima de 170 partes de Fe^{+3} para 1 parte de Cr^{+6} não é possível quantificar Cr^{+6} utilizando espectroscopia UV-Visível.

Os efeitos da presença de íons de metais interferentes tais como o Fe^{+3} na determinação de Cr^{+6} são bem conhecidos (Sikove *et al.*, 1996). Em nosso trabalho, tanto para as amostras provenientes do RPS quanto para as do rio Imbé, não foi possível obter resultados de quantificação de Cr^{+6} (como descrito no

Capítulo 1), uma vez que as mesmas amostras continham altas quantidades de Fe maiores que a razão 170:1. As concentrações de Fe total determinadas por Campaneli (2008) estão representadas em anexo.

Tomando a maior concentração de Cr total encontrada em nosso trabalho, aquela referente às raízes das plantas provenientes da região do Médio RPS (Tabela 1.1), $106 \pm 2,31 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca e a concentração de Fe total para a mesma amostra ($19901 \pm 679 \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) descrita por Campaneli (2008), a razão Fe/Cr obtida é de 188, ou seja, superior ao limite de detecção inferior de Cr^{+6} na presença de Fe^{+3} estabelecido anteriormente. É importante ressaltar que a razão Fe/Cr não se trata somente das espécies catiônicas Fe^{+3} e Cr^{+6} presentes em solução, sendo uma contribuição destas aos valores das concentrações totais de cada elemento analisado. Logo, as concentrações de cada espécie química devem ser menores e encontravam-se abaixo do limite de detecção do equipamento utilizado ($\text{LD} = 0,055 \mu\text{g.g}^{-1}$).

2.6 – CONCLUSÕES

Cromo hexavalente (0,5 ppm) pôde ser detectado quando as concentrações de Fe^{+3} foram iguais ou inferiores à 85 ppm. Desta forma, utilizando espectroscopia de absorção UV-Visível, o limite inferior de detecção de Cr^{+6} na presença de Fe^{+3} estabelecido foi de 170 partes de Fe^{+3} para 1 parte de Cr^{+6} .

Com a perspectiva de se quantificar Cr^{+6} foi conduzido um experimento em casa de vegetação utilizando altas concentrações de tal íon metálico, descrito no capítulo a seguir (Capítulo 3).

CAPÍTULO 3

ANÁLISES ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE AGUAPÉ SUBMETIDAS A Cr^{+3} e Cr^{+6}

3.1 – INTRODUÇÃO

O termo ecofisiologia designa a relação dos processos fisiológicos e das respostas vitais das plantas diante de mudanças que ocorrem no meio onde estas habitam (Davidson *et al.*, 2002). O grande avanço tecnológico em relação ao aperfeiçoamento e ao desenvolvimento de equipamentos cada mais eficazes para medições de parâmetros ecofisiológicos aliados à interdisciplinaridade das ciências de química, física e biologia têm permitido identificar e elucidar diversos agentes estressantes aos quais uma espécie vegetal pode estar sujeita.

Análises da emissão da fluorescência da clorofila *a*, medidas de trocas gasosas e quantificação de pigmentos fotossintéticos constituem importantes ferramentas para estudos ecofisiológicos em plantas submetidas a estresse, inclusive, por metais pesados. Tais parâmetros vêm sendo largamente usados por oferecerem vantagens como a rápida obtenção de resultados e alta sensibilidade, além de serem métodos quantitativos, permitindo a realização das medições tanto em laboratório, quanto no campo (Van Kooten e Snel, 1990).

3.1.1- Emissão da fluorescência da Clorofila *a*

As moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (fótons) e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas de um estado basal para um estado de mais alta energia (*singlet 1*) muito instável e de vida curta (aproximadamente de 8 à 10 nanosegundos). Essas moléculas tendem a dissipar a energia recebida por meio de algumas vias como:

- Dissipação Fotoquímica: utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese (doação do elétron proveniente da molécula de água para um aceptor oxidado denominado NADP^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxidado);

- Dissipação Não-Fotoquímica: produção de calor na forma de radiação infravermelha;
- Fluorescência: emissão de radiação na região do visível (vermelho) (Maxwell e Johnson, 2000).
- Interconversões: transformação de energia entre as moléculas dos pigmentos por ressonância.

O rendimento da fluorescência da clorofila *a* revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons do fotossistema II (PSII) (Bolhàr- Nordenkampf *et al.*, 1989). A presença de elevados níveis de metais pesados na planta pode alterar a eficiência destes processos, e efeitos específicos de um dado metal na fotossíntese variam entre as espécies (Heckathorn *et al.*, 2004).

A fluorescência emitida pelas clorofilas do complexo antena do PSII pode ser dividida em dois componentes constantes e um variável. Os componentes constantes são a fluorescência mínima (F_0), medida quando todos os centros de reação estão abertos e fluorescência máxima (F_m), medida quando todos os centros de reação estão fechados (ambas em folhas adaptadas ao escuro). O componente variável é a fluorescência variável (F_v), a qual é determinada pelo estado do centro de reação (aberto ou fechado), e é definida como a diferença entre F_m e F_0 . Através destes componentes é possível ainda determinar o rendimento quântico do PSII, dado pela razão F_v/F_m , a qual expressa a capacidade do sistema em converter energia luminosa em energia química. Há também parâmetros que medem a dissipação ou extinção da fluorescência: q_P (extinção fotoquímica) e q_N e NPQ (extinção não-fotoquímica) (Van Kooten e Snel, 1990).

As variáveis acima descritas podem ser medidas utilizando-se técnicas de fluorescência modulada. Tais técnicas fornecem informações dos transientes que ocorrem na escala de segundos, consistindo em aplicar um feixe de luz modulada de baixa intensidade para excitar as moléculas de clorofila. A fluorescência

induzida por esta luz é seletivamente detectada através de um sistema de detecção por resolução de fase. A fluorescência detectada quando somente a luz modulada de baixa intensidade é aplicada, corresponde a F_0 . Para determinar F_m , aplica-se um pulso de luz de alta intensidade, ou seja, um pulso de luz saturante, de forma que todos os centros de reação sejam fechados.

Os efeitos sobre as respostas de fluorescência da clorofila *a* foram investigados para plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a tratamentos com Cd (0, 265, 530 e 1000 μM) durante sete dias. As plantas tratadas com 1000 μM de Cd apresentaram uma diminuição de 35 e 7%, para F_0 e F_v/F_m , respectivamente, em relação as plantas do controle. F_m e F_v diminuíram (16 e 19%, respectivamente) para as plantas expostas a 265 μM de Cd. Essa diminuição foi mais significativa (de 50% para F_m e 53% para F_v) para as plantas expostas a 1 mM de Cd ao final do experimento (Ouzounidou *et al.*, 1996).

Visando determinar a utilidade de algas no monitoramento de Cd e Cu dissolvidos na água do mar, e o estresse fisiológico causado por ambos os metais, Barraza e Carballeira (1999) cultivaram algas (*Ulva rigida*) em solução de 0; 0,3; 0,9 e 2,7 mg L^{-1} dos metais durante doze dias. Leituras de fluorescência da clorofila *a* foram tomadas nos dias 1, 2, 5, 9 e 12 de tratamento. As amostras expostas a concentrações de Cd e Cu acima de 0,3 mg L^{-1} mostraram distúrbios no PS II, evidenciado pela diminuição de F_v/F_m quando comparados aos controles, sobretudo para Cu após o segundo dia de tratamento. Para as plantas expostas a Cd, após nove dias de tratamentos, os efeitos sobre F_v/F_m puderam ser observados.

Os efeitos da toxicidade de Cu, Cd e Pb sobre os parâmetros de fluorescência em folhas de pepino (*Cucumis sativus* L.) foram estudados utilizando concentrações de 20 μM de Cu, 20 e 50 μM de Cd, e 1000 μM de Pb. Cd foi transportado para as folhas muito mais que Cu e Pb, independente das concentrações. Porém os efeitos destes metais no rendimento quântico do PS II

(Fv/Fm) foram insignificantes durante o período de dez dias de tratamento (Burzyński e Klobus, 2004).

3.1.2 – Trocas Gasosas

A presença de poluentes como metais pesados tóxicos em altas concentrações, e de fatores como excesso de luz, alta temperatura e transpiração podem levar a redução do rendimento quântico da fotossíntese e, por sua vez, reduzir a assimilação de CO₂ por interferir na condutância estomática, afetando o metabolismo da planta (Elfadl e Luukkanen, 2006).

Mecanismos de trocas gasosas dizem respeito à assimilação de CO₂, a processos de evaporação-transpiração, à condutância estomática e ao déficit ou o excesso de carbono na câmara sub-estomática, uma vez que a água e o CO₂ compartilham a mesma rota de difusão (células estomáticas). Desta forma, é necessário manter um equilíbrio entre assimilação de carbono e transpiração. Sob algum tipo de estresse a taxa de assimilação de CO₂ declina em função da redução na condutância estomática (Wong *et al.*, 1985; Mattos *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2004).

Medidas de parâmetros de troca gasosa constituem alternativas eficientes para inferir danos ao processo fotossintético de plantas sob condições adversas de crescimento.

Para estudar as respostas fisiológicas de *Lemna trisulca* L., uma macrófita aquática conhecida por acumular e bioconcentrar metais pesados, Prasad e colaboradores (2001) submeteram a espécie à elevadas concentrações de Cd (0.1; 0.5; 1; 2; 5 e 10 mM) e de Cu (1; 2; 5; 10; 25; e 50 µM) durante 48 horas. A atividade fotossintética e a condutância estomática foram aumentadas significativamente quando Cu (1µM) estava presente na solução de cultivo das plantas. Entretanto, em concentrações maiores que 2 µM, esses processos foram suprimidos. As plantas referentes aos tratamentos com Cd acima de 5 mM também apresentaram um decréscimo nos valores das medidas de trocas gasosas.

O efeito da toxicidade de Zn sobre a fotossíntese líquida e a concentração interna de CO₂ foi estudado em *Lolium perene*. O período de tratamento com concentrações de 1; 5; 10 e 20 mM foi de 15 dias, dentro do qual as plantas mostraram uma forte capacidade em se protegerem dos efeitos tóxico desse metal. Acima de 10 mM, houve inibição do crescimento da planta. A taxa de fotossíntese líquida obtida apresentou uma correlação negativa com a taxa de concentração interna de CO₂, ou seja, com o aumento das concentrações de Zn, houve uma diminuição da primeira e um aumento da segunda ao final do experimento (Monnet *et al.*, 2001).

Em pepino (*Cucumis sativus* L.) foram observados os efeitos de concentrações de Cu, Cd e Pb (20 µM; 20 e 50 µM; 1000 µM, respectivamente) sobre as características dos parâmetros de troca gasosa durante dez dias. A taxa de fotossíntese líquida e a condutância estomática em folhas tratadas com 50 µM de Cu ou Cd foram similarmente reduzidas. Assim, Cu foi mais tóxico que Cd e Pb para a fotossíntese. Entretanto, nenhum dos metais investigados alterou a concentração de carbono interno (Burzyński e Klobus, 2004).

3.1.3 - Pigmentos Fotossintéticos

Os pigmentos cloroplastídicos são componentes importantes para a fotossíntese. Eles interagem com a luz e, assim, mudam de estado eletrônico iniciando o processo de oxirredução. No centro de reação dos PS I e II existe uma clorofila *a* especial que é o pigmento que inicia o processo oxirredutivo. Xantofilas e carotenos são pigmentos acessórios que, juntamente com as clorofilas *b*, outras clorofilas e proteínas compõem o PS I e II.

Alguns pigmentos fotossintéticos agem como fotoprotetores, participando de mecanismos de segurança e evitando danos ao organismo. Exemplos destes tipos de pigmentos são os carotenos. Os carotenóides agem como fotoprotetores através do rápido *quenching* (dissipação) dos estados excitados da clorofila, e as xantofilas possuem um ciclo que desempenham um papel crítico na dissipação de energia térmica (Guo *et al.*, 2006).

O conteúdo dos pigmentos fotossintéticos de plantas em geral é considerado um dos parâmetros mais sensíveis sob condições de estresse, particularmente por metais pesados (Sinha *et al.*, 2004).

Metais pesados como Zn, Fe, Cu e Mn são essenciais para as plantas e constituintes de muitas enzimas de importância metabólica. Outros metais como Pb, Cd, Cr e Al são biologicamente não-essenciais e tóxicos acima de certas concentrações. A acumulação destes pode diminuir o crescimento de plantas, entre outros fatores, pela redução dos pigmentos fotossintéticos (Panda e Choudhury, 2005).

Para investigar os efeitos de excessos de Cu sobre *Elsholtzia haichowensis*, Lou e colaboradores (2004) conduziram experimentos em hidroponia utilizando concentrações de 0; 10; 50; 100; 300 e 500 μM de Cu durante seis dias. Nenhuma variação significativa foi observada nas concentrações de clorofilas e carotenóides para as plantas tratadas com solução 10 μM de Cu. Quando as concentrações de Cu aumentaram (acima de 50 μM) os valores médios desses pigmentos mostraram uma tendência gradual de diminuição.

Os conteúdos de clorofila *a* e *b* foram estudados para *Cucumis sativus* L. expostas por dez dias à concentrações de 20 μM de Cu, 20 e 50 μM de Cd, e 1000 μM de Pb. As plantas tratadas com 50 μM de Cu apresentaram maior redução dos pigmentos fotossintéticos analisados (20% em relação aos controles). Os demais tratamentos não promoveram redução significativa dos pigmentos quando comparados ao controle (Burzyński e Klobus, 2004).

3.1.4 – Alterações ecofisiológicas de plantas na presença de cromo

Elevadas concentrações ou exposição por longos períodos a metais pesados podem comprometer o metabolismo de plantas, inclusive, a fotossíntese (Maxwell e Johnson, 2000).

