

CAMILLA REIS AUGUSTO DA SILVA

EFEITOS DA DRENAGEM ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO
(DAM) SOBRE A MORFOANATOMIA, ULTRAESTRUTURA
E ECOFISIOLOGIA DE *Eleocharis laevigulumis*
(CYPERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Ana
Claudia Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. José
Bonomi Barufi

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Camilla Reis Augusto
Efeitos da Drenagem Ácida de Mina de Carvão sobre a
morfoanatomia, ultraestrutura e ecofisiologia de
Eleocharis laevigulmis (Cyperaceae) / Camilla Reis Augusto
Silva ; orientadora, Ana Claudia Rodrigues ; coorientador,
José Bonomi Barufi. - Florianópolis, SC, 2015.
71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Macrófitas,
metais pesados. I. Rodrigues, Ana Claudia. II. Bonomi
Barufi, José. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e
Plantas. IV. Título.

Folha assinaturas

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai Celestial pela vida maravilhosa que Ele me deu, por todas as oportunidades, pela capacidade de realizar tantas coisas e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho que me ajudaram a chegar até aqui.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio e compreensão durante todas as fases da minha vida. Por sempre demonstrarem interesse pelos meus trabalhos, mesmo quando não entendiam. Obrigada por nunca permitirem que eu duvidasse da minha capacidade e por me ensinarem, através de seus exemplos, a ser uma pessoa melhor a cada dia. Amo vocês eternamente!

À minha orientadora, Prof.^a Ana Claudia Rodrigues e ao meu Co-orientador, Prof. José Bonomi Barufi, pela orientação, paciência, dedicação e todo o conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos. Muito obrigada!!

Às amigas e colegas do LAVEG, especialmente Geniane Schneider (Geni), Isabel Brandalise (Isabelita), Márcia, Ana Paula, Roberta e Elisa Poltronieri, obrigada pela amizade, pelas incansáveis conversas, risadas e companhia no laboratório, muitas vezes até tarde da noite, mesmo quando não tinham mais nada para fazer. Um muito obrigado também à Lidiane Gouvêa por toda ajuda prestada. Tudo se tornou mais fácil com a ajuda de vocês!

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas e CAPES, pela bolsa concedida.

Aos Laboratórios que disponibilizaram a estrutura e ajuda técnica para realização das análises, o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), em especial à Eliana Medeiros, Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) e Laboratório de Ficologia (LAFIC).

A todos que não mencionei e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

A atividade de mineração é considerada impactante para o meio ambiente devido principalmente aos rejeitos gerados como a drenagem ácida de mina (DAM), rica em metais pesados, a qual em contato com as plantas pode desencadear respostas fisiológicas e alterações em níveis estruturais e ultraestruturais. No presente estudo espécimes da macrofita *Eleocharis laeviglumis*, encontrada naturalmente em ambiente contaminado e não contaminado por DAM, foram cultivados em laboratório sob dois tratamentos: DAM (+) solo e água contaminados por DAM e DAM (-) solo e água não contaminados por DAM. O experimento teve a duração de seis semanas e foram analisados os seguintes parâmetros: taxa de crescimento, atividade fotossintética a partir da fluorescência da clorofila *a*, quantificação de açúcares solúveis totais e amido, determinação dos metais presentes nos tecidos da raiz, rizoma e escapo por meio de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), análises morfoanatômicas, qualitativas e quantitativas e ultraestruturais do escapo. As análises em EDS mostram que *E. laeviglumis* retêm grande parte dos metais nas raízes e rizomas, impedido maior translocação dos mesmos para as partes aéreas, os quais aparecem em quantidades menores. As análises da atividade fotossintética, a partir da fluorescência da clorofila *a*, evidenciaram que o valor da eficiência fotossintética (α_{ETR}), do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e o rendimento quântico efetivo Y(II), apesar de variarem significativamente entre os tratamentos, indicam que os indivíduos de DAM (+) não estão estressados. A análise ultraestrutural dos cloroplastos também não evidenciou anormalidade nos cloroplastos destes indivíduos. Os valores de intensidade de saturação (I_k) e de dissipação regular de energia não-fotoquímica Y(NPQ) foram menores nos indivíduos cultivados em DAM (+) indicando que tais plantas estão sendo menos eficientes nos mecanismos de fotoproteção, o que também pode ser confirmado pelas análises morfoanatômicas as quais mostraram que os indivíduos cultivados em DAM (+) tem menor desenvolvimento do tecido fotossintetizante, menor taxa de crescimento, menor área do escapo e aumento da densidade

estomática. De acordo com os resultados obtidos *E. laevigulumis* pode ser considerada espécie tolerante a DAM pois apresenta características adaptativas ao ambiente contaminado podendo ainda ser considerada planta candidata para utilização em técnicas de fitorremediação.

PALAVRAS-CHAVES: macrófitas, metais pesados, escapo, raiz, rizoma, EDS

ABSTRACT

Mining activity is considered impactful for the environment mainly due to the waste generated as acid mine drainage (AMD), rich in heavy metals, which in contact with the plants can trigger physiological responses and changes in structural and ultrastructural levels. In the present study specimens of macrophyte *Eleocharis laeviglumis* naturally found in contaminated and uncontaminated by AMD environment, were cultured in the laboratory under two treatments: AMD (+) soil and water contaminated with AMD and AMD (-) soil and water not contaminated by AMD. The experiment lasted for six weeks and the following parameters were analyzed: growth rate, photosynthetic activity from chlorophyll fluorescence a , quantification of total soluble sugars and starch, determination of metals in tissues of the root, rhizome and scape through Spectroscopy Energy Dispersive (SED), morph anatomical analysis, qualitative and quantitative ultrastructural the scape. The SED analysis shows that *E. laeviglumis* retain much of the metals in the roots and rhizomes, prevented most of them for translocation aerial parts, which appear in minor amounts. Analysis of the photosynthetic activity from the chlorophyll fluorescence a , showed the value of photosynthetic efficiency (α_{ETR}), the maximum quantum yield (F_v/F_m) and the effective quantum yield Y(II), although significantly vary between treatments, indicate that individuals AMD (+) are not stressed, The ultrastructural analysis of chloroplasts which showed no abnormality in the chloroplasts of these individuals. The saturation intensity values (I_k) and regular non-photochemical dissipation power Y(NPQ) were grown in smaller individuals AMD (+) indicates that such plants are less effective in photoprotection mechanisms, which may also be confirmed by analysis morph anatomical which showed that the cultivated individuals in AMD (+) is less development of photosynthetic tissue, lower growth rate, the lower area of the scape and increased stomatal density. According to the results *E. laeviglumis* tolerant species may be considered as AMD has adaptive features to the contaminated environment may still be

considered a candidate for use in plant phytoremediation techniques.