Cromo pode influenciar muitos processos fisiológicos e bioquímicos em plantas aquáticas durante sua bioacumulação (Panda e Patra, 2000; Vajpayee *et al.*, 2001; Panda, 2003). A diminuição na concentração das clorofilas *a* e *b*, (na

presença de Cr⁺⁶, especificamente) e carotenóides é bem estabelecida em plantas sob estresse induzido por Cr (McGrath, 1982; Panda e Patra, 1998, 2000; Tripathi e Smith, 2000; Vajpayee *et al.*, 2000; Panda, 2003; Panda e Khan, 2003; Panda *et al.*, 2003; Panda e Choudhury, 2004).

Entretanto, algumas plantas aquáticas apresentaram aumento no conteúdo de carotenóides quando expostas a tratamento com Cr (Ralph e Burchett, 1998; Tripathi e Smith, 2000; Vajpayee *et al.*, 2001). Esse aumento de conteúdo provavelmente tem relação com sua ação antioxidante para as espécies reativas de oxigênio geradas como resultado à toxicidade do Cr (Panda e Choudhury, 2005).

Corradi e colaboradores (1993) trataram plantas e sementes de *Salvia sclarea* L. com concentrações diferentes de Cr hexavalente. A germinação das sementes *in vivo* não foi afetada. Porém, quando o sistema radicular das plantas permaneceu em contato com as soluções de Cr, o crescimento destas foi inibido, embora as partes aéreas tenham se desenvolvido normalmente. Depois de 48 h, os conteúdos de clorofila e carotenóides foram reduzidos, demonstrando o estresse que o Cr hexavalente pode provocar quando as plantas são expostas por tempos relativamente altos à esta espécie química.

Em plantas de *Pistia stratiotes* L., os efeitos de diferentes concentrações de Cr (0, 10, 40, 80 e 160 μ M) aplicadas durante 48, 96 e 144 horas, foram acessados através de medidas dos conteúdos de clorofila total, entre outras. Os conteúdos de clorofila diminuíram com o aumento das concentrações de Cr e com o período de exposição, exceto para as plantas dos tratamentos com 10 e 40 μ M de Cr por 48 h. Foi observado ainda que, as plantas expostas a 160 μ M de Cr por períodos de 144 h tiveram uma diminuição de 43% da quantidade de clorofila total em relação ao controle (Sinha *et al.*, 2005).

Outros parâmetros fotossintéticos podem apresentar variação em função da exposição à Cr. A proporção emitida de energia radiante na forma de fluorescência é menor em plantas estressadas. Entretanto, em algumas situações, a fluorescência aumenta sob condições de estresse, havendo ainda alterações

nos parâmetros derivados da própria fluorescência anteriormente citados (Lichtenthaler e Rinderle, 1988).

Vernay *et al.* (2007) fizeram medições de troca gasosa, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e quantificação de Cr total, entre outras medidas, em plantas de *Lolium perenne* L., expostas a diferentes concentrações de Cr⁺⁶ (0, 50, 100, 250 e 500 µM) durante 45 dias. A acumulação de Cr foi maior nas raízes que nas folhas. Acima de 100 µM de Cr, foram observadas diminuições do crescimento das plantas, bem como nas quantidades de pigmentos. Os parâmetros de troca gasosa e de fluorescência, assimilação de CO₂ e rendimento quântico, respectivamente, também apresentaram alterações em relação aos controles no final do experimento para concentrações superiores a 100 µM de Cr⁺⁶.

Os efeitos de diferentes concentrações de Cr⁺⁶ (1, 10 e 100 µM) sobre a emissão de fluorescência da clorofila *a* e os parâmetros de trocas gasosas foram investigados em crescimento hidropônico de *Amaranthus viridis* L. A fotossíntese líquida, a taxa de evapotranspiração e a condutância estomática e concentração de carbono interno foram reduzidas na presença de Cr⁺⁶ 10 e 100 µM. Os parâmetros de fluorescência da clorofila, Fv/Fm e q_p foram reduzidos nas plantas tratadas com Cr⁺⁶ 10 e 100 µM, ao contrário de q_n e NPQ (Liu *et al.*, 2007)

3.2 - JUSTIFICATIVA

Os trabalhos atualmente existentes, que utilizam ferramentas ecofisiológicas, se dedicam especialmente à aferições de estresse por fotoinibição de plantas terrestres. Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de esclarecer os impactos de diferentes espécies químicas de metais pesados sobre as atividades fotossintéticas de plantas, principalmente, macrófitas aquáticas.

A toxicidade do Cr⁺⁶ é bastante discutida para plantas em geral. Seu alto potencial redox é responsável pela indução da formação de espécies de oxigênio reativas que, por sua vez, são as responsáveis por diversos danos causados ao aparelho fotossintético.

Por outro lado, os íons de Cr^{+3} apresentam menor toxicidade que os de Cr^{+6} . Algumas condições de tratamento, como elevada concentração e o tempo de exposição às espécies trivalentes, podem se tornar tão danosos ao aparelho fotossintético das plantas quanto às hexavalentes. Entretanto, tais condições ainda não se encontram bem estabelecidos na literatura.

Desta forma, o presente trabalho visou contribuir com estudos sobre os efeitos nas relações de emissão de fluorescência, pigmentos e de trocas gasosas que as espécies químicas de Cr (+6 e +3) podem ter sobre as plantas em períodos de exposição e concentrações pré-estabelecidos.

3.3 – OBJETIVOS

3.3.1 - Objetivo Geral

O trabalho teve como objetivos quantificar Cr total em plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) submetidas a tratamento com Cr^{+3} e Cr^{+6} , aliando a estes dados, medidas de parâmetros ecofisiológicos para observar quais espécies químicas promoveriam maiores alterações nos processos fotossintéticos da planta em questão.

3.3.2 – Objetivos Específicos

- Quantificar Cr total e identificar a presença de Cr^{+3} e Cr^{+6} nas raízes e nas partes aéreas de amostras de plantas de aguapé;
- Determinar o indicativo do conteúdo de cor verde;
- Determinar o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Clo *a*, Clo *b* e carotenóides);
- Determinar as variações na Emissão de Fluorescência da Clorofila *a*;
- Determinar as variações nos parâmetros de trocas gasosas (Assimilação fotossintética, Condutância estomática, Evapotranspiração e Carbono interno);

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 – Material vegetal e local de coleta

As análises foram feitas utilizando a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) provenientes do rio Imbé.

As coletas do material vegetal foram realizadas nos meses de maio, junho e julho (estação seca) do ano de 2007.

3.4.2 – Condições de cultivo

Após a coleta no rio Imbé, as plantas foram levadas para o LCA/UENF e acomodadas em casa de vegetação para aclimação durante cinco dias. Após o período de aclimação, as mesmas foram distribuídas em recipientes plásticos

(Figura 3.1), num somatório de cinco recipientes. A estes, foram adicionados solução nutritiva de micro e macronutrientes e, em seguida, soluções de Cr^{+3} e Cr^{+6} nas concentrações de 1 e 10 mM).

Bombas de ar foram colocadas dentro de cada recipiente para garantir a oxigenação para as plantas.



Figura 3.1 – Experimento realizado na casa de vegetação. Recipientes contendo as macrófitas, da esquerda para a direita: controle, 1mM de Cr^{+3} , 10mM de Cr^{+3} , 1mM de Cr^{+6} e 10mM de Cr^{+6} .

3.4.3 - Preparo das soluções nutritivas

As soluções nutritivas de micro e macronutrientes foram preparadas de acordo com Hoagland e Arnon (1950) e Smart e Barko (1985), respectivamente. Os reagentes utilizados constam nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Para obtenção da solução estoque de micronutrientes (Tabela 3.1), foram misturadas em um balão volumétrico alíquotas de 10ml de cada solução e o volume completado com água deionizada para 1000ml. Dessa nova solução, foram retirados 100 mL e colocados em cada recipiente do tratamento. A solução estoque apresenta as concentrações para diluição em 7L de água, que foi o volume utilizado no experimento.

Tabela 3.1 – Sais utilizados no preparo da solução de cultivo de micronutrientes e de Fe+EDTA (Smart e Barko, 1985).

Solução estoque	Reagentes	PM	Massa (g)	Volume de solução (mL)	*Concentração final ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Volume na solução final (mL)
Micronutrientes	MnSO ₄ . 2H ₂ O	187	1,19	100	9,1	10
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	319	0,17	100	0,8	10
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	281	0,052	100	0,3	10
	H ₃ BO ₄	78	1,97	100	46,3	10
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	1146	0,12	100	0,1	10
Fe + EDTA	EDTA	186,12	11,91	400	32,0	7
	FeCl ₃	161	5,19	400	32,0	7

* Concentração final utilizada para um volume final de 7 L de solução nos recipientes com seus respectivos tratamentos.

A solução estoque de Ferro+EDTA foi preparada separadamente (400 mL de cada uma). Essas soluções foram misturadas e o volume completado com água deionizada para 1000 mL. Um litro de solução de cultivo deve conter 1 mL de solução Fe-EDTA. Como o volume final de solução na unidade experimental foi de 7L, foram retirados da solução (Fe-EDTA) um volume de 7 mL e colocados em cada recipiente dos tratamentos.

Para a obtenção da solução nutritiva de macronutrientes foram preparadas soluções estoques individuais das mesmas (Tabela 3.2). As adições destas soluções foram realizadas separadamente em cada recipiente do experimento.

3.4.4 - Preparo das soluções de Cr

As soluções de Cr⁺³ foram preparadas a partir de Cr₂O₃ nas concentrações de 1 e 10 mM. Já as de Cr⁺⁶, a partir de K₂Cr₂O₇. Ambas para um volume final de sete litros.

Tabela 3.2 – Sais utilizados no preparo da solução de cultivo de macronutrientes (Hoagland e Arnon, 1950).

Solução Estoque	Reagentes	PM	Massa (g)	Volume de solução (mL)	Concentração final (mg. L ⁻¹)	Volume na solução final (mL)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	80	0,03	10	17,5	10
	KH ₂ PO ₄ (P – PO ₄)	136	0,03	10	18,2	10
	CaCl ₂ .2H ₂ O	146	9,17	7	91,7	7
	KHCO ₃	100	14,4	7	15,4	7
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	278	34	7	69	7
	K ₂ SO ₄ (S - SO ₄)	135	0,03	10	80,5	10
	NaHCO ₃	84	58,4	7	58,4	7

3.4.5 - Parâmetros Ecofisiológicos

Os parâmetros ecofisiológicos analisados foram: clorofila total, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, emissão de fluorescência da Clorofila *a* e medidas de troca gasosa.

Todos os dados obtidos para as medidas ecofisiológicas foram coletados em três tempos de exposição aos íons de Cr: zero, dois e quatro dias. O conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, em sendo uma análise destrutiva, foi obtido no último dia de análise.

Os equipamentos utilizados em todas as medidas acima citadas estão listados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Equipamentos utilizados nas leituras de conteúdo de cor verde⁽¹⁾, pigmentos fotossintéticos⁽²⁾, cinética de emissão da clorofila *a*⁽³⁾ e trocas gasosas⁽⁴⁾.

EQUIPAMENTOS	MARCA	MODELO
1 - Medidor de clorofila portátil	Minolta, Japan	SPAD-502
2 - Espectrofotômetro UV-visível	Shimadzu	UV-160A
3 - Fluorímetro modulado portátil	Hansatech, UK	FMS2
4 - Analisador de gás carbônico no infravermelho (IRGA)	PP Systems, UK	Ciras 2

3.4.5.1 – Indicativo do conteúdo de cor verde

Para obtenção destes dados foi utilizado o medidor de clorofila portátil, modelo SPAD-502 (Minolta, Japan). Tal equipamento determina a intensidade de cor verde das folhas por meio de sensores, podendo viabilizar uma inferência sobre o teor de clorofila total.

Os dados desse parâmetro foram obtidos antes das medidas de cinética de emissão da clorofila *a* e de troca gasosa, visando uma padronização das folhas quanto ao teor de pigmento verde.

3.4.5.2 – Quantificação dos Pigmentos Fotossintéticos

Após a determinação dos parâmetros relacionados às trocas gasosas e à fluorescência da clorofila *a* (técnicas não-invasivas), foram retirados discos de 1,1 cm de diâmetro do limbo foliar (técnica invasiva), sendo cortados em tiras e colocados em frascos contendo 5 mL do solvente orgânico DMSO (Dimetilsulfóxido). Os frascos foram envolvidos em papel alumínio, para que não houvesse degradação do DMSO com a luz, e transportados para o laboratório. Para cada tratamento, foram retirados três discos foliares e cada disco foi colocado em um frasco contendo DMSO para posterior análise.

As leituras dos conteúdos dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a* (Clo *a*), *b* (Clo *b*) e carotenóides (Carot.) foram feitas em espectrofotômetro de absorção atômica (UV-160A Shimadzu) nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, respectivamente, após cinco dias de extração com DMSO. Os cálculos para a determinação das concentrações dos pigmentos analisados foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Wellburn (1994).

Todo o procedimento de laboratório foi realizado em ambiente com baixa luminosidade para evitar possível degradação da clorofila.

3.4.5.3 – Cinética de Emissão de Fluorescência da Clorofila *a*

Para obtenção dos dados referentes à emissão de fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorímetro modulado portátil, modelo FMS2 (Hansatech, UK). As medidas foram feitas na superfície adaxial de 3 folhas intactas (totalmente expandidas e livres de necrose ou ferimentos).

O experimento se processou ao expor as folhas anteriormente adaptadas ao escuro (por 30 minutos), com o auxílio de pinças, a uma luz de medição (aproximadamente $6 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 660 nm), seguida pela exposição à luz actínica (luz branca) de alta intensidade ($10.000 \mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), aplicada por 0,8 segundos, adaptado de Genty *et al.* (1989) e Van Kooten e Snel (1990). Em seguida os valores foram registrados e submetidos à análise das seguintes variáveis: Fluorescência mínima (F_0); Fluorescência máxima (F_m); Fluorescência variável (F_v); Eficiência quântica potencial (F_v/F_m); Eficiência da capacidade fotossintética (F_v/F_0); e coeficientes de extinção da fluorescência fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (qN e NPQ).

3.4.5.4 – Trocas Gasosas

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 $2,5 \text{ cm}^2$ de área foliar 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 CO₂ foram ajustadas para 2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de fótons, 80% e 375 ppm, respectivamente.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: Assimilação Fotossintética (*AF*: $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), taxa de Evapotranspiração (*E*: $\text{mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$) condutância estomática (*g_s*: $\text{mmol H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$) e Carbono interno (*C_i*: ppm).

Após a *AF* ter atingido valor constante, foram realizados 3 registros por folha das plantas referente a cada tratamento.

Antes, porém do início das medidas de troca gasosa nas plantas dos tratamentos, foi feita uma “curva de resposta a luz” para assimilação fotossintética e condutância estomática no período da manhã (08:00 h). As medidas para confecção das curvas de resposta a luz, foram feitas variando a radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*) de 0 a 2000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Umidade e concentração de CO₂ foram ajustadas em 80% e 375 ppm, respectivamente.

3.4.6 - Preparo da amostras para quantificação de Cr

As amostras foram preparadas como descrito nos itens 1.4.2 e 1.4.3 do Capítulo 1 para quantificação de Cr total e Cr⁺⁶ respectivamente.

3.4.7 - Análises dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar as diferenças entre os dados de quantificação de Cr total e os das análises ecofisiológicas. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados a seguir se referem a uma média de três experimentos feitos nas mesmas condições de cultivo.

3.5.1 – Alterações morfológicas

Durante os quatro dias de experimento, foram observadas alterações nos aspectos morfológicos das plantas. As plantas referentes ao tratamento com Cr^{+6} na concentração de 10 mM foram as que sofreram maiores alterações. As figuras 3.2i e 3.2j mostram que, no segundo dia, as plantas referentes a este tratamento estavam totalmente necrosadas, de forma que deixa de ter sentido apresentar os resultados obtidos. Portanto, neste trabalho não serão apresentados os dados de quantificação de Cr total e Cr^{+6} , indicativo do conteúdo de cor verde, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, emissão da fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas para o quarto dia do experimento (Cr^{+6} 10 mM).

Nos tratamentos com Cr^{+3} foi possível notar que as plantas expostas à concentração de 10 mM, em quatro dias de tratamento (Figura 3.2f), apresentaram-se com aspectos mais saudáveis que as plantas-controle (Figura 3.2a e 3.2b) e que as expostas a Cr^{+3} 1 mM (Figura 3.2d).

Para as plantas expostas a Cr^{+6} 1 mM, pôde ser observado que em dois dias de tratamento (Figura 3.2g), as mesmas apresentaram-se menos saudáveis que as plantas-controle. Em quatro dias de tratamento (Figura 3.2h) algumas necroses já podiam ser observadas nas folhas das plantas.



Figura 3.2 - Aspectos morfológicos das plantas de aguapé: Coluna da esquerda: 2 dias de tratamento; coluna da direita: 4 dias de tratamento. a e b – plantas-controle; c e d - plantas expostas a Cr^{+3} 1 mM; e e f - plantas expostas a Cr^{+3} 10 mM; g e h - plantas expostas a Cr^{+6} 1 mM; i e j - plantas expostas a Cr^{+6} 10 mM.

3.5.2 – Quantificação de Cr total

Ao final do experimento, foram feitas as quantificações de Cr total para as plantas de todos os tratamentos, exceto para as plantas do tratamento com Cr⁺⁶ 10 mM, como citado anteriormente. Na tabela 3.4 estão especificados os valores de Cr total em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca para as partes aéreas e as raízes, respectivamente.

Tabela 3.4 - Concentrações de Cr total ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) para plantas de aguapé expostas a Cr⁺³ 1 e 10 mM e Cr⁺⁶ 1 mM após quatro dias de tratamento.

Partes vegetais	Tratamentos			
	Controle	Cr ⁺³ 1mM	Cr ⁺³ 10mM	Cr ⁺⁶ 1mM
Parte Aérea	3 ± 1.6 Bb	3 ± 1.3 Bb	51 ± 25.2 Bb	1560 ± 165.30 Ba
Raízes	142 ± 37.85 Ab	417 ± 324.20 Ab	1258 ± 360.66 Ab	3475 ± 942.51 Aa

Os resultados são médias de três replicatas \pm o desvio padrão. Letras maiúsculas representam comparações entre o mesmo tratamento nas diferentes partes da planta. Letras minúsculas, comparação entre os diferentes tratamentos na mesma parte da planta ($p \leq 0,05$).

As concentrações de Cr total foram maiores, independentemente dos tratamentos recebidos, para as raízes que para as partes aéreas, variando de 142 à 3.475 e de 3 à 1.560 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. A exposição das plantas a concentrações crescentes (de 1 a 10 mM) de Cr aumentou significativamente a absorção de Cr pelas raízes após quatro dias de tratamento. O conteúdo de Cr total nos tecidos de aguapé foi significativamente maior, comparados às plantas do controle, quando se utilizou a forma hexavalente do Cr.

Os valores de 3,0 e 142,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de Cr total encontrados para a parte aérea e raízes do controle, respectivamente, indicam a presença natural de Cr no rio Imbé (local de coleta das plantas). Estes valores foram descontados, para efeito de cálculo, dos valores obtidos das leituras para cada tratamento.

Entre todos os tratamentos, os maiores valores de Cr total foram encontrados para as plantas tratadas com Cr⁺⁶ 1 mM, independente da parte

vegetal analisada. Isso deve estar relacionado a solubilidade do Cr^{+6} que é maior que a do Cr^{+3} .

Para as plantas tratadas com Cr^{+3} , os valores de Cr total foram maiores para aquelas referentes à concentração de 10 mM. Com o aumento das concentrações deste íon, houve um aumento significativo na translocação raiz-parte aérea: $3 \mu\text{g.g}^{-1}$ para as expostas a 1 mM contra $51 \mu\text{g.g}^{-1}$ para as expostas a 10 mM.

Comparando os valores das raízes e partes aéreas das plantas dos tratamentos com Cr^{+3} e Cr^{+6} de mesma concentração (1 mM), houve uma absorção muito superior para àquelas expostas ao segundo tratamento. A translocação das raízes para as partes aéreas foi muito mais efetiva para as plantas deste tratamento do que para as do tratamento com Cr^{+3} : 1.560 contra $3 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

Diversos estudos sobre acumulação de Cr por plantas de aguapé têm sido realizados. Satyakala e Jamil (1992) observaram que a acumulação de Cr por tais plantas cultivadas durante três dias em 0, 200 μM , 500 μM e 1 mM de Cr^{+6} foi maior para as raízes que para as partes aéreas: 40 e 12 mg.g^{-1} de massa seca, respectivamente, para as plantas cultivadas em 1 mM de Cr^{+6} .

Aguapé foi testada por sua capacidade de acumular diversos metais tóxicos, ente eles Cr. As plantas foram cultivadas em solução de Cr^{+6} nas concentrações de 0; 0.1; 0.3; 0.5; 1.0; 3.0 e 5.0 mM num período de 21 dias. A acumulação de Cr no sistema radicular das plantas foi substancialmente maior que nas folhas, tendendo a um aumento com o aumento da concentração de Cr no meio externo (Odjegba e Fasidi, 2007).

A espécie *Eichhornia crassipes* foi descrita em outros trabalhos como uma planta muito eficiente na acumulação de Cr, chegando a concentrar em suas raízes 18.92 μmol de Cr por grama de peso seco (Chandra e Kulshreshtha, 2004).

Os trabalhos citados comprovam a capacidade que as plantas de aguapé possuem de sobreviver a ambientes poluídos por metais pesados em concentrações relevantes dos mesmos. Para isso elas tendem a acumulá-los

preferencialmente nas raízes, evitando, até certo ponto, que sejam translocados para as partes aéreas como mecanismo de proteção as estruturas responsáveis pela produção de energia necessária à sua sobrevivência.

De acordo com o critério de concentração, maior que 1000 mg. Kg^{-1} de Cr em tecidos de folha seca, sugerido por Baker e Brooks (1989) para plantas terrestres, apenas duas espécies seriam classificadas como hiperacumuladoras de Cr, *Dicoma niccolifera* e *Sutera fodina*, as quais as concentrações máximas de Cr encontradas nos tecidos foliares foram 1.500 mg.Kg^{-1} e 2.400 mg.Kg^{-1} , respectivamente (Reeves e Baker, 2000). Concentrações de $1.560 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ (massa seca) de Cr total nas partes aéreas de aguapé encontradas em nosso trabalho, permitem corroborar com outros estudos para classificar a planta, neste caso aquática, como uma hiperacumuladora de Cr.

Plantas de *Vallisneria spiralis* mostraram maior acumulação nas raízes ($1050 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) que nas folhas ($697 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ de massa seca) quando cultivadas em solução nutritiva contendo $192 \text{ } \mu\text{M}$ de Cr^{+6} depois de 72 horas (Vajpayee *et al.*, 2001).

Em raízes de *Bacopa monnieri* e *Scirpus lacustris* uma acumulação de 1600 e $739 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ (peso seco) de Cr, respectivamente, foi encontrada quando as mesmas permaneceram por 7 dias em solução contendo $96 \text{ } \mu\text{M}$ de Cr (Gupta *et al.*, 1994).

Vernay e colaboradores (2007) encontraram concentrações de Cr em raízes de plantas de *Lolium perenne* L., tratadas com concentração máxima de $500 \text{ } \mu\text{M}$ de Cr^{+6} durante 40 dias, até dez vezes maiores que nas folhas.

Em nosso estudo, a concentração de Cr total nas raízes foi superior a das partes aéreas, especialmente para as plantas submetidas a Cr^{+3} no que diz respeito aos fatores das concentrações do Cr total presente na raiz pela parte aérea. Para as plantas tratadas com 1 e 10 mM de Cr^{+3} os fatores foram de 139 e 25, respectivamente. Enquanto que para o Cr^{+6} , esse fator foi de 2.2.

O estado de oxidação influencia fortemente a proporção de absorção de Cr. Cr^{+6} pode facilmente atravessar a membrana da célula e ser transportado por

carregadores de íons essenciais como os de sulfato, fosfato e ferro. Por outro lado, Cr^{+3} não utiliza nenhum carregador de íon específico. Desta forma, sua entrada na célula se dá através de mecanismos de difusão, possível apenas quando ele forma complexos com ligantes lipofílicos apropriados (Chandra e Kulshereshta, 2004; Shanker *et al.*, 2005).

Plantas aquáticas absorvem os íons de metais pesados, em geral mais solúveis no meio, como é o caso de Cr^{+6} . Tal propriedade ajuda a explicar sua maior toxicidade frente aos íons de Cr^{+3} (até mesmo para maiores concentrações desta espécie química). Entretanto, a capacidade de absorção de diferentes íons de metais pesados também depende da espécie vegetal em questão. Por exemplo, para plantas de *Leersia hexandra* S. cultivadas em solução de 400 μM de Cr^{+3} e Cr^{+6} durante 45 dias, as concentrações encontradas nas raízes foram maiores para aquelas cultivadas em Cr^{+3} do que para as cultivada em Cr^{+6} , 8.078 mg.kg^{-1} e 2.109 mg.kg^{-1} de massa seca, respectivamente (Zhang *et al.*, 2007).

Em sete de dez espécies de plantas analisadas, houve maior acúmulo de Cr nas raízes quando as plantas foram crescidas em solução contendo Cr^{+6} que quando em Cr^{+3} (Zayed *et al.*, 1998). A razão da alta acumulação em raízes de plantas seria a imobilização de Cr nos vacúolos das células das raízes. O Cr^{+6} nas células é rapidamente reduzido a Cr^{+3} , o qual é retido nas células do córtex radicular sob baixas concentrações de Cr^{+6} , o que em parte, explica a baixa toxicidade da espécie trivalente. Embora, plantas vasculares não contenham enzimas que reduzam Cr^{+6} , têm sido largamente descrito que bactérias ou fungos presentes no sistema radicular das mesmas desempenham essa função como forma de diminuir os efeitos tóxicos deste íon (Shanker *et al.*, 2005).

Os aspectos morfológicos das plantas deste experimento comprovam a maior toxicidade da espécie química hexavalente em relação à trivalente para uma mesma concentração e mesmo período de tratamento. Como houve uma translocação maior de Cr para as partes aéreas das plantas submetidas a Cr^{+6} , estas encontraram-se, já a partir do segundo dia de experimento, morfológicamente mais comprometidas que as submetidas a Cr^{+3} . A espécie

hexavalente é um agente oxidante altamente forte. Sua presença concorre na rápida formação de espécies de oxigênio reativas, principais responsáveis pelo comprometimento do metabolismo das plantas.

3.5.3 – Espectros no UV-visível

As figuras 3.3 a, b, c e d representam os espectros de absorção para as partes aéreas e raízes das plantas do controle e as expostas a Cr^{+6} 1 mM, Cr^{+3} 1 e 10 mM, respectivamente.

Comparando o espectro obtido para a amostra de raiz exposta a Cr^{+6} com aquele obtido para o controle (Figura 3a e 3b), pouca diferença foi encontrada. Porém, pôde-se notar que a banda de absorção para a amostra exposta a Cr^{+6} apresentou menor intensidade de absorbância na região de menor comprimento de onda. Esse efeito deve estar relacionado a competição entre o Fe e o Cr^{+6} de se complexarem com a 1,5-difenilcarbazida (1,5-DFC). Sabendo que a capacidade do Cr de reagir com a 1,5-DFC é maior do que a capacidade de reagir com o Fe (Neto *et al.*, 2005), isso pode explicar a redução da absorbância na região de menores comprimentos de onda (região de sinal de absorbância relacionado ao complexo 1,5-DFC/Fe). Assim, em termos relativos, a razão entre a área da banda de absorbância situada ente 500 e 600 nm (centrada em 550 nm) e a área total foi maior para as amostra submetidas à solução de 1 mM de Cr^{+6} do que as plantas do controle. Ou seja, como esperado, houve incorporação de Cr^{+6} nas raízes.