KEYWORDS: macrophytes, heavy metal, scape, root, rhizome, SED

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Coleta do material.....	16
2.2 Delineamento experimental.....	20
2.3 Coleta de dados abióticos.....	20
2.4 Taxa de crescimento (TC) do escape.....	22
2.5 Análises fisiológicas.....	22
2.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	26
2.7 Estudos morfológicos.....	27
2.8 Estudos anatômicos – Microscopia de luz.....	27
2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	29
2.10 Análises estatísticas	29
3. RESULTADOS	30
3.1 Parâmetros abióticos	30
3.2 Taxa de crescimento (TC) do escape.....	30
3.3 Análises fisiológicas.....	31
3.4 Análise dos órgãos vegetativos com EDS.....	41
3.5 Estudo morfológico.....	46

3.6 Estudo anatômico.....	46
4.DISSCUSSÃO	54
5.REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração de carvão é muito importante para a geração de energia elétrica e para a siderurgia, entretanto, é tida como uma das atividades mais impactantes ao meio ambiente desde a exploração e beneficiamento dos minérios, deposição de rejeitos nos solos até as atividades industriais que utilizam o carvão e seus subprodutos (Scheibe, 2002; Almeida, 2002).

Um dos principais problemas apresentados durante as etapas de lavra e beneficiamento do carvão é a transformação dos rejeitos, principalmente da pirita, formando a drenagem ácida de mina (DAM) (Mello e Abrahão, 1998). Nesse processo, o sulfeto, oriundo da pirita, é inicialmente oxidado, em seguida é catalisado por bactérias, gerando altas concentrações de metais dissolvidos, tais como, ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), além de sulfatos. Quando não controlada, a DAM pode alcançar os corpos hídricos causando mudanças substanciais nos ecossistemas aquáticos (Alexandre, 1999), constituindo fonte difusa de poluição (Motta Marques *et al.*, 1997).

De acordo com Khan *et al.*, (2005), nos ecossistemas aquáticos, os metais e outros compostos tendem a se acumular no sedimento e, dependendo das condições ambientais, podem ser liberados na coluna d'água tornando-se biodisponíveis, afetando a biota. Ao serem absorvidos pelas plantas podem desencadear respostas fisiológicas e alterações em níveis estruturais e ultraestruturais (Lux *et al.*, 2004, Wójcik *et al.*, 2005) tais como redução dos tecidos fotossintéticos, da região meristemática da raiz e do comprimento e diâmetro dos elementos de vasos, assim como danos ao aparato fotossintético podendo ocasionar a morte dos organismos (Lux *et al.*, 2004).

Segundo Baker (1981), as plantas apresentam estratégias básicas que permitam o seu desenvolvimento em ambientes com níveis tóxicos de metais, podendo ser classificadas em: i, *acumuladoras*, em que os metais ficam concentrados na parte aérea da planta; ii, *indicadoras*, onde o transporte de metais para a parte aérea é regular, de modo que a concentração interna de metais reflete os níveis externos; e iii, *excluseras*, onde não ocorre transporte regular do metal, sendo na raiz encontrado um provável mecanismo de retenção. No caso da terceira alternativa, níveis críticos de concentração do metal podem resultar em quebra do mecanismo, ocorrendo o transporte do metal pela

planta sem restrições. De acordo com o mesmo autor, com exceção das espécies exclusoras, a maioria das espécies vegetais, crescendo em ambientes contaminados por metais pesados, não consegue evitar a absorção desses elementos, mas somente limitar sua translocação. Segundo Schat (2000), essas espécies, podem apresentar diversos mecanismos específicos conferindo a tolerância tais como i, *redução* da absorção pelas raízes; ii, *imobilização* de íons tóxicos nas paredes celulares, evitando assim um possível transporte via apoplasto; iii, *quelação* dos metais no citoplasma por meio de agentes *quelantes*, macromoléculas orgânicas ou inorgânicas, que se ligam a íons metálicos; e iv, *compartimentalização* e formação de complexos com ácidos orgânicos e inorgânicos no vacúolo (Larcher, 2004).

O sistema radicular de plantas terrestres e aquáticas, fixas ao substrato, é o primeiro órgão a entrar em contato com a contaminação por metais pesados, podendo apresentar mudanças na estrutura e organização de seus tecidos (Vaculík, 2012). Segundo Barceló e Poschenrieder (1999), os metais absorvidos pela raiz são transportados via apoplasto e encontram na exoderme a sua primeira barreira de translocação, e na endoderme, o principal filtro de difusão e regulação, constituindo as principais barreiras apoplásticas das raízes. Já no estelo, os metais seguem essencialmente via xilema e, em suas relações com as células vizinhas, podem induzir alterações no próprio sistema vascular reduzindo o diâmetro dos elementos de vasos do xilema, uma vez que em concentrações menores, alcançam as folhas, podendo reduzir os tecidos do mesofilo (Li *et al.*, 2011) e alterar a estrutura e a funcionalidade do aparato fotossintético (Van Assche e Clijsters, 1990).

Várias espécies de macrófitas podem apresentar alta taxa de crescimento e capacidade de absorver e concentrar poluentes metálicos, muitas vezes sem apresentar sintomas de intoxicação (clorose ou necrose) mesmo em elevados níveis de intoxicação (Motta Marques *et al.*, 1997; Alvarenga *et al.*, 2007). Tais espécies estão inseridas no grupo das plantas as quais podem apresentar diversos mecanismos específicos permitindo a tolerância a metais pesados (Schat *et al.*, 2000).

As macrófitas se caracterizam pelo crescimento em/ou próximas aos corpos d'água em ambientes lóticos ou lênticos com as mais diversas características químicas, físicas e biológicas

Entre os representantes das macrófitas, encontram-se espécies da família cosmopolita Cyperaceae Juss, considerada a terceira maior família em diversidade de espécies entre as monocotiledôneas, com cerca de 104 gêneros e mais de 5000 espécies (Goetghebeur, 1998). No território brasileiro, ocorrem aproximadamente 608 espécies, correspondendo cerca de 15% dos representantes da família ocorrentes no mundo (Alves *et al.*, 2009). Segundo Cook (1996) 31 gêneros têm representantes de macrófitas, os quais colonizam principalmente ambientes lânticos (França *et al.*, 2003; Matias *et al.*, 2003). Dentre estes gêneros destaca-se o gênero *Eleocharis* R. Br. que possui aproximadamente 200 espécies normalmente aquáticas e anfíbias (Diego-Pérez, 1997), ocorrendo em brejos, cachoeiras, lagoas, lagos, margens de rios, pântanos, restingas, solos úmidos de locais abertos (Faria, 1998), ou em locais que estão temporariamente inundados (Trevisan *et al.*, 2012).

O gênero *Eleocharis* vem recebendo atenção devido a utilização de algumas espécies para a remoção de metais pesados do solo ou água contaminada. González-Elizondo *et al.* (2005) evidenciaram que *Eleocharis arsenífera* S. González, J. A. Tena e T. Alarcón acumula arsênio em elevadas concentrações em seus tecidos, sendo classificada como uma planta tolerante a arsênio. Ha *et al.* (2011) expondo *Eleocharis acicularis* (L.) Roem. & Schult, em laboratório, a diferentes concentrações de Na, Ag, Pb, Cu, Cd, Zn, observou grandes concentrações desses metais acumulados em suas raízes, indicando que a espécie é uma forte candidata para trabalhos de fitorremediação. O mesmo foi observado por Lottermoser (2011) em *Eleocharis equisetina* C. Presl, coletadas em águas ácidas resultante de minas abandonadas na Austrália, que apresentou capacidade de reter elevadas concentrações de diversos metais em seus órgãos subterrâneos e podendo ser considerada eficaz para a fitorremediação.

Souza *et al.* (2009) verificaram alterações anatômicas e fisiológicas em duas espécies de macrófitas, *Polygonum ferrugineum* Wedd. (Polygonaceae) e *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Amaranthaceae) submetidas à diferentes concentrações de Cd (cádmio). Em *P. ferrugineum* observaram acúmulo de Cd nas folhas, caule e raiz, além de alterações nas lacunas do aerênquima, aumento no número de tricomas glandulares nas folhas, compactação do mesófilo e

alteração na taxa fotossintética. *A. philoxeroides* se mostrou mais tolerante, apresentando alterações apenas em nível celular, acumulando quantidade significativa de Cd nas raízes, sendo considerada como fitoextratora, devido à sua capacidade de acumular Cd no sistema radicular, sem afetar, consideravelmente, as trocas gasosas foliares.

No município de Siderópolis, localizado no estado de Santa Catarina, ocorrem lagoas ácidas proveniente das antigas cavas de mineração a céu aberto, as quais recebem DAM, entre elas, encontra-se a lagoa “Língua do Dragão” que apresenta águas com elevadas concentrações em metais, área considerada crítica devido aos diversos contaminantes presentes (Moura, 2014). A vegetação de macrófitas presente na lagoa está restrita a uma única espécie, *Eleocharis laeviglumis*, a qual é caracterizada como rizomatosa, áfila, com escapos perenes cilíndricos não septados, único órgão fotossintetizante, os quais quando reprodutivos portam espiguetas cilíndricas, agudas e esverdeadas (Trevisan e Boldrini, 2006). Devido à reprodução vegetativa através do sistema subterrâneo, a espécie ocupa grande área em volta da lagoa.

A remoção dos metais pesados é de fundamental importância para a recuperação de ambientes aquáticos degradados, mas para a seleção de espécies apropriadas visando a regeneração de áreas contaminadas e o uso em programas de biomonitoramento da poluição, um pré-requisito básico é o entendimento das bases fisiológicas e estruturais de resistência aos metais pesados pelas plantas presentes nesses ambientes.

Em função de tais aspectos, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da DAM sobre as características morfoanatômicas, ultraestruturais e ecofisiológicas de *Eleocharis laeviglumis*, destacando possíveis mecanismos ou características que permitem sua sobrevivência no referido ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material

Indivíduos de *Eleocharis laeviglumis* (Cyperaceae), foram coletados na Lagoa Língua do Dragão, ambiente contaminado por drenagem ácida de mina (DAM), localizada no município de Siderópolis, Sul do Estado de Santa Catarina (28°35'40.77"S; 49°27'37.93") (Fig. 1A). A lagoa Língua do Dragão recebe a drenagem dos efluentes provindos da Vila Funil, possuidores de

grande quantidade de metais pesados, principalmente de Fe, resultantes do beneficiamento do carvão minerado na mina do Cantão com elevada quantidade de óxido de ferro resultando na cor alaranjada da água e do substrato (Fungaro e Izidoro, 2006) (Fig. 1B-D). Esta lagoa recebe ainda a contribuição superficial externa de outras lagoas ácidas oriundas das antigas cavas de mineração a céu aberto, formadas principalmente por pilhas de estêreis e depósitos de rejeitos.

Como parâmetro, pode-se citar estimativas de pH entre 2,8 a 3,0, implicando em águas muito ácidas (Neves e Sambugaro, 2007). Moura (2014) analisando os índices de metais na água e solo da Lagoa Língua do Dragão, observou que o Fe ocorre em maior concentração em relação a todos os metais analisados, tanto na água ($140,8 \text{ mg.L}^{-1}$) como no solo ($>20000,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Na água, observou ainda que a concentração de manganês e zinco ultrapassou aproximadamente 200 vezes o limite permitido para água doce e o níquel ultrapassou 15 vezes o limite máximo de acordo com a Resolução Conama 357/2005. No solo, o referido autor, também detectou altos índices de chumbo e zinco.

Foram coletados substrato e água contaminados por DAM, os quais foram transportados em sacos plásticos e galões de polietileno, respectivamente, até as instalações do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis.

Substrato arenoso livre de contaminação por drenagem ácida de mina foi coletado na Lagoa Pequena, localizada no bairro do Rio Tavares, em Florianópolis (SC) (Fig. 2A), situado numa faixa paralela ao mar (Fig. 2B), aonde *E. laevigulumis*, também ocorre naturalmente. Sob a cobertura arenosa encontra-se o Aquífero Campeche, formando a Bacia Hidrogeológica do Campeche, a qual aflora formando a Lagoa Pequena com águas consideradas levemente ácidas (Tirelli, 2007). (Fig. 2B-D). Não existem na área rios, ribeirões ou riachos, evidenciando que a Lagoa é a parte perceptível do lençol freático abastecido pelas águas da chuva (Barbosa, 2007).