Para a parte aérea, a diferença foi nítida entre os espectros obtidos para as amostras do controle e aquelas expostas a solução de 1 mM de Cr^{+6} . Comparado às raízes, a parte aérea apresentou menor teor de Fe (Tabela 8 em anexo), isto acarretou menor diferença entre as intensidades dos espectros na região de menor comprimento de onda para as amostra do controle e tratadas. A fim de facilitar a visualização, o espectro da parte aérea da amostra controle foi incluído na figura 3b junto aos espectros de absorbância da amostra tratada com Cr^{+6} . Pôde-se notar uma intensidade maior de absorção na faixa entre 500 e 600 nm para a amostra tratada.

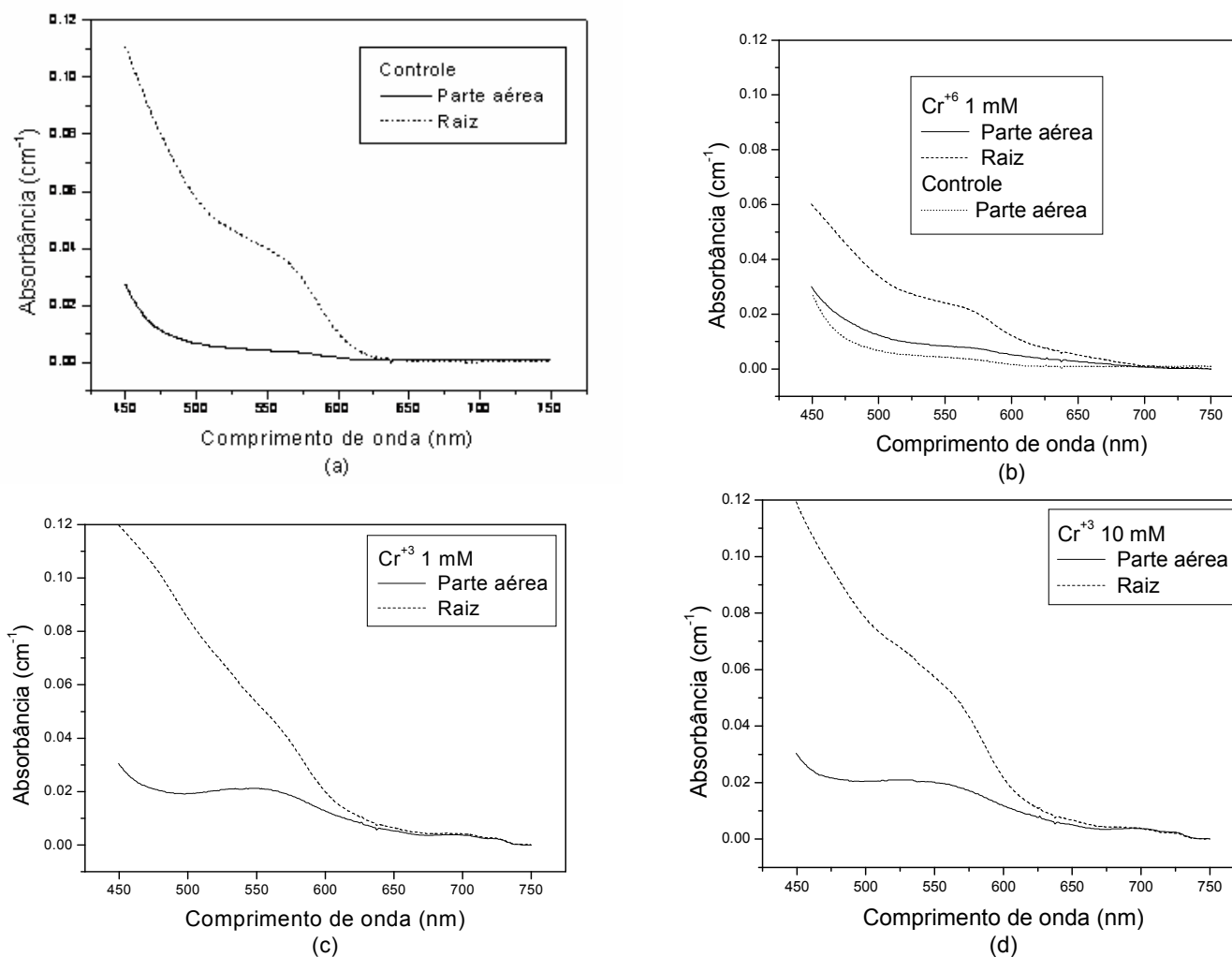


Figura 3.3 – Espectros de absorção para partes aéreas e raízes de aguapé do controle (a) e após quatro dias de exposição a Cr⁺⁶ 1 mM (b) e Cr⁺³ 1 (c) e 10 mM (d). As amostras são as plantas digeridas e complexadas com 1,5-DFC em meio ácido.

Quanto aos resultados obtidos para a absorvência das amostras tratadas com as soluções de Cr^{+3} , além de uma protuberância semelhante àquela encontrada para os espectros das amostras tratadas com Cr^{+6} situada entre 500 e 600 nm, outra banda de absorção foi encontrada entre os comprimentos de onda de 675 e 740 nm, centrada em torno de 710 nm. As figuras 4a e 4b mostram separadamente os espectros obtidos para as partes áeras e raízes, respectivamente.

Apesar dos resultados aqui apresentados para os tratamentos realizados com Cr^{+3} serem preliminares, os espectros obtidos foram claramente diferentes àqueles obtidos para o Cr^{+6} .

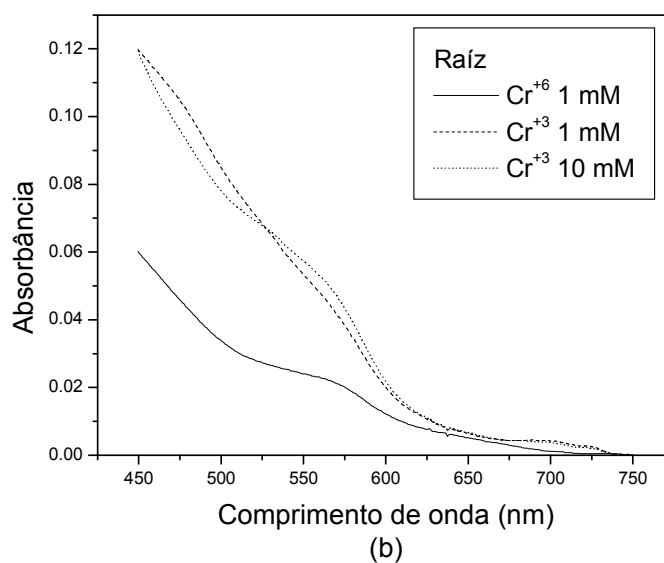
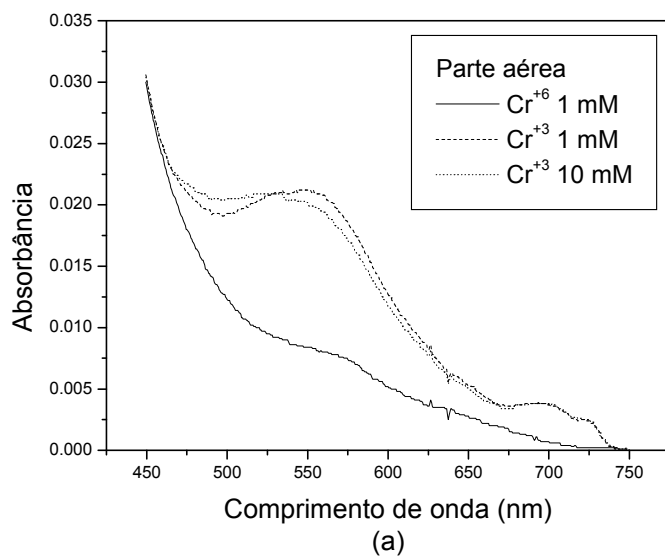


Figura 3.4 - Espectros de absorção para plantas de aguapé após quatro dias de exposição a Cr^{+6} 1 mM e Cr^{+3} 1 e 10 mM. a- partes aéreas e b- raízes. As amostras são as plantas digeridas e complexadas com 1,5-DFC em meio ácido.

3.5.4 – Indicativo do conteúdo de cor verde

A figura 3.5 mostra o gráfico (em unidades adimensionais) para clorofila total das folhas referentes ao controle, dois e quatro dias de tratamentos.

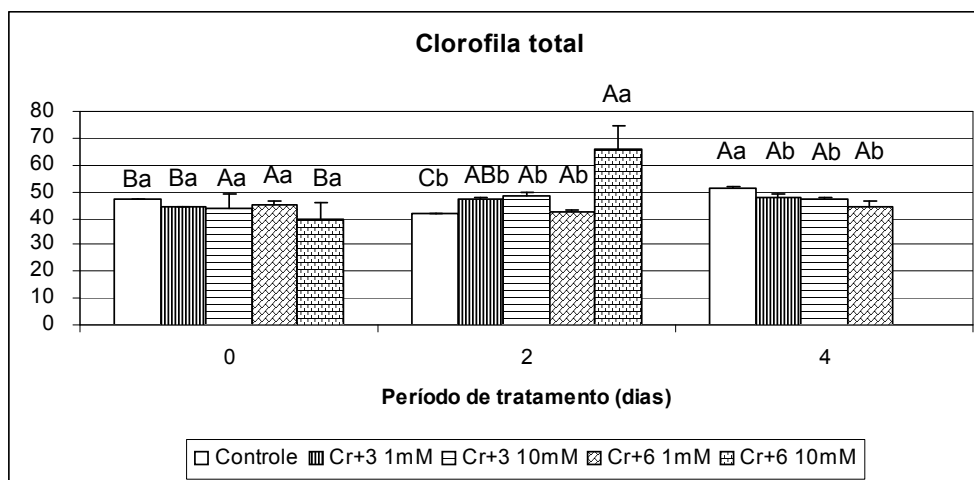


Figura 3.5 – Indicativo do conteúdo de cor verde em plantas de aguapé expostas a diferentes concentrações de Cr^{+3} e Cr^{+6} no tempo zero, dois e quatro dias de tratamento. As barras representam o desvio padrão. Letras maiúsculas comparam entre o mesmo tratamento em diferentes tempos de exposição. Letras minúsculas, entre diferentes tratamentos no mesmo tempo.

Foi possível observar para as plantas do controle (tempo zero) uma diferença significativa em relação àquelas dos controles dos demais tempos. Isso pode ser atribuído às mudanças das condições naturais as quais elas estavam adaptadas antes do início do experimento. Em dois dias de tratamento, as plantas expostas a Cr^{+6} 10 mM apresentaram os maiores valores em relação às plantas controle, variando de 65.6 e 41.6, respectivamente. As plantas expostas a Cr^{+3} 1 e 10 mM tiveram um aumento de seus conteúdos de clorofila total em relação as plantas do controle, porém sem diferença significativa. Embora não tenha sido observada diferença estatística para esses dois últimos tratamentos, as plantas apresentaram-se mais saudáveis que as do controle (Figuras 3.2 c, d, e e f).

No quarto dia de experimento, as quantidades de clorofila total diferiram entre os tratamentos quando comparadas apenas aos controles.

Alterações dos conteúdos de clorofila total em plantas sob estresse por Cr têm sido bem relatadas (Panda e Choudhury, 2005). Tais alterações sugerem uma possível inativação das enzimas responsáveis pela síntese das clorofilas e proteínas que compõem os fotossistemas (Van Assche e Clijsters, 1990).

O crescimento de *Lolium perenne* L. foi afetado na presença de 50 μM de Cr^{+6} após 45 dias de exposição e as folhas tiveram perda de seus pigmentos. O conteúdo de clorofila total aumentou com o tempo sem declínio significativo com o aumento das concentrações de Cr no meio externo (exceto após 45 dias para Cr^{+6} 50 μM) (Vernay *et al.*, 2007).

Sob altas concentrações (1 mM) de Cr^{+3} Scoccianti e colaboradores (2006) observaram uma pequena redução nas quantidades de clorofila total para *Apium graveolens* L. ao final de 15 dias de tratamento.

3.5.5 – Conteúdo dos Pigmentos Fotossintéticos

Os valores relativos aos pigmentos fotossintéticos (em $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) e as relações obtidas para eles estão representados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$): clorofila *a* (clo *a*), clorofila *b* (clo *b*) e carotenóides (Carot.) para plantas de aguapé expostas a Cr^{+3} 1 e 10 mM e Cr^{+6} 1 mM após quatro dias de tratamento.

Pigmentos	Tratamentos			
	Controle	Cr^{+3} 1 mM	Cr^{+3} 10 mM	Cr^{+6} 1 mM
Clo <i>a</i>	0.050 \pm 0.002 A	0.050 \pm 0.001 A	0.050 \pm 0.001 A	0.027 \pm 0.003 B
Clo <i>b</i>	0.018 \pm 0.002 A	0.026 \pm 0.006 A	0.025 \pm 0.003 A	0.024 \pm 0.011 A
Carot.	0.018 \pm 0.000 A	0.019 \pm 0.001 A	0.019 \pm 0.001 A	0.012 \pm 0.005 A
Clo <i>a</i> /Clo <i>b</i>	2.711 \pm 0.360 A	1.959 \pm 0.480 A	1.986 \pm 0.300 A	1.391 \pm 0.220 A

Os resultados são médias de três replicatas \pm o desvio padrão. As letras representam a comparação entre os diferentes tratamentos para o mesmo pigmento.

As concentrações de clorofila *a* variaram entre 0,027 e 0,050 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$. Foi possível observar um decréscimo significativo nas quantidades de clorofila *a* para as plantas submetidas a Cr^{+6} 1 mM em relação às plantas-controle. Já as plantas expostas a Cr^{+3} nas duas concentrações não apresentaram variação para este pigmento.

Os conteúdos de clorofila *b* variaram numa escala muito pequena para os tratamentos recebidos (entre 0,018 à 0,026 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), não apresentando diferença estatística entre eles. Naturalmente, clorofilas *b* são encontradas em menores quantidades que as clorofilas *a* em plantas de ambientes ensolarados. Sob condições de crescimento favoráveis, existe uma relação de 3:1 de clorofila *a* para clorofila *b* (clo *a*/clo *b*). De acordo com os nossos resultados, a proporção clo *a*/clo *b* foi de aproximadamente 3:1 para as plantas do controle; 2:1 para as plantas expostas a Cr^{+3} 1 e 10 mM e de 1.4:1 para as expostas Cr^{+6} 1 mM. Embora numericamente este último tratamento tenha apresentado a metade da proporção em relação ao controle e, estatisticamente não tenha havido diferença entre eles, biologicamente foi possível observar os danos que tal concentração provocou nas plantas (ratificados pelos demais parâmetros ecofisiológicos descritos a seguir).