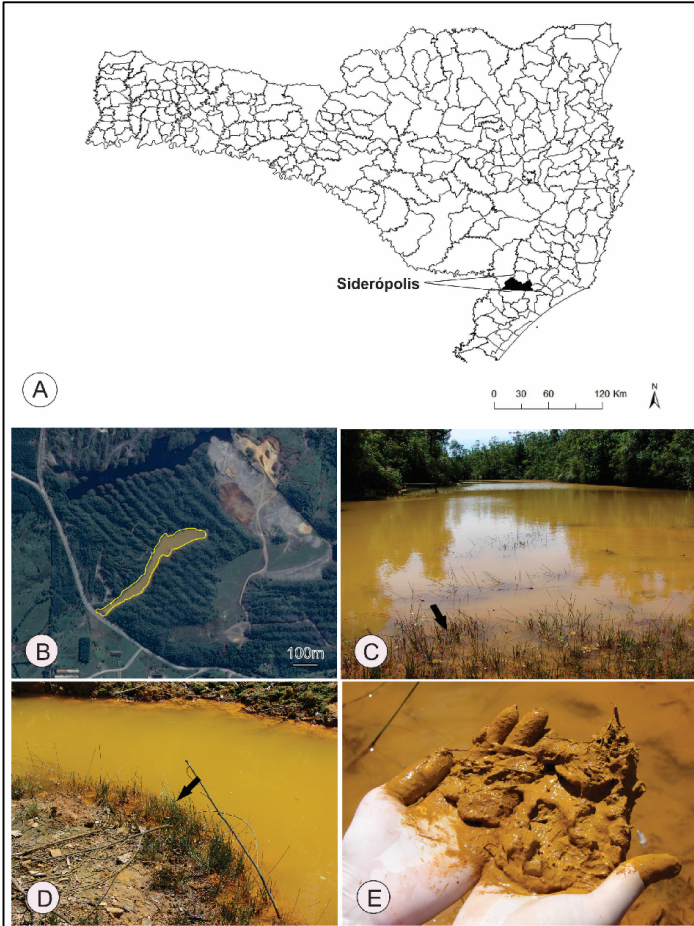


Figura 1: (A) Localização do município de Siderópolis na região sul do Estado de Santa Catarina; (B) Imagem de satélite da lagoa Língua do Dragão, (C) e (D) Detalhes das margens da Lagoa indicando a ocorrência de *Eleocharis laevigumis* R. Trevis. e Boldrini (setas pretas). (E) Detalhe do solo da Lagoa mostrando a cor alaranjada em decorrência da elevada concentração de óxido de ferro proveniente do beneficiamento do carvão.

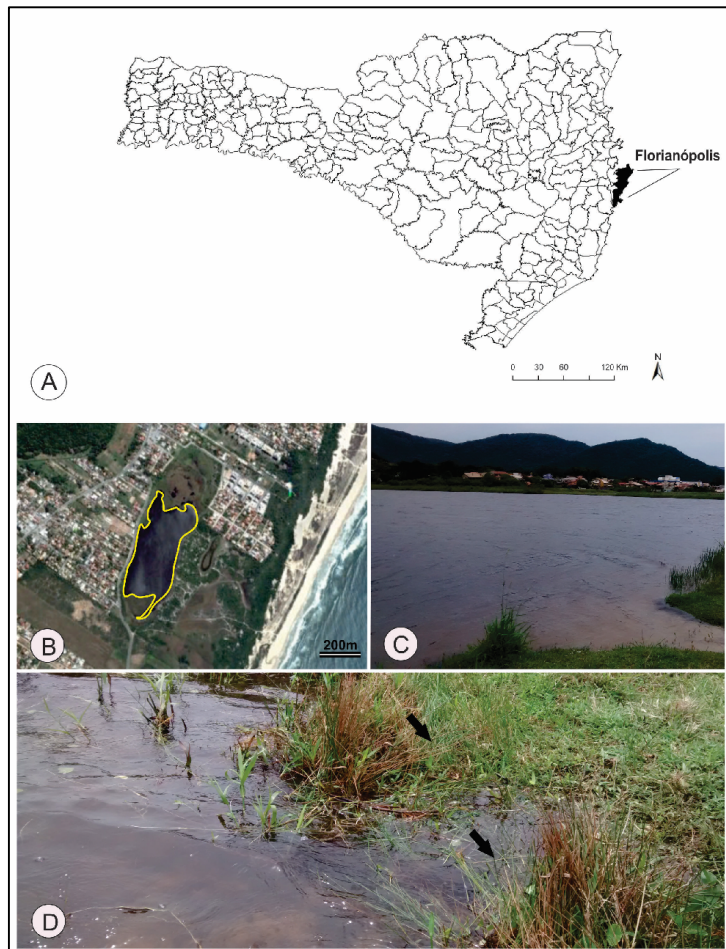


Figura 2: (A) Localização do município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. (B) Imagem de satélite da Lagoa Pequena localizada no bairro Rio Tavares, em Florianópolis. (C) Visão geral de uma das margens da lagoa. (D) Presença de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e *Boldrini* (setas pretas) crescendo juntamente com outras espécies de macrófitas.

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Catarina simulando duas condições distintas: i, DAM (+), contendo indivíduos de *E. laeviglumis*, oriundos da lagoa Língua do Dragão, cultivados em substrato e água contaminados por DAM; e ii, DAM (-), contendo indivíduos de *E. laeviglumis*, também oriundos da lagoa Língua do Dragão, cultivados em substrato e água não contaminados por DAM, oriundos da Lagoa Pequena.

Para configuração do delineamento experimental, foram utilizados oito aquários de 50 x 30 x 25 cm, sendo quatro para a condição DAM (+) e quatro para a condição DAM (-) (Fig. 3A-C). Para cada aquário foram selecionados cinco indivíduos, aparentemente bem desenvolvidos, totalizando vinte indivíduos por tratamento. Nos aquários da condição DAM (-), os indivíduos foram previamente lavados para retirada do substrato contaminado.

Bombas instaladas, independentemente em cada aquário, faziam a circulação da água pelo período de seis horas por dia, três horas no período da manhã e três horas no final do dia (Fig. 3D-E). A duração do experimento foi de seis semanas no período de março a abril/2014.

2.3 Coleta de dados abióticos

Durante o experimento, diariamente foram coletados dados como temperatura e pH da água e valores de irradiância, utilizando Termômetro, pHmetro de bancada (Labmeter PHS-3B) e quantômetro (LICOR LI-1400), respectivamente. Todos os parâmetros foram avaliados entre 8h às 9h da manhã.

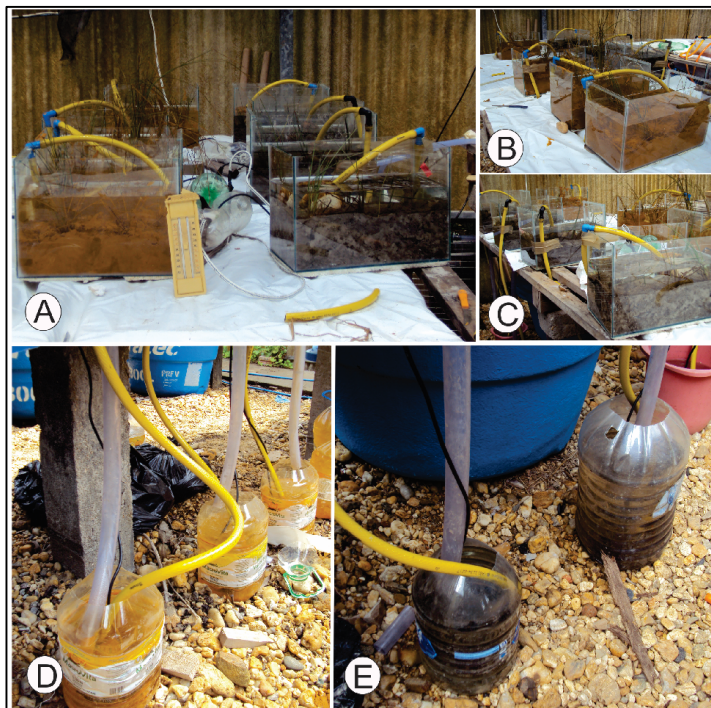


Figura 3. Experimento montado em casa de vegetação para acompanhamento dos indivíduos de *Eleocharis laevigumis* R. Trevis. e Boldrini crescendo em diferentes condições. (A) Vista geral dos aquários. (B) Aquários simulando o ambiente contaminado por Drenagem Ácida de Mina (DAM). (C) Aquários simulando o ambiente não contaminado por DAM. (D-E) Vasilhames com bombas que realizavam circulação da água nos respectivos aquários.