Em nosso experimento, os carotenóides foram os pigmentos de menores concentrações (0.012 à 0.019 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$), sem diferença significativa entre os tratamentos recebidos e as plantas-controle. A constância das concentrações encontradas para esse pigmento na presença de Cr sugere que aguapé não utilize apenas os carotenóides como meio de dissipação de energia para prevenir danos ao seu aparelho fotossintético causados pela bioacumulação de metais pesados.

A toxicidade do Cr, especificamente Cr^{+6} , em relação a parâmetros bioquímicos e fisiológicos – clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides – tem sido discutida por diversos autores. Em *Limnathemum cristatum* G., Cr^{+6} causou redução mínima nos conteúdos de clorofilas *a* e *b* e nenhuma nos de carotenóides (Chandra e Garg 1992). Entretanto, com o aumento das concentrações de Cr^{+6} no cultivo de plantas de *Vallisneria spiralis*, *Cerathophyllum demersum* e *Najas indica*, foram observados um decréscimo significativo tanto para clorofilas quanto para

carotenóides. Indicando que tais parâmetros frente a tratamento com Cr^{+6} variam de espécie para espécie (Garg e Chandra, 1990; Sinha *et al.*, 2002).

Em 2 μM de Cr^{+6} , reduções nos conteúdos de clorofila *a* e *b* e, conseqüentemente, no crescimento das plantas (*Lemna minor* e *Pistia stratiotes*) puderam ser observadas (Bassi *et al.*, 1990). Entretanto, em concentrações mais elevadas de Cr^{+6} (0.3 mM), plantas de *Pistia stratiotes* mostraram uma drástica redução nos conteúdos dos pigmentos fotossintéticos e, após 3 dias de tratamento, pôde ser constatada a morte das mesmas (Sen *et al.*, 1987). Em plantas de *Nelumbo nucifera* cultivadas em altas concentrações de Cr^{+6} , os conteúdos de clorofila foram reduzidos 74.7% em relação aos controles (Vaipayee *et al.*, 1999).

Os efeitos de Cr^{+6} sobre os conteúdos de pigmentos fotossintéticos são reconhecidamente mais severos que os efeitos do Cr^{+3} . Porém, em plantas de *Apium graveolens* L. submetidas ao estresse por Cr^{+3} em concentrações de 0,01; 0.1; 1 e 10 mM em 15 dias de tratamento, um decréscimo significativo do conteúdo de clorofila (*a*, *b* e total) foi detectado quando comparados ao controle. Em 1 mM, houve um decréscimo maior para clorofila *b* que clorofila *a* (Scoccianti *et al.*, 2006).

As plantas do nosso experimento (ao final de quatro dias) mostraram uma redução na relação entre clo *a*/clo *b* para todos os tratamentos. Porém, pôde ser observado que o conteúdo de clorofila *a* foi o mais afetado na presença de Cr^{+6} 1 mM, mostrando que a toxicidade do Cr dependeu mais da espécie química que da concentração utilizada.

3.5.6 – Emissão da fluorescência da clorofila *a*

A tabela 3.6 mostra as diferentes variáveis de emissão da fluorescência da clorofila *a* medidas durante o experimento e discutidas a seguir:

A F_0 (fluorescência mínima) variou durante o experimento de 319 à 148 (u.a.). Nenhuma diferença estatística foi mostrada para a maioria dos tratamentos, com algumas exceções. O menor valor, 148, foi referente à exposição a Cr^{+6} 10 mM por dois dias. Em nosso experimento, a diminuição no conteúdo de clorofila *a*

Tabela 3.6 – Valores de fluorescência da clorofila *a* para as plantas de aguapé expostas a diferentes tratamentos com Cr⁺³ e Cr⁺⁶ nas concentrações de 1 e 10mM nos períodos de 2 e 4 dias. F₀ - fluorescência mínima; F_m - fluorescência máxima; F_v - fluorescência variável; F_v/F_m - eficiência quântica potencial; F_v/F₀ - eficiência da capacidade fotossintética; qP - quenching fotoquímico; qN e NPQ - quenching não-fotoquímico. Análise estatística (Tukey, p < 5%); as letras (a, b, c, d e e) representam a estatística para comparação entre os tratamentos.

Tratamento	Concentração de Cr (mM)	Tempo (dias)	F ₀	F _m	F _v	F _v /F _m	F _v /F ₀	qP	qN	NPQ	
Control	0	0	274.5 ± 3.54 a	1678.5 ± 27.58	1479.0 ± 4.24	0.81 ± 0.01	5.12 ± 0.18	0.889±0.02	0.271 ± 0.03	0.358 ± 0.06	
				abc	ab	a	a	ab	a	a	
		2	291.5±13.44 a	1639.5 ± 16.26	1598.0 ± 41.01	0.83 ± 0.04	5.48 ± 0.11	0.916±0.02	0.261 ± 0.00	0.345 ± 0.04	
			abc	a	a	a	a	ab	a		
		4	290.0 ± 8.49 a	1554.0 ± 32.53	1564.0 ± 49.50	0.82 ± 0.28	5.19 ± 0.33	0.900±0.03	0.249 ± 0.03	0.336 ± 0.14	
			bc	ab	a	a	a	ab	a		
Cr ⁺³	1	0	247.0 ± 2.83	1678 ±26.87	1313.5 ±26.16	0.78 ±0.03 a	5.32 ± 0.40	0.863±0.03	0.273 ± 0.03	0.349 ± 0.03	
				ab	abc	ab	a	ab	a	a	
		2	247.0 ± 2.83	1618.5 ± 60.10	1371.5 ± 2.93	0.85 ± 0.01	5.55 ± 0.32	0.865±0.04	0.225 ± 0.00	0.169 ± 0.01	
				ab	abc	ab	a	ab	abc	a	
			4	265.5 ± 9.19 a	1843.5 ± 7.78	1578.0 ± 1.41	0.86 ± 0.00	5.95 ± 0.21	0.924±0.05	0.140 ± 0.01	0.181 ± 0.08
				a	ab	a	a	a	c	a	
		10	0	270.5 ± 9.19 a	1560 ±49.50	1276 ±2.83 b	0.82 ±0.02 a	5.53 ± 0.47	0.888±0.00	0.270 ± 0.03	0.359 ±0.03
				bc			a	ab	a	a	
	2		260.5 ± 0.71 a	1604.5 ± 14.85	1344.0 ± 15.56	0.84 ± 0.00	5.16 ± 0.07	0.944±0.02	0.274 ± 0.01	0.231 ± 0.00	
				abc	ab	a	a	a	a	a	
			4	263.5 ± 0.71 a	1798.5±132.23	1535.0 ± 31.52	0.85 ± 0.01	5.82 ± 0.48	0.882±0.01	0.248 ± 0.02	0.266 ± 0.02
				ab	ab	a	a	ab	ab	a	
Cr ⁺⁶	1	0	268.0 ± 5.66 a	1507.5 ±16.26	1352 ±104.6	0.82 ±0.08 a	5.32 ±0.40 a	0.886±0.00	0.272 ± 0.03	0.349 ±0.03	
				c	ab		ab	a	a		
		2	319.0 ± 9.90 a	1722 ± 114.55	1403.0 ± 24.45	0.81 ± 0.02	4.41 ± 0.53	0.924±0.00	0.175 ± 0.02	0.167 ± 0.02	
			abc	ab	a	a	a	bc	a		
		4	243.0 ± 4.24	1162.5 ± 1768	796.5 ± 187.38	0.68 ± 0.15	3.27 ± 0.71	0.914±0.02	0.268 ± 0.03	0.340 ± 0.15	
			ab	d	c	ab	b	a	a	a	
	10	0	273.5 ± 0.71 a	1646.5 ±72.83	1356.5 ±36.06	0.810 ±0.08	5.53 ± 0.47	0.896±0.01	0.273 ± 0.03	0.337 ± 0.03	
			abc	ab	a	a	a	a	a		
2		148.0 ± 0.88 b	237.0 ± 96.17	89.0 ± 28.28 d	0.38 ± 0.04	0.86 ± 0.24	0.788±0.05	0.157 ± 0.01	0.056 ± 0.04		
		e			b	b	b	c	a		

das plantas na presença de 10 mM do íon Cr^{+6} no segundo dia de tratamento induziu a diminuição na quantidade de fluorescência mínima emitida pelas clorofilas *a*. A redução nesse valor mostra uma possível redução na transferência de energia do complexo antena para o centro de reação PS II (Lui *et al.*, 2007).

A presença de Cr^{+6} em plantas afeta a estrutura dos cloroplastos (Shanker *et al.*, 2005). Em nosso experimento, as plantas submetidas a 10 mM de Cr^{+6} tiveram os valores de F_0 significativamente diminuídos já no segundo dia quando comparados aos controles.

De acordo com os dados obtidos, os valores de F_m (fluorescência máxima) variaram de 1843,5 à 237 com tendência a diminuir na presença da espécie química mais tóxica (Cr^{+6}) no decorrer do experimento. Entretanto, comparando os valores das plantas expostas a Cr^{+3} , houve um aumento significativo de F_m para as cultivadas em 1 e em 10 mM no quarto dia de experimento.

Na presença de Cr^{+6} , o declínio dos valores de F_m , bem como os de F_0 , sugere uma mudança na estrutura da membrana dos tilacóides e/ou danos irreversíveis para o PS II (Long *et al.*, 1994).

Os valores de F_v (fluorescência variável) variaram de 1598 para as plantas do controle à 89 para as plantas do tratamento com Cr^{+6} 10 mM em dois dias de tratamento. Nenhuma diferença significativa foi observada para as plantas referentes ao tratamento com Cr^{+3} 1 mM durante os quatro dias de experimento. Entretanto, as tratadas com Cr^{+3} 10 mM, apresentaram um aumento de F_v do segundo para o quarto dia.

No segundo dia de experimento, os valores de F_v foram significativamente reduzidos (aproximadamente quinze vezes) na presença de Cr^{+6} 10 mM do que na presença de Cr^{+6} 1 mM (89 e 1403, respectivamente). As reduções dos valores de F_v , sobretudo para as plantas expostas a Cr^{+6} , refletiram alterações nas variáveis F_m e F_0 afetadas pela presença da espécie química mais tóxica, sugerindo que o centro de captação de energia (sistema de antenas) da planta não possuía sua capacidade em condições ideais de funcionamento.

O componente F_v/F_m (rendimento quântico do PSII ou a eficiência quântica potencial) revela, como descrito anteriormente, o nível de estresse ao qual uma

espécie vegetal pode estar submetida. Foi estabelecido que, se a relação entre fluorescência variável e fluorescência máxima apresentar valores entre 0.77 e 0.83, em geral, as plantas são consideradas saudáveis e estão em condições normais de crescimento (sem estresse) (Linchtenthaler e Burkart, 1996).

As plantas expostas ao Cr^{+3} 1 e 10 mM apresentaram valores de F_v/F_m variando próximos da faixa de referência pré-estabelecida, sem nenhuma diferença significativa quando comparadas às plantas-controle durante todo o experimento. Entretanto, foi possível observar uma redução bastante considerável nos valores deste parâmetro quando as plantas foram expostas a 1 e 10 mM de Cr^{+6} , em quatro (0.68) e em dois dias (0.38) de tratamentos, respectivamente. Ou seja, o potencial das plantas em converter energia na forma de luz em biomassa foi drasticamente afetado na presença de Cr^{+6} , na menor concentração, já no segundo dia.

A presença de grandes quantidades de Cr^{+6} nos tecidos foliares das plantas em questão (tabela 4) pôde ter afetado a síntese de clorofilas, sobretudo a da clorofila *a* especial, responsável pelos processos de dissipação da energia luminosa absorvida.

Para plantas de *Lolium perenne* L., cultivadas em solução de Cr^{+6} , a razão F_v/F_m não foi afetada na presença de 50 a 100 μM . Um decréscimo significativo foi observado a partir de concentrações de 250 μM após 45 dias de experimento. Em 500 μM , houve um decréscimo nessa razão de cerca de 24% em relação aos controles ao final do experimento (Vernay *et al.*, 2007).

A razão F_v/F_0 fornece uma estimativa do rendimento máximo primário fotoquímico do PS II e da capacidade fotossintética. Essa razão é conhecida como boa indicadora das razões de conversão quântica fotossintética (Vernay *et al.*, 2007).

Os valores de F_v/F_0 variaram 0.86 à 5.95 para as plantas tratadas com Cr^{+6} 10 mM em dois dias e Cr^{+3} 1 mM em quatro dias, respectivamente, com média de 5.16 para os controles.

O decréscimo da razão F_v/F_0 com o aumento da concentração e o período de exposição a espécie química $+6$, resultou de um decréscimo muito mais pronunciado da variável F_v que da variável F_0 .

Cr^{+6} é um forte agente oxidante e pode causar em poucos dias danos ao aparelho fotossintético. Entretanto, Vernay e colaboradores (2007) trabalhando com *Lolium perenne* L. observaram que após um longo período de tempo (45 dias) de tratamento com Cr^{+6} em baixas concentrações (quando comparadas às utilizadas em nosso experimento), os valores de F_v/F_0 foram diminuídos em 30% para 100 e 250 μM de Cr após 30 dias de exposição. A redução mais pronunciada foi obtida com 500 μM e 45 dias (73%).

Os valores de q_p (*quenching* fotoquímico) variaram de 0.788 à 0.944, não havendo, porém, alterações significativas quando em comparação aos controles, a não ser para as plantas tratadas com Cr^{+6} 10 mM no segundo dia. Os tratamentos com Cr^{+3} 1 e 10 mM apresentaram valores variando entre 0.863 à 0.944, respectivamente, em dois dias de tratamento.