2.4 Taxa de crescimento (TC) do escapo

As taxas de crescimento, para avaliar o desenvolvimento dos indivíduos de *E. laeviglumis* foram determinadas a partir das medidas do comprimento dos escapos, as quais foram realizadas a cada cinco dias, em todos os indivíduos de *E. laeviglumis* presentes nos aquários, em ambos os tratamentos, utilizando-se fita métrica. Os valores foram inseridos na fórmula $TC = [(MFf/Mfi)^{(1/T)} - 1] * 100$ (Lignell e Pedersén, 1989) onde TC= Taxa de Crescimento, MFf= Medida de comprimento final, Mfi= medida de comprimento inicial e T= Tempo (dias) entre F (final) e I (inicial). Os dados obtidos foram apresentados em % dia⁻¹.

2.5 Análises fisiológicas

2.5.1 Análises da atividade fotossintética a partir da fluorescência da clorofila *a*

Através de medições da emissão de fluorescência da clorofila *a*, é possível detectar as respostas fotossintéticas ao estresse antes mesmo que os sintomas morfológicos (murcha, necrose e clorose) tornem-se visíveis (Tsimilli-Michael e Strasser, 2008; Kuckenberg *et al.*, 2009). Para isso, a emissão de fluorescência da clorofila *a* do escapo de *E. laeviglumis* foi avaliada com auxílio do fluorímetro de pulso com amplitude modulada (JUNIOR-PAM Fluorometer; Walz, Mess-und Regeltechnik, Germany) equipado com fibra plástica, com 50 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro e luz de led azul com comprimento de onda de emissão máxima de 465nm. Duas frequências de modulação (5 e 10Hz) e luz actínica de energia modulada, atingindo até 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ajustável em 12 níveis diferentes foram usadas.

Para obtenção das medidas de fluorescência da clorofila *a* foram aplicados pulsos de saturação e curvas de luz, usando as opções “SAT – Pulse” e “Rapid Light Curve” (RLC) na região mediana dos escapos de *E. laeviglumis*. A aplicação dos pulsos e a realização das curvas foram realizadas no período matutino (7h às 11h). Primeiro foram realizados os pulsos de saturação na região mediana dos escapos, em seguida, na mesma região, os escapos foram aclimatados ao escuro por 20 minutos para a realização posterior das curvas de luz. As curvas de luz foram obtidas com a aplicação de uma série de 12 pulsos de luz saturante (LS), cada um deles seguidos de uma exposição de luz actínica (LA) crescente (0 - 1501 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}\text{PAR}$). As

medidas foram realizadas uma vez por semana sempre no mesmo período do dia (7h) e mesmo espaço de tempo, sendo realizado 3 pulsos e uma curva em cada escapo selecionado (n=20) por tratamento.

Os valores de F_o (Fluorescência mínima da planta aclimatada ao escuro); F_t (Fluorescência mínima da planta pré-aclimatada a luz), F_m (Fluorescência máxima da planta aclimatada ao escuro, o máximo que a planta pode suportar), F_m' (Fluorescência máxima da planta pré-aclimatada a luz). Foram utilizados para calcular os parâmetros de dissipação fotoquímicos e não-fotoquímicos através das seguintes equações:

- rendimento quântico máximo (F_v/F_m)

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

- rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$)

$$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t) / F_m'$$

- dissipação regular de energia não-fotoquímica pelo fotossistema II, refere-se a perda de energia controlada na forma de calor Y(NPQ)

$$Y(NPQ) = (F_m - F_m') / F_m$$

- dissipação não-regular de energia não-fotoquímica pelo fotossistema II Y(NO),

$$Y(NO) = F_t / F_m$$

- Taxa de transporte de elétrons no aparato fotossintetizante (ETR).

$$ETR = \Delta F/F_m' \cdot I \cdot Abst \cdot 0,5$$

Para permitir comparações entre os tratamentos, os valores adquiridos de cada curva de luz de Y(II) e dos parâmetros dissipativos Y(NPQ) e Y(NO) foram calculados usando a regra do trapézio proposta por Scherner *et al.*, (2012), os dados foram apresentados como Y(II), Y(NPQ) e Y(NO) Área.

Onde o valor de $\Delta F/F_m'$ foi obtido em diferentes intensidades de PAR de irradiância "I", "Abst." corresponde a absorvância de *E. laeviglumis*, o valor 0,5 é acrescentado à fórmula por corresponder ao fracionamento do total de clorofila *a* entre os PSI e PSII.

Para se obter o valor de Absortância (Abst.), com quantômetro (LICOR LI-1400), o sensor de leitura foi posicionado fixamente para a medida da irradiância (PAR) da luz ambiente obtendo-se o valor de I_0 . Utilizado do mesmo sensor, escapos de *E. laeviglumis*, foram posicionados no sensor de modo a obter-se o valor de I_F , que se refere a quantidade de luz transmitida através dos escapos detectado pelo sensor. A partir desses dados, foram calculados os valores de absortância (Abst.) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Abst.} = 1 - (I_F/I_0)$$

Os valores de ETR foram obtidos por fórmula anteriormente citada e as curvas de ajuste foram realizadas de acordo com a fórmula de Webb *et al.* (1974);

$$\text{ETR} = \text{ETR}_{\text{max}} [1 - e^{(-\alpha \cdot I/\text{ETR}_{\text{max}})}]$$

Os valores do ETR_{real} foram calculados a partir dos dados dos pulsos de acordo com a fórmula:

$$\text{ETR}_{\text{real}} = Y(\text{II}) * \text{PAR (Luz ambiente)} * \text{Abst.}$$

Por meio do ajuste do ETR x Irradiância, foi possível obter outros parâmetros fotossintetizantes como; valor de I_k (irradiância de saturação), ETR_{max} (Transporte máximo de elétrons) e α_{ETR} (parâmetro para estimar a eficiência fotossintetizante).

2.5.2 Quantificação de clorofila e carotenóides

Para a determinação da clorofila e carotenóides, amostras do escapo de *E. laeviglumis* coletadas no primeiro dia e ao final do experimento foram armazenadas em tubos criogênicos e conservadas em nitrogênio líquido até o momento das análises. Posteriormente, as amostras foram pesadas e de cada réplica (n=4) foram retirados 100mg para dosagem de clorofila e extração/quantificação de carotenóides. A extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo Ritchie (2006, 2008). Amostras de 100 mg de peso fresco da região mediana do escapo foram macerados em eppendorf, com auxílio de Nitrogênio líquido (N₂ liq.). A extração foi realizada com acetona 90% com solução saturada de hidróxido de carbono de magnésio (C₄Mg₄O₁₂) a fim de remover qualquer acidez na acetona. O extrato foi mantido em Eppendorf e centrifugado durante 20 min a 3.500 rpm. A absorbância do sobrenadante foi

lida em espectrofotômetro (Bioespectro - SP 220) nos comprimentos de onda 480 nm, 510 nm, 647 nm, 664 nm e 750 nm.

Os teores de clorofila (a, b e total) e carotenoides foram calculados de acordo com as equações (Ritchie, 2006)

$$CI\ a = 11,867 * (A664 - A750) - 1,786 * (A647 - A750)$$

$$CI\ b = 18,978 * (A647 - A750) - 4,895 * (A664 - A750)$$

$$\text{Carotenóides} = 10 * (A480 - A750)$$

2.5.3 Quantificação de açúcares solúveis totais

Foram realizadas a quantificação de açúcares solúveis totais do escapo, rizoma e raiz, coletados no início e ao final do experimento de acordo com Shanon (1968). As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido (50 mg – massa fresca) e maceradas, com 2 mL da solução MCW (metanol:clorofórmio:água) (12:5:3, v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 20°C) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (5 minutos, 4000 rpm a 20°C). Os sobrenadantes foram reunidos, adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e o extrato foi novamente centrifugado. A fase superior dos extratos foi coletada e utilizada para análise dos açúcares. A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit e Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectro fotômetro (Bel Spectro - LGS53). A quantificação dos açúcares solúveis totais foi feita a partir da curva padrão de glucose (1 a 200 µg. mL⁻¹- r²= 0,99; y= 0,0139x). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

Para obtenção dos valores de massa seca, 20 amostras de cada órgão (escapo, rizoma e raiz) foram pesados e colocados em estufa a 40°C sendo pesados todos os dias até atingirem um peso constante, para assim ser determinado o valor da massa seca. Com esses valores, foi obtido um fator de conversão (Massa Fresca – Massa Seca). Este fator de conversão foi utilizado para se obter o valor de gramas de massa seca por mL por meio da fórmula:

$\text{gMS/ml (massa seca/ml)} = \text{MF(massa fresca/g)/Fator de conversão (MF-MS)/Volume do solvente usado.}$

Os resultados obtidos em massa fresca nas análises, foram multiplicados pelo valor obtido pela fórmula acima e assim convertidos em massa seca.

2.5.4 Quantificação de amido

Para a quantificação do teor de amido do escapo, rizoma e raiz, coletados no início e ao final do experimento, utilizou-se a metodologia descrita por McCready *et al.*, (1950). Ao resíduo da centrifugação do extrato estabelecido conforme o item 2.6.3, foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm a 20°C) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 minutos, 4000 rpm a 20°C). Os sobrenadantes foram reunidos. A dosagem do amido foi realizada de acordo com o método de Umbreit e Burris (1964). Aliquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectro fotômetro (Bel Espectro - LGS53). A quantificação de amido foi feita a partir da curva padrão de glucose (0,02 a 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ - $r^2= 0,99$; $y= 0,1695x$). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca. Valores de massa seca obtidos como descrito no item 2.6.3.

2.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A MEV com EDS permite que sejam identificados os diferentes tipos de metais pesados ocorrentes no tecido vegetal, neste caso, foi utilizado para identificar a ocorrência de metais pesados nos diferentes tecidos de *E. laevigulumis* tratadas e não com DAM. Cortes transversais da região medianas dos órgãos (raiz, rizoma e escapo) coletados ao término dos experimentos DAM (+) e DAM (-), foram lavadas em água corrente, em seguida em água extra pura e logo depois fixadas em Formalina Neutra Tamponada (FNT) (Johansen, 1940) por 48 horas. Após foram lavadas em água destilada três vezes por 30 minutos cada lavagem, em seguida foram desidratadas em série etílica crescente até álcool etílico 100% e submetidas ao ponto crítico de

CO₂ em CDP 03 (Leica, Heidelberg, Germany). As amostras secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face e cobertas com 20 nm de carbono em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. As amostras foram analisadas através da microanálise, para a caracterização de materiais metálicos, com detector de raio-X (EDS) em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM-6390LV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de Universidade Federal de Santa Catarina. Nas amostras, em cada tecido analisado, foram selecionados três pontos para a realização das análises (n=3). Para cada tratamento usou-se três réplicas por aquário de cada órgão (escapo, rizoma e raiz) totalizando dozes repetições por tratamento.

2.7 Estudos morfológicos

Para a determinação da área do escapo, foram mensurados o comprimento e o diâmetro do escapo com o auxílio fita métrica e paquímetro digital (Steinless hardenedv) e os valores aplicados na fórmula: $A_t = 2\pi rh + 2 \cdot (\pi \cdot r^2)$, onde A_t é a área total; π é uma constante equivalente a 3,14; r é o raio e h , a altura. Os dados obtidos foram apresentados em cm².

2.8 Estudos anatômicos – Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos em microscopia óptica, foram coletadas amostras dos escapos, ao final do experimento, de ambos os tratamentos, DAM (+) e DAM (-) as quais foram fragmentadas em porções menores, com auxílio de lâmina barbear, fixadas em formalina neutra tamponada (FNT) (Lillie, 1948 *apud* Kraus e Arduin, 1997) em bomba à vácuo por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas cinco vezes em água destilada por 15 minutos cada, submetidas ao processo de desidratação etílica gradual, e armazenadas em álcool etílico 70%.

2.8.1. Análises qualitativas

Para analisar diferentes compostos presentes nos tecidos do escapo, as amostras previamente fixadas, foram seccionadas transversalmente, com auxílio de lâminas de barbear, usando suporte de isopor. Foram realizados os seguintes testes

histoquímicos: Sudan III, para lipídios e paredes cutinizadas (Foster, 1949), floroglucina em meio ácido, para lignina nas paredes celulares (Johansen, 1940), cloreto férrico, para substâncias fenólicas (Johansen, 1940) e Lugol para amido (Johansen, 1940).