O parâmetro q_p é 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. Em outros termos, $q_p = (F'_m - F) / (F'_m - F'_0)$, onde F'_m é a fluorescência máxima quando todos os centros de reação estão fechados e adaptados a luz; F é o período dentro do qual a intensidade da fluorescência não muda enquanto parâmetros externos permanecem constantes; F'_0 é a fluorescência mínima quando todos os centros de reação estão abertos e adaptados a luz (van Kooten e Snel, 1990).

A proporção do número de centros de reação do PS II abertos, ou seja, de centros de reação oxidados, capazes de transportarem elétrons ao absorverem a energia luminosa, ou ainda, capazes de serem reduzidos, tendeu a diminuir, com o passar dos dias e com o aumento das concentrações de Cr^{+6} utilizadas. O contrário foi verificado para as plantas cultivadas em Cr^{+3} , para as quais nenhuma correlação como a anterior pôde ser estabelecida. Isto é, os valores de q_p aumentaram do segundo para o quarto dia na concentração de 1 mM. Já os valores para o tratamento com 10 mM alcançaram seu máximo no segundo dia,

voltando ao valor inicial (aproximadamente igual ao do controle) no quarto dia de experimento.

Em plantas de *L. perenne* cultivadas com Cr^{+6} , os valores deste parâmetro aumentaram em função das concentrações de Cr no meio de cultivo (250 μM e 30 dias) (Vernay *et al.*, 2007).

Os valores de q_N e NPQ (*quenchings* não-fotoquímicos) variaram durante os quatro dias de experimento de 0.274 à 0.140 e de 0.358 à 0.056, respectivamente.

Diferenças estatisticamente significativas para os valores de q_N puderam ser observadas entre todos os tratamentos durante o experimento. As plantas expostas a Cr^{+6} 10 mM apresentaram uma redução drástica de q_N no segundo dia (0.157) em relação ao controle (0.261). De acordo com os valores apresentados, as plantas tratadas com Cr^{+3} 1 mM foram mais sensíveis a q_N do que as tratadas com Cr^{+6} na mesma concentração quando comparadas com os controles. O menor valor de q_N foi observado no quarto dia de exposição a Cr^{+3} 1 mM (0.140). Para as plantas expostas a Cr^{+6} 1 mM, o menor valor foi para o segundo dia de tratamento (0.175).

Ao contrário do observado para os resultados de q_N , os valores de NPQ não mostraram nenhuma diferença estatística para os tratamentos recebidos durante todo o experimento.

Sob 100 μM de Cr^{+6} , plantas de *L. perenne* tiveram seus valores de NPQ significativamente aumentados após 30 dias de tratamento (Vernay *et al.*, 2007). Ao contrário destes resultados, plantas de *Amaranthus viridis* tiveram um decréscimo de NPQ e q_n na presença de 10 e 100 μM de Cr^{+6} durante um período de tratamento de 20 dias (Liu *et al.*, 2007).

Os quenchings não-fotoquímicos (q_N e NPQ) constituem os processos de dissipação de energia na forma de calor (região do infravermelho no espectro eletromagnético). Embora as duas variáveis expressem a dissipação de energia na forma de calor, esse processo ocorre em diferentes compartimentos do aparelho fotossintético. O q_n ocorre antes da energia luminosa ser conduzida ao centro de reação ainda aberto, ou seja, uma parte da energia absorvida é

dissipada no complexo antena pelas clorofilas que o compõe. O NPQ, porém, se dá no centro de reação do PS II quando este se encontra fechado (reduzido).

Em nosso trabalho, q_n se mostrou mais sensível que NPQ de acordo com as análises estatísticas para os tratamentos recebidos. Variações nos valores de q_n em plantas tratadas com Cr podem indicar um mecanismo de controle na membrana do tilacóide que ajusta a dissipação térmica da energia de excitação em excesso que é requerida para o metabolismo de carbono. Diversos estudos têm mostrado que o aumento ou a diminuição da dissipação térmica nas antenas do PS II compete com a transferência de energia de excitação das antenas para os centros de reação do PS II (Vernay *et al.*, 2007).

3.5.7 - Trocas Gasosas

As medidas para a confecção da curva de resposta a luz foram feitas em plantas cultivadas em solução nutritiva sem adição dos íons de Cr.

A quantidade de radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*) utilizada durante o experimento para todos os parâmetros medidos em aguapé, uma planta de ambiente ensolarado, foi definida como sendo 2000 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de acordo com o gráfico a seguir (Figura 3.6).

A figura 3.6 representa a resposta para assimilação fotossintética e condutância estomática com o aumento da *PAR*. Até 2000 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (máximo atingido pelo aparelho) houve um aumento na taxa de assimilação fotossintética, alcançado aproximadamente 16 μmol de $\text{CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A condutância estomática, no entanto, permanece quase constante para *PARs* de 500 à 2000 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, variando entre 600 e 800 mmol de $\text{H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As figuras 3.7 a, b, c e d mostram os gráficos referentes à Assimilação Fotossintética (*AF*), Carbono interno (*Ci*), Condutância estomática (*g_s*) e Evapotranspiração (*E*), respectivamente.

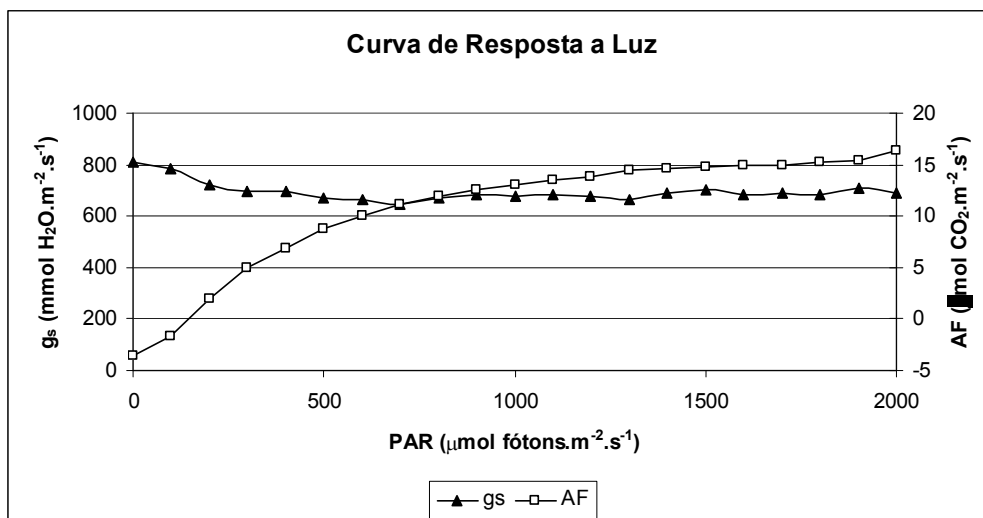


Figura 3.6 – Curva de resposta a luz para Condutância estomática e Assimilação fotossintética (eixo esquerdo e direito das ordenadas, respectivamente) pela PAR (radiação fotossinteticamente ativa) para plantas de aguapé.

Os valores de AF no tempo zero (plantas-controle) foram mantidos estáveis e com uma pequena variação, entre 20 e 22 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No segundo dia de exposição aos íons de Cr, pôde ser observado um aumento em relação ao controle para as plantas expostas a Cr^{+3} 10 mM, e, principalmente, para àquelas expostas a Cr^{+3} 1 mM. Esse padrão de comportamento se manteve para o quarto dia, porém com um pequeno decréscimo.

As plantas expostas a Cr^{+6} 1 mM tiveram sua AF significativamente reduzida no segundo dia quando comparadas ao controle. Para as plantas deste tratamento, essa taxa alcançou valores negativos no quarto dia de tratamento, indicando que os níveis das atividades respiratórias foram maiores que os níveis das atividades fotossintéticas.

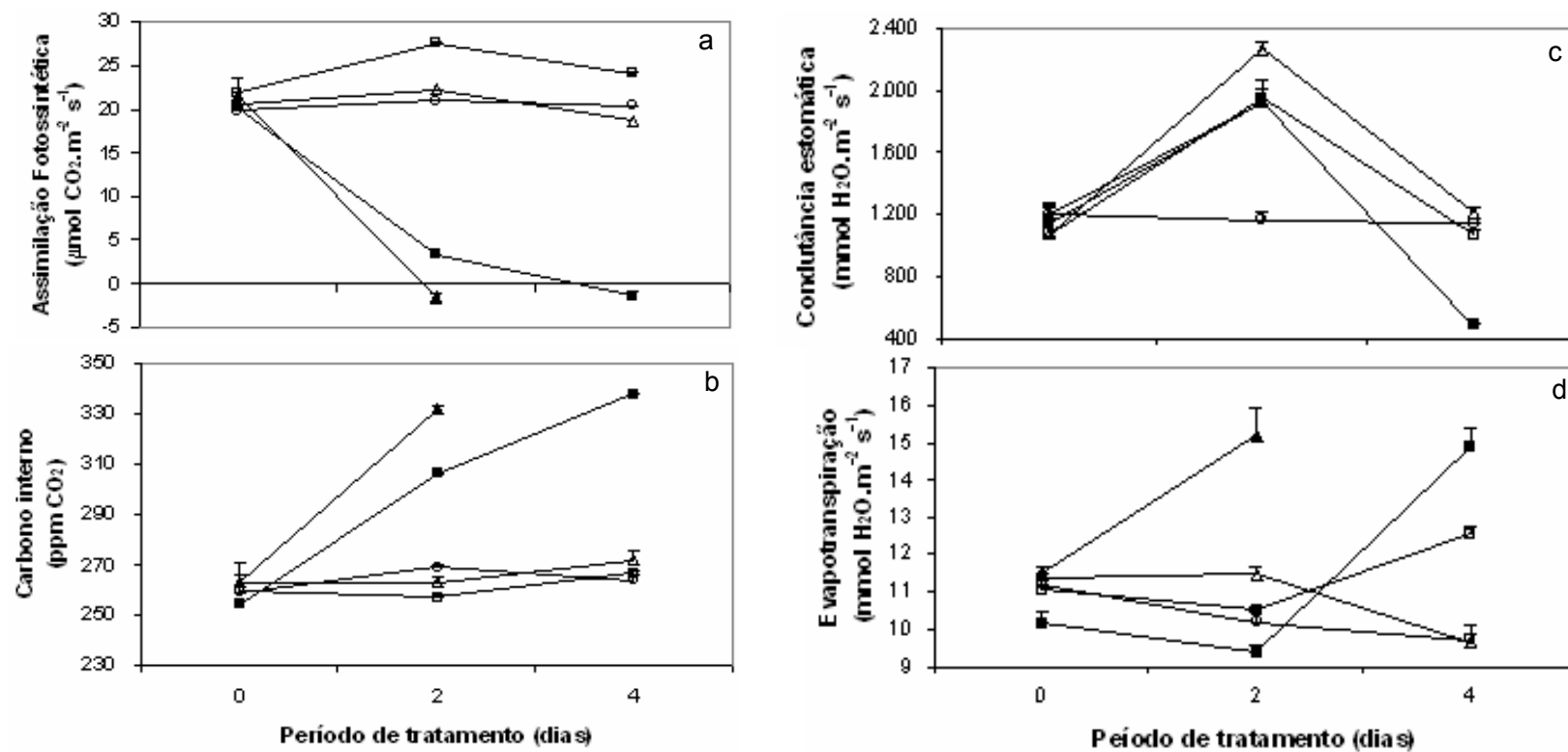


Figura 3.7 – Efeitos de Cr^{+3} e Cr^{+6} sobre a Assimilação Fotossintética (a), o Carbono interno (b), a condutância estomática (c) e a evapotranspiração (d) de plantas de aguapé. Controle (○), Cr^{+3} 1 mM (□), Cr^{+3} 10 mM (△), Cr^{+6} 1 mM (■) e Cr^{+6} 10 mM (▲). Os valores são médias \pm o desvio-padrão.

Zeid (2001) observou que em cultivo de ervilhas (*Phaseolus vulgaris*) com concentrações de 10 mM de Cr^{+3} durante quatro dias, a fotossíntese diminuiu drasticamente. Em plantas de *Lolium perenne* L., a assimilação fotossintética e o carbono interno foram afetados por concentrações de Cr^{+6} superiores a 250 μM após 45 dias de tratamento, ocorrendo um decréscimo significativo para o primeiro parâmetro, enquanto que para o segundo, um aumento em relação ao controle (Vernay *et al.*, 2007).

Os valores de g_s encontrados para as plantas-controle não apresentaram diferenças entre si durante todo o experimento, variando entre 1000 e 1300 $\text{mmol de H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Em geral, houve um aumento da g_s para todos os indivíduos expostos aos íon de Cr nas duas concentrações utilizadas após o segundo dia do experimento. O aumento mais pronunciado pôde ser observado para as plantas expostas ao Cr^{+3} 10 mM.

Após o quarto dia de tratamento, as plantas voltaram a exibir um padrão de g_s próximo as do controle, exceto para as submetidas a 1 mM de Cr^{+6} . Estas, apresentaram uma acentuada redução (aproximadamente a metade) quando comparadas as do controle.

Os indivíduos expostos a Cr^{+3} 1 e 10 mM não apresentaram modificações nos valores de E após o segundo dia de tratamento. Neste mesmo período, as plantas expostas a Cr^{+6} 1 e 10 mM apresentaram um leve declínio e um aumento significativo, respectivamente, em relação ao controle

Os indivíduos expostos à Cr^{+6} 1 mM no quarto dia de experimento apresentaram os maiores valores de evapotranspiração em relação aos controles. Com o aumento das concentrações de Cr^{+3} , porém, houve um decréscimo dos valores deste parâmetro no período de tratamento citado.

Plantas de *Amaranthus viridis* (uma planta terrestre) expostas a concentrações de 0.01, 0.1 e 1 μM de Cr^{+6} por 20 dias tiveram suas taxas de evapotranspiração diminuídas com o aumento das concentrações de Cr no meio externo (Zou *et al.*, 2006). Nossos resultados mostram uma tendência contrária ao observado por Zou e colaboradores, isto é, em concentrações crescentes de Cr^{+6} ,

houve um aumento da taxa de E . Provavelmente isso deve ao fato de que a planta de nossos estudos não apresente limitação hídrica.