2.8.2 Análises quantitativa

Para as análises quantitativas, amostras do escapo previamente fixado, foram infiltradas em hidroxietilmetacrilato (historesina Leica), de acordo com a metodologia modificada de Arnold *et al.* (1975). Os blocos foram seccionados transversalmente com espessura de 5 μm em micrótomo (Leica, RM 2125 RT) do Laboratório de Anatomia Vegetal UFSC. Em seguida, as secções foram coradas com azul de toluidina pH 5,8. (O'Brien *et al.*, 1964). Foram mensuradas a altura das células epidérmicas e a espessura da parede periclinal externa destas, a espessura total do parênquima paliçádico e a altura das células da camada do parênquima paliçádico, utilizando-se a captura das imagens pelo microscópio óptico Leica DM 2500 com câmera QColor 3C da Q-imaging acoplada as quais foram analisadas pelo *software* Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging. Também foi mensurada a proporção total de aerênquima do escapo, em secção transversal, através do *software* ImageJ versão 1.32 (Rasband, 2008), através da fórmula: $PA = A_a \cdot 100/A_t$ onde PA = Proporção do aerênquima e A_a = área total do aerênquima e A_t = área do órgão em seção transversal, os resultados foram expressos em %.

Para a classificação dos estômatos e densidade estomática, foram obtidas dissociações paradérmicas da região mediana do escapo, foram dissociadas usando a metodologia modificada de Franklin (1945). O material foi corado com safranina 1% (Bukatsch, 1972) e montado em lâmina semi-permanente. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* (Leica Application Suit 3.7.0) sendo selecionados 3 campos por amostras. A partir de imagens adquiridas em microscópio óptico acima citado numa área total conhecida, no aumento de 200x, foi estimado o número de estômatos por mm^2 do escapo, por meio da razão entre o número de estômatos pela área total estabelecida.

2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises em MET, amostras de regiões mediana do escapo adulto, foram pré-fixadas em temperatura ambiente por 10 horas, em solução de glutaraldeído 2,5 %, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2. Em seguida as amostras foram lavadas quatro vezes, no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 4h, sob temperatura ambiente (Bozzola e Russel, 1991). Posteriormente, o material foi lavado três vezes, no mesmo tampão e uma vez em água destilada por 30 minutos para cada lavagem e foram desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), em intervalos de 30 minutos para cada etapa, sendo trocada três vezes na acetona 100%. Seguiu-se posteriormente a infiltração em resina Spurr (Spurr, 1969) em 7 etapas, num período de 12 horas para cada etapa, após a última infiltração, o material foi emblocado em moldes de silicone, em estufa a 70° C por 24 h. Secções ultrafinas da região mais periférica do escapo foram feitas com ultramicrotomo RMC acoplado com navalha de diamante. As grades com as secções foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com os procedimentos de Reynolds (1963). As secções foram observadas e as imagens capturadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) Joel (JEM) 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80Kv) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variâncias por meio do teste de Chochran e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) bifatorial (Tempo, Tratamento e Tempo*Tratamento) com grau de significância de 5%. Quando necessário um teste a posteriori (Newman Keuls) foi realizado para separação de médias, com um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com auxílio dos programas Microsoft Excel e Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.).

3.RESULTADOS

3.1 Parâmetros abióticos

Os valores médios de pH, temperatura da água e irradiância obtidos durante as seis semanas de experimento em ambos os tratamentos, DAM (+) e DAM (-), estão representados na tabela 1.

Os valores do pH oscilaram entre as semanas do experimento em ambos os tratamentos, ressaltando que no tratamento DAM (+) apesar da variação, o pH ácido se manteve do começo ao final do experimento. As médias de temperatura da água foram semelhantes entre os tratamentos, sendo os maiores valores registrados na 4ª e 5ª semana, os quais estão relacionados com aumento da irradiância que também apresentou valores mais elevados nas mesmas semanas.

Tabela 1: Média dos valores dos parâmetros abióticos: pH e Temperatura da água nos aquários e Irradiância na localidade dos aquários, avaliados em ambos os tratamentos, DAM (+) e DAM (-), durante as seis semanas de experimento. na = não analisado

Semanas	Parâmetros pH (água)		Temperatura (Água) °C		Irradiância ($\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
	DAM (+)	DAM (-)	DAM (+)	DAM (-)	
1ª	3,1 ± 0,09	5,6 ± 0,32	27,3 ± 0,94	27,3 ± 0,10	na
2ª	2,0 ± 0,10	6,2 ± 0,21	26,5 ± 0,71	27,6 ± 0,92	94,2 ± 4,52
3ª	3,4 ± 0,08	5,5 ± 0,36	27,8 ± 0,92	26,7 ± 0,54	88,6 ± 3,87
4ª	2,8 ± 0,20	5,7 ± 0,18	28,2 ± 0,08	27,7 ± 0,58	111,9 ± 8,54
5ª	2,1 ± 0,09	5,4 ± 0,35	28,1 ± 0,57	28,3 ± 0,12	132,8 ± 7,48
6ª	2,2 ± 0,10	5,3 ± 0,23	26,7 ± 0,73	27,2 ± 0,69	103,7 ± 4,92

3.2 Taxa de crescimento (TC) do escape

Os espécimes de *E. laeviglumis* do tratamento DAM (-) apresentaram maior taxa de crescimento durante o período de seis semanas em relação aos espécimes do tratamento DAM (+) (Fig. 4).

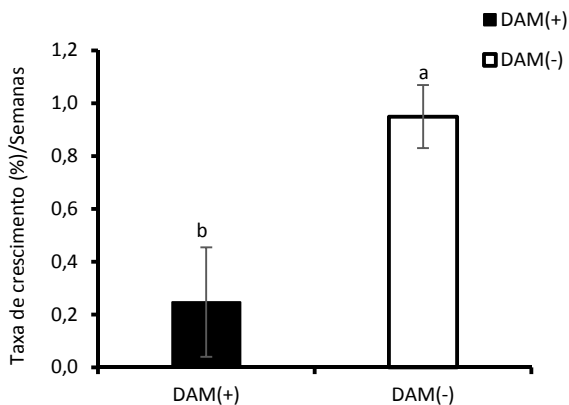


Figura 4: Médias gerais das taxas de crescimento (TC, em %) de *Eleocharis laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini, crescendo em substrato contaminado com Drenagem Ácida de Mina – DAM (+) e não contaminado – DAM (-). As letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

3.3 Análises fisiológicas

Os resultados das análises fisiológicas podem ser observados na tabela 2 com os valores da análise de variância-ANOVA.