Respostas de g_s para diferentes concentrações de Cr seguiram o *status* de transpiração de folhas de *L. perenne*, o qual diminuiu significativamente 30 dias após a adição de 100 μM de Cr^{+6} na solução nutritiva de crescimento das plantas. No entanto, variações significativas, com tendência a aumento dos valores referentes à C_i dentro deste período, só puderam ser observadas para concentrações de 500 μM (Vernay *et al.*, 2007).

O estresse por Cr é um dos fatores que afetam a fotossíntese em termos de fixação de CO_2 . Em plantas superiores, o efeito de Cr na fotossíntese é bem descrito, entretanto, não está muito bem esclarecido se tal efeito é devido a desorganização da estrutura dos cloroplastos, a inibição do transporte de elétrons ou a influência do Cr sobre as enzimas do Ciclo de Calvin ou uma ação conjunta sobre esse processos (Shanker *et al.*, 2005).

A provável inibição do transporte de elétrons pelos íons de Cr^{+3} em altas concentrações por curto período de tempo, assim como a exposição a Cr^{+6} em baixas concentrações e longos períodos, sugere que sejam provocados danos na estrutura dos cloroplastos, diminuindo desta forma, a taxa de assimilação fotossintética. É possível que os elétrons produzidos pelos processos fotoquímicos não sejam necessariamente usados para fixação de carbono (Lösch e Köhl, 1999).

3.6 - CONCLUSÕES

Foi possível observar durante esse experimento que as plantas cultivadas em solução contendo Cr^{+6} foram as que apresentaram maiores valores de Cr total em seus tecidos, principalmente nas raízes. Entretanto com o aumento das concentrações utilizadas (ou mesmo na menor concentração e menor período de tempo), houve uma maior translocação para as partes aéreas, que foi, sobretudo, refletido nos conteúdos de cor verde, nas respostas de emissão da fluorescência da clorofila a (F_v/F_m e F_v/F_0) e nos parâmetro de troca gasosa (AF, g_s , E e C_i).

Cr^{+3} pareceu oferecer algum estímulo às plantas, mais evidenciado para o segundo dia de tratamento que para o quarto, apesar de ter sido significativamente menos incorporado as raízes das mesmas. Seus efeitos menos tóxico, mesmo comparando a maior concentração deste com a menor de Cr^{+6} puderam ser observados nas taxas de AF e g_s .

REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

- ALMEIDA, M. G. (1998) Geoquímica de metais pesados na lagoa de Cima, RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Dissertação de mestrado em Biociência e Biotecnologia, 114p.
- AZEVEDO, N.J.M. (1988) Novos conceitos sobre eutrofização. Revista DAE, 48 (151): 22–28.
- BAGCHI, D.; STOHS, S. J.; DOWNS, B. W.; BAGCHI, M.; PREUSS, H. G. (2002) *Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium*. Toxicology, 180 (1): 5-22.
- BAIRD, C. (2002) Química Ambiental. 2. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 622p.
- BAKER, A. J. M. e BROOKS, R. R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery, 1: 81-126.
- BARLETT, R. J. (1991) *Chromium cycling in soil and water*. Links, gaps and methods. Environ. Health. Persp. 92:14-24.
- BAPTISTA, M. S. (1999) Métodos analíticos ultrasensíveis: lente térmica e técnicas correlatas. Quím. Nova, 22 (4): 14-20.
- BARRAZA, J. E. E CARBALLEIRA, A. (1999) Chlorophyll fluorescence analysis and cadmium-copper bioaccumulation in *Ulva rigida* (C. Agardh). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 15 (1-4): 395-399.
- BASSI, M.; CORRADI, M. G.; REALINE, M. (1990) Effects of chromium (VI) on two fresh water plants, *Lemna minor* e *Pistia stratiotes*, 1. Morphological observations. Cytoios, 62: 27-38.
- BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. (2004) O Comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente. Química Nova, 27 (4): 593-600.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P., BAKER, N.R. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology*. 3:497-514.

- 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*, 45 (143): 390-394.
- BURG, V. R.; LIU, D. (1993) *Chromium and hexavalent Chromium*. *J. Appl. Toxicol.* 13:225-230.
- BURZYŃSKI, M. E KŁOBUS, G. (2004) Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica* 42 (4): 505-510.
- CAMPANELI, L.B da S. (2008) Avaliação da dinâmica e contaminação por metais pesados no rio Paraíba do Sul e rio Imbé por meio de plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé), séston e sedimento. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Dissertação de mestrado em Ecologia e Recursos Naturais, 98p.
- CARVALHO, L. L. e GOMES, M. (1993) Metais pesados na biota bêntica da Baía de Sepetiba e Angra dos Reis, *Acta Limnológica Brasiliensis* VI: 222–229.
- CARVALHO, C. E. V.; OVALLE, A. R. C.; REZENDE, C. E.; MOLISANI, M. M.; SALOMÃO, M. S. M. B.; LACERDA, L. D. (1999) *Seasonal variation of particulate heavy metals in the Lower Paraíba do Sul River, R. J., Brazil*. *Environmental Geology* 37 (4): 297-302.
- CARVALHO, C. E. V.; TORRES, J. P. M. (2002) *The Ecohydrology of the Paraíba do Sul River, Southeast Brazil. The Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands*. IAHS Special Publication 6: 179-19.
- CEIVAP (Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul) – Programa de Investimento para a Gestão Integrada e Recuperação Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (2002). <http://www.ceivap.org.br> (acessado em 5 de novembro de 2007).
- CHANDRA, P. e GARG, P. (1992) Absorption and toxicity of chromium and cadmium in *Limnathemum cristatum* Griseb *Sci. Total Environ.* 125: 175-183.
- CHANDRA, P. e KULSHRESHTHA, K., (2004) Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The Botanical Review*, 70 (3), 313–327.

- CHAOUÏ, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. (1997) *Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Plant Science, 126 : 21-28.
- CHRISTOFOLETTI, A. (1981) *Geomorfologia Fluvial*. Ed. Edgard Blücher Ltda., 1:19-52.
- CORRADI, MG; BIANCHI, A; ALBASINI, A. (1993) *Chromium toxicity in Salvia sclarea L. Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development*. Environ. Exp. Bot. 33 (3): 405-413.
- D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. (2002) DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – Uma revisão. Química Nova, 25 (6): 995-1002.
- DAVIDSON, R., MAUFFETTE, Y., GAGNON, D. (2002) Light requirements of seedlings: a method for selecting tropical trees for plantation forestry. Basic Appl. Ecol. 3: 209-220.
- 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: 1-15.
- FOSTER, I.D.L. e CHARLESWOTH, S.M. (1996) *Heavy metals the hydrological cycle: trends and explanation*. Hydrological Processes, 10: 227-261.
- FORSTNER, U. e WITTMAN, G.T.W. (1983) *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer, Berlin, 486.
- FORSTNER, U. e WITTMAN, G. T. W. (1981) *Metal Pollution in the Aquatic Environment* 87, 92, Springer-Verlag: New York.
- GARG, P. e CHANDRA, P. (1990) Toxicity and accumulation in *Cerathophyllum demersum* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44: 473-478.
- GENTY, B., BRIANTAIS, J-M., BAKER, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica and Biophysica Acta, 990: 87-92.
- GODBOLD, D. L E HUTTERMANN, A. (1986) *The uptake and toxicity of Hg and lead to spruce seedlings*. Water Air and Soil Pollut. 31, 509-515.

- GONÇALVES, G.M. (2003a) Dinâmica e fluxo de metais pesados nas frações particulada e dissolvida no estuário do rio Paraíba do Sul, RJ, sob diferentes condições de maré e vazão fluvial. Tese (Mestrado e Biociências) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 110p.
- GONÇALVES, J.C.S. (2003b) Tabela atômica: um estudo completo da tabela periódica. Curitiba (PR), p. 162.
- GOPAL, B. (1987) Water hyacinth, Aquatic Plant Study, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York and Tokyo, 471p.
- 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* 44 (3): 439-446.
- GUPTA, M., SINHA, S. CHANDRA, P. (1994) Uptake and toxicity of metal in *Scripus lacustres* L. and *Bacopa monnieri* L. J. Environ. Sci. Health 29:2185-2202.
- HECKATHORN, S.A., MUELLER, J.K., LAGUIDICE, S., BARRETT, T., BLAIR, B., DONG, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91(9): 1312-1318.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. (1950) The water culture method for growing plants without soli. Berkeley: California Agriculture Station, 347 p.
- IBTEN - Instituto Boliviano de Ciência e Tecnologia Nuclear/ Centro de Investigadores Nucleares (CIN-Viacha). (2004) Método para medir el contenido de cromo en wet blue y en cuero semi-acabado.
- JAHANBAKHT, S.; LIVARDJANI, F.; JAEGER, A. (2002) An experimental ecotoxicological study and its application to the behavioural study of organic mercury (CH₃HgCl) in the environment: influence of temperature and pH. *Chemosphere*, 49: 1399-1405.
- JORDÃO, C. P.; DA SILVA, A.C.; PEREIRA, J.L.; BRUNE, W. (1999) Contaminação por Crômio de Águas de Rios Provenientes de Curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*, 22 (1): 47-51.

- JUNG, G. Y.; KIM, Y. S.; LIM, H. B. (1997) Simultaneous determination of chromium III and chromium VI in aqueous-solution by capillary electrophoresis with on-column UV-VIS detection. *Analytical Sciences*, 13 (3): 463-467.
- KEFALA, M.I.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A. (1999) *Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation*. *Environmental Pollution*, 104: 283-293.
- KORICHEVA, J. ROY, S.; VRANJIC, J. A.; HAUKIOJA, E.; HUGHES, P.R.; HANNINEN, O. (1997) *Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings*. *Environmental Pollution* 95 (2): 249-258.
- KRÄMER, U.; PICKERING, I. J.; PRINCE, R. C.; RASKIN, I.; SALT, D. E. (2000) *Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species*. *Plant Physiology*, 122: 1343-1353.
- LACERDA, L.D., TEIXEIRA, V.L. e GUIMARAES, J.R.D. (1985) *Seasonal variation of heavy metals in seaweeds from Conceição de Jacareí (RJ), Brazil*. *Botanica*, 28: 339-343.
- LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. (1998) *Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.)*. *Plant and Soil*, 200: 241-250.
- LEE, J.D. (1999) *Química Inorgânica não tão concisa*. São Paulo: Edgard Blucher, p. 360-370.
- LICHTENTHALER, H. K., RINDERLE, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 19:S 29-S 85.
- LICHTENTHALER, H. K., BURKART, S. (1996) Photosynthesis and high light stress. *Bulg. J. Plant physiol.*, 25(3-4), 3-16
- LIMA, J.A.P. (1999) "Desenvolvimento e performance de detectores para o estudo das propriedades térmicas e ópticas de líquidos". (Tese de Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Centro de Ciência e Tecnologia - Campos/RJ, 113p.

- LIU, D., ZOU, J., WANG, M., JIANG, W. **(2007)** Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2007.04.045.
- LONG, S. P., HUMPHRIES, S., FALKOWSKI, P. G. **(1994)** Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 633-662.
- LÖSCH, R., KÖHL, K. I. **(1999)** Plant respiration under the influence of heavy metals, in: Prasad, M. N. V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants – From Molecules to Ecosystems*. Springer, Berlin, pp. 139-156.
- LOU, L-Q., SHEN, Z-G., LI, X-D. **(2004)** The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* 51: 111–120.
- LYTLE, C.M.; LYTLE, F.W. ; YAN G , N.; QIAN, J.H.; HANSEN, D.; ZAYED, A.; TERRY, N. **(1998)** *Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by Wetland Plants: Potential for In Situ Heavy Metal Detoxification*. *Environ. Sci. Technol.* 32: 3087-3093.
- MALAVOLTA, E. **(1994)** Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo, Produquímica, 153 p.
- MANFRINATO, E.S. **(1991)** O aguapé – fatos e fofocas. In: *Problemas Ambientais Brasileiros*, Fundação Salim Farah Maluf, p. 109-112.
- MANGABEIRA, P.A.O.; LABEJOF, L.; LAMPERTI, A; ALMEIDA, A.A.F.; OLIVEIRA, A.H.; ESCAIG, F.; SEVERO, M.I.G.; SILVA, D. C.; SALOES, M.; MIELKE, M.S.; LUCENA, E.R.; MARTINS, M.C.; SANTANA, K.B.; GAVRILOV, K.L.; GALLE, P.; LEVI-SETTI, R. **(2004)** *Accumulation of chromium in root tissues Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. In Cachoeira river, Brazil*. *Applied Surface Science* 231-232, 497-501.
- MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil*, 165: 261 – 274.
- MATTOS, E. A., GRAMS, T. E. E., BALL, E., FRANCO, A. C., HANG-KERWER, A, HERZOG, B., SCARANO, F. R., LÜTTGE, U. **(1997)** Diurnal patterns of chlorophyll a fluorescence and stomatal conductance in species of two types of coastal tree vegetation in southeastern Brazil. *Trees* 11: 363-369.

- MAXWELL, K., JOHNSON, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659-668.
- MAZEN, A.M.A. e EL MAGHRABY, O.M.O. (1998) *Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance*. *Biologia Plantarum*, 40(3): 411-417.
- MCGRATH, S. P. (1982) The uptake and translocation of tin and hexavalent chromium and effects on the growth of oat in flowering nutrient solution and in soil. *New Phytol.* 92:381-390.
- MENCH, M.; MARTIN, E.; SOLTA, P. (1994) *After effects of metals derived from a highly metal-polluted sludge on maize (Zea mays L.)*. *Water Air Soli Pollut* 75: 277-291.
- MILACIC, R.; STUPAR, J.; KOZUH, N.; KOROSIN, J. (1992) Critical evaluation of three analytical techniques for the determination of chromium (VI) in soil extracts. *Analyst.*, 117: 125-130.
- MITHÖFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, 566: 1- 5.
- MOHANTY, K.; MOUSAN JHA, B.C.; MEIKAP, M.N.B. (2006) *Biosorption of Cr(VI) from aqueous solutions by Eichhornia crassipes*. *Chem. Engin. Journal*, 117: 71-77.
- MOLISANI, M. M. (1999) *Geoquímica de metais pesados associados ao sedimento de fundo da porção inferior e estuário interno do rio Paraíba do Sul, RJ*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Dissertação de mestrado em Biociência e Biotecnologia, 64p.
- MONNET, F., VAILLANT, N., VERNAY, P., COUDRET, A., SALLANON, H., HITMI, A. (2001) Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J. Plant Physiol.* 158, 1137-1144.
- MORAES, D. S.L.; JORDÃO, B.Q. (2002) *Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana*. *Ver. Saúde Pública*, 36 (3): 370-374.
- NETO, H. B., GRANER, C. A. F., PEZZATO, L. E., PADOVANI, C. R. (2005) *Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo*

- método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Ciência Rural*, 35 (3): 691-697.
- NIES, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 51: 730-750.
- NUNES, J R. da S. (2003) Dinâmica temporal e espacial de nutrientes na biomassa de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms no sistemas de baías Chacororé-Sinhá Mariana, Pantanel Mato-grossense, Barão de Melgaço, MT. Cuiabá/MT. Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT/Instituto de Biociência) - Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, 87p.
- ODJEGBA, V. J. e FASADI, O. I. (2007) Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. *Environmentalist*, 27: 349-355.
- OUZOUNIDOU, G., MOUSTAKAS, M., ELEFThERIOU, E. P. (1996) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 154–160.
- PANDA, S. K. (2003) Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in *Taxithelium* sp. *Curr. Sci.* 84:631-633.
- PANDA, S.K.; PATRA, H, K. (1997) *Physiology of chromium toxicity in plants – A Review.* *Plant. Physiol. Biochem.* 24 (1):10 -17.
- PANDA, S. K. E PATRA, H. K. (1998) Alteration of nitrate reductase activity by chromium ions in excised wheat leaves. *Ind. J. Agric. Biochem.* 2(2) 56-57.
- PANDA, S. K. E PATRA, H. K. (2000) Does Cr (III) produces oxidative damage in excised wheat leaves. *J. Plant biol.* 27(2):105-110.
- PANDA, S. K. E KHAN, M. H. (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. *J. Plant Biol.* 30:23-29.
- PANDA, S.K. e CHOUDHURY, S. (2005) *Chromium stress in plants.* *Braz. J. Plant Physiol.*, 17 (1): 95-102.
- PANDA, S. K. e CHOUDHURY, S. (2004) Changes in nitrate reductase (NR) activity and oxidative stress in moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc toxicity. *Braz. J. Plant Physiol.* (Submitted).

- PANDA, S. K., CHOUDHURY, I., KHAN, M. H. (2003) Heavy metals induce lipid peroxidation and effects antioxidants in wheat leaves. *Biol. Plant.* 46:289-294.
- PEREIRA, M.O. (2004) Análise de metais pesados em água e sedimento de fundo do rio Paraíba do Sul por fluorescência de raios-x por reflexão total com radiação síncrotron (sr-txfr). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Dissertação de mestrado, 110p.
- POMPÊO, M.L.M. (1996) Culturas hidropônicas, uma alternativa não uma solução. *Anais Sem. Reg. Ecol.*, São Carlos, SP, 8: 73-80.
- PRADO, C. H. B. A., WENHUI, Z., ROJAS, M. H. C., SOUZA, G. M. (2004) Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1): 7-16.
- PRASAD, M. N. V., MALEC, P., WALOSZEK, A., BOJKO, M., STRZALKA, K. (2001) Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci.* 161, 881-889.
- POTT, V.J. e POTT, A. (2000) Plantas Aquáticas do Pantanal. EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS). – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 404p.
- PRASAD, M. N. V. (1995) *Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants.* *Environmental and Experimental Botany*, 35 (4): 525-545.
- RALPH, P. J., BURCHETT, M. D. (1998) Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environ. Pollut.* 103:91-101.
- REEVES, R. D. e BAKER, A.L.M. (2000) Metal-accumulating plants. In: ZHANG, X-H.; LIU, J.; HUANG, H-T.; CHENG, J.; ZHU, Y-N.; WANG, D-Q. (2007) Chromium accumulation by hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*, 67: 1138-1143.
- SALOMÃO, M.S.M.B. (1999) Dinâmica de metais pesados nas frações particulada e dissolvida na porção inferior do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro. Tese (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82p.
- 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*. *Hidrol. Process.*, 15: 587-593.
- SATYAKALA, G. e JAMIL, K. **(1992)** Chromium-induced biochemical changes in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms e *Pistia stratiotes* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 921-928.
- SCHNEIDER, I.A.H.; RIBIO, J. MISRA, M. SMITH, R. **(1995)** *Eichhornia crassipes* as biosorbent for heavy metal ions. *Minerals Engineering*, 8 (9): 979-988.
- SCOCCIANI, V.; CRINELLI, R.; TIRILLINI, B.; MANCINELLI, V.; SPERANZA, A. **(2006)** Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings. *Chemosphere*, 64: 1695–1703.
- SEMADS - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **(2001)** Bacias Hidrográficas da MRA-4. Volume 5. In: ____. *Bacias Hidrográficas e Rios Fluminenses. Síntese informativa por macrorregião ambiental*. Rio de Janeiro. Cap.3. p.29-33.
- SEN, A. K.; MONDAL, N.G.; MONDAL, S. **(1987)** Studies of uptake and toxic effects of Cr (VI) on *Pistia stratiotes*. *Water Sci. Technol.* 7: 119-127.
- SHANKER, A. K.; CERVANTES, C.; TAVERA, H .L.; AVUDAINAYAGAM, S. **(2005)** Chromium toxicity in plants. *Environmental International*, 31: 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* 58, 595-604.
- SINHA, S., SAXENA, R., SINGH, S. **(2002)** Comparative studies on accumulation of chromium from metal solution and tannery effluent under repeated metal exposure by aquatic plants: Its toxic effects. *Environ. Monitor. Assess.*, 80: 17-31.
- SIKOVE, M.; FRANKO, M.; CRUZ, F. D.; KATZ, S.A. **(1996)** Thermal lens spectrometric determination of hexavalent chromium. *Analytical Chemica Acta*, 330: 245-250.
- SMART, R. M., BARKO J. W. **(1985)** Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquat. Bot.* 21: 251-263.

- SOUZA, C.V. e LORENZI, H. (2005) Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 158.
- SPEISER, D.M.; ABRAHAMSON, S.L.; BANUELOS, G.; OW, D.W. (1992) *B. juncea produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex*. Plant Physiol., 99:817-821.
- STAVES, R. P. E KNAUS, R. M. (1985) *Chromium removal from water by three species of duckweeds*. Aquatic Botany, 23 (3): 261-263.
- TOPPI, L. S.; FOSSATI, F.; MUSETTI, R.; MIKEREZI, I.; FAVALI, M. A. (2002) *Effects of hexavalent chromium on maize, tomato, and cauliflower plants*. Journal of Plant Nutrition, 25 (4): 701-717.
- 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, pp.195-205.
- UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. (2002). A bacia do rio Paraíba do Sul <http://www.hidro.ufrj.br> (acessado em 15 de agosto de 2006).
- VAJPAYEE, P., RAI, U. N., ALI, M. B., TRIPATI, R. D., YADAV, V., SINHA, S., SINGH, S. N. (2001) Chromium – induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluents. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 67:246-256.
- 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 41:1075-1082.
- VAJPAYEE, P., SHARMA, S. C., RAI, U. N., TRIPATI, R. D., YUNUS, M. (1999) Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaetm. Chemosphere 39:2159-2169.
- VAN ASSCHE, F. V., CLIJSTERS, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13, 95-206.

- VAN KOOTEN, O., SNEL, J. F. H. **(1990)** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- VARDANYAN, L. G. e INGOLE, B. S. **(2006)** Studies on heavy metal accumulation in macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environmental International*, 32: 208-218.
- 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. *Chemosphere* 68, 1563-1575.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R.A. **(2001)** *Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues*. *Phytochemistry* 57 (7): 701-710.
- VOGELI-LANGE, R. e WAGNER, G. J. **(1990)** *Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves*. *Plant Physiology* 92: 1086-1093.
- WALSH, A. E O'HALLORAN, J. **(1996)** Chromium speciation in tanney effluent – I. An assessment of techniques and the role of organic Cr(III) complexes. *Wat. Res.*, 30 (10): 2393-2400.
- WELCH, R. M. **(1995)** *Micronutrient nutrition of plant*. *Crit. Rev. Plant Sci*, 14: 49-82.
- WONG, S-C., COWAN, I. R., FARQUHAR, G. D. **(1985)** Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation III: Influences of water stress and photoinhibition. *Plant Physiol.* 78, 830-834.
- ZAYED, A. M., LYTLE, C. M., QIAN, J. H., TERRY, N. **(1998)** Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* 206, 293-299.
- ZEID, M. **(2001)** Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biol. Plant.*, 44: 111-115.
- ZHANG, X-H.; LIU, J.; HUANG, H-T.; CHENG, J.; ZHU, Y-N.; WANG, D-Q. **(2007)** Chromium accumulation by hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*, 67: 1138-1143.

ZOU, J.; WANG, M.; JIANG, W.; LIU, D. (2006) Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *amaranthus viridis* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botânica, 48 (1): 7–12.

ANEXOS

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos medidos no rio Paraíba do Sul (Alto, Médio e Baixo RPS) e rio Imbé ao longo de dois anos de coleta ao final da estação seca (setembro/outubro) e chuvosa (março). As medidas de temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido foram feitas *in situ*.

		rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
Parâmetros físico-químicos		estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006
1º ano de coleta	Temperatura ambiente (°C)	23,0	28,1	20,4	31,5	24,3	30,0	21,0	31,2
	Temperatura da água (°C)	20,4	26,1	22,8	29,6	25,4	27,7	22,5	27,6
	Condutividade da água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	27,4	21,5	76,0	53,4	102	126,4	151	120,3
	pH da água	6,25	5,59	7,76	7,00	6,86	6,84	6,72	6,47
	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,74	4,82	6,87	5,53	5,40	11,8	5,40	11,6
		rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS	
Parâmetros físico-químicos		estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007
2º ano de coleta	Temperatura ambiente (°C)	24,8	32,6	26,0	25,0	23,0	25,9	21,0	22,0
	Temperatura da água (°C)	22,5	33,4	24,0	25,0	23,0	25,0	21,8	22,0
	Condutividade da água ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	28,5	23,0	86,3	50,5	81,0	57,2	98,0	103
	pH da água	6,30	6,53	7,10	6,46	6,41	7,02	6,32	6,95
	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,50	7,72	6,55	6,21	4,60	5,69	4,50	3,93

Tabela 8 – Concentração média de Fe ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria seca) nas diferentes partes do aguapé (pecíolo e limbo foliares, raízes jovens e adultas) coletados em quatro pontos de coleta (rio Imbé, Alto, Médio e Baixo rio Paraíba do Sul) ao final de duas estações do ano (meses de setembro/outubro na estação seca e março na estação chuvosa) em dois anos de coleta. Análise estatística (Tukey, $p < 5\%$): letras maiúsculas representam a estatística para a mesma estação do ano entre os diferentes pontos de coleta (A, B, C, D, fundo escurecido compara com fundo escurecido, fundo claro compara com fundo claro); letras minúsculas representam comparação entre as partes da planta em um mesmo ponto e mesma estação do ano (a, b, c); Y e Z representam a comparação entre as estações dos anos para um mesmo ponto de coleta.

Fe	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS		
	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	estação seca 2005	estação chuvosa 2006	
1º ano de coleta	Partes do vegetal								
	Limbo foliar	490 ± 40,3 AcY	56,5 ± 11,2 DcZ	519 ± 8,13 AcY	218 ± 12,9 BcZ	149 ± 40,0 BcZ	347 ± 33,5 AbY	133 ± 16,5 BcY	31,0 ± 6,16 CbZ
	Pecíolo foliar	373 ± 27,2 AcY	15,7 ± 5,11 DcZ	364 ± 19,8 AcY	102 ± 11,9 BcZ	110 ± 19,1 BcZ	285 ± 6,13 AbY	108 ± 3,24 BcY	95,0 ± 12,3 BbY
	Raiz jovem	10561 ± 102 CbY	3706 ± 0,00 CbZ	21918 ± 231 AbY	5774 ± 322 BbZ	13856 ± 99,1 BbZ	14685 ± 198 AaY	5691 ± 76,40 DbY	173 ± 0,00 DbZ
Raiz adulta	18337 ± 164 BaY	8815 ± 0,00 BaZ	31122 ± 2191 AaY	6913 ± 149 BCaZ	19901 ± 679 BaY	13656 ± 396 AaZ	9345 ± 103 CaY	5044 ± 851 CaY	
Fe	rio Imbé		Baixo RPS		Médio RPS		Alto RPS		
	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	estação seca 2006	estação chuvosa 2007	
2º ano de coleta	Partes do vegetal								
	Limbo foliar	226 ± 1,26 CbY	91,0 ± 5,69 BcZ	351 ± 8,28 BcY	273 ± 14,1 AcZ	429 ± 6,91 AcY	121 ± 2,81 BcZ	138 ± 9,59 DcY	107 ± 8,70 BcY
	Pecíolo foliar	157 ± 5,43 BbY	88,0 ± 8,83 CcZ	413 ± 9,01 AcZ	661 ± 31,8 AcY	430 ± 24,5 AcY	286 ± 16,4 BcZ	129 ± 13,9 BcY	97,0 ± 13,3 CcY
	Raiz jovem	4153 ± 81,0 CaY	3275 ± 193 CbZ	16256 ± 397 AbY	7081 ± 862 BbZ	9876 ± 851 BbY	9980 ± 111 AbY	1502 ± 11,6 DbZ	5864 ± 194 BbY
Raiz adulta	4057 ± 155 DaZ	8062 ± 561 CaY	20607 ± 680 AaY	9889 ± 140 BCaZ	16016 ± 158 BaZ	23890 ± 1173 AaY	7884 ± 260 CaZ	13090 ± 729 BaY	