Os parâmetros fisiológicos relacionados à atividade fotossintética a partir da fluorescência da clorofila *a* avaliados nos indivíduos de *E. laeviglumis*, variaram significativamente ao longo do experimento. Respostas dos fatores tempo, tratamento e tempo*tratamento apresentaram resultados significativos com exceção para ETR_{real} que não foi significativo entre os tratamentos, Y(NO) Pulso que só foi significativo em relação ao tempo, Y(NPQ) Pulso em relação tempo*tratamento (Tab. 2). Os parâmetros pigmentos Chla, Chlb, Chltotal e Carotenoides totais,

foram avaliados somente no fator tratamento apresentando resultado significativo para os parâmetros Chla e Chlt.

Tabela 2: Resultado da ANOVA bi fatorial para cada variável dependente, em função das variáveis independentes tempo e tratamento. Os dados foram obtidos em *Eleocharis laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini ao longo do experimento. Os efeitos significativos são apresentados pelos valores de F e p ($< 0,05$) em negrito.

Parâmetros	Tempo				Tratamento				Tempo*Tratamento			
	gl	F	MS	p	gl	F	MS	p	gl	F	MS	p
ETR _{max}	5	19,70	820,8	0,000	1	5,48	129,7	0,033	5	35,40	1178,4	0,000
α_{ETR}	5	6,40	0,001	0,000	1	13,82	0,0112	0,000	5	1,73	0,0021	0,001
I _k	5	6,77	6010	0,000	1	22,12	3433	0,000	5	18,73	1753	0,000
F _v /F _m	5	28,4	0,0088	0,000	1	7,2	0,0022	0,007	5	2,90	0,0009	0,014
Y(II) Área	5	35,59	25601	0,000	1	0,48	346	0,491	5	7,42	5341	0,000
Y(NO) Área	5	89,84	28834	0,000	1	31,04	99652	0,000	5	4,08	13105	0,003
Y(NPQ) Área	5	164,9	29409	0,000	1	40,05	71400	0,000	5	4,41	7873	0,002
ETR _{real}	5	472,0	786,1	0,000	1	93,9	156,4	0,06	5	71,7	119,4	0,000
Y(II) Pulso	5	15,6	0,0127	0,000	1	4,4	0,003	0,036	5	5,6	0,0046	0,000
Y(NO) Pulso	5	4,15	0,0049	0,003	1	0,90	0,001	0,346	5	1,10	0,0013	0,371
Y(NPQ) Pulso	5	3,63	0,0015	0,007	1	6,49	0,002	0,014	5	1,83	0,0008	0,124
Chla	-	-	na	-	2	17,25	0,116	0,000	-	-	na	-
Chlb	-	-	na	-	2	1,29	0,087	0,309	-	-	na	-
Chl total	-	-	na	-	2	6,41	0,364	0,012	-	-	na	-
Carotenóides	-	-	na	-	2	1,950	0,049	0,184	-	-	na	-
Açúcar/Escape	-	-	na	-	2	69,47	0,000	0,000	-	-	na	-
Açúcar/Rizoma	-	-	na	-	2	635,25	0,000	0,000	-	-	na	-
Açúcar/Raiz	-	-	na	-	2	1,0	0,000	0,438	-	-	na	-
Amido/Escape	-	-	na	-	2	2,18	0,002	0,195	-	-	na	-
Amido/Rizoma	-	-	na	-	2	1,68	0,038	0,262	-	-	na	-
Amido/Raiz	-	-	na	-	2	24,73	0,013	0,001	-	-	na	-

Legenda: gl. Graus de liberdade. ETR_{max}= taxa máxima de transporte de elétrons, α_{ETR} = eficiência fotossintética, I_k = irradiância de saturação, F_v/F_m = rendimento quântico máximo, YII= fotossíntese efetiva, Y(NO) = dissipação não-regular de energia não-fotoquímica, Y (NPQ) = dissipação regular de energia não-fotoquímica, Área= Valores obtidos nas curvas de luz (plantas aclimatadas ao escuro) e Pulso= Valores obtidos nos Pulsos de saturação (plantas não aclimatadas ao escuro), Chla = clorofila a, Chlb = clorofila b, Chltotal = clorofila total, na = dados não analisados

Os valores do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) do aparato fotossintetizante de *E. laeviglumis* no experimento, apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) (Tab. 2). Observou-se que em relação ao fator tempo, ao longo do experimento, o F_v/F_m se manteve constante e com valores próximos aos obtidos inicialmente, apenas se diferenciando em relação ao valor inicial na 2ª e 5ª semana. Entre os tratamentos, somente na 4ª semana pode-se observar diferença entre o DAM (+) e DAM (-) (Fig. 5).

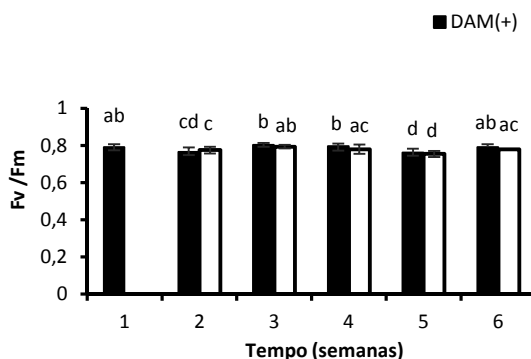


Figura 5: Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) de *Eleocharis laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini inicial e ao longo de 5 semanas de cultivo com solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado - DAM (-). As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

A fotossíntese efetiva $Y(II)$, energia não-fotoquímica $Y(NO)$ e dissipação regular de energia não-fotoquímica $Y(NPQ)$ calculadas com os valores das curvas de luz, onde as plantas foram aclimatadas ao escuro, apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) (Tab. 2). Em $Y(II)$ observou-se um aumento significativo nos valores dos tratamentos em relação aos valores obtidos inicialmente mantendo-se sempre mais elevado no decorrer das semanas, sendo observado o mesmo padrão, para $Y(NO)$ e para $Y(NPQ)$ (Fig. 6A). Os valores da $Y(II)$ variaram em relação ao inicial, mas mantiveram-se constantes entres os

tratamentos ao longo do experimento, com exceção para a 4ª semana, onde os valores em DAM (+) foram maiores que em DAM (-) (Fig. 6A). Na dissipação não-regular de energia não-fotoquímica $Y(NO)$ os valores no tratamento DAM (+) mantiveram-se constantes durante as semanas, com exceção das 3ª e 6ª semanas cujos valores foram elevados. No DAM (-) a 2ª semana apresentou o menor valor, na 3ª houve um aumento o qual manteve-se constante nas semanas seguintes. Na 4ª e na 5ª semana, os dois tratamentos não apresentaram variações significativas. Na dissipação regular de energia não-fotoquímica $Y(NPQ)$ houve variação significativa entre os tratamentos ao longo do tempo, entre os tratamentos os indivíduos DAM (-) apresentaram os maiores valores com exceção da 5ª e 6ª semana cujos valores entre os dois tratamentos foram iguais (Fig. 6C).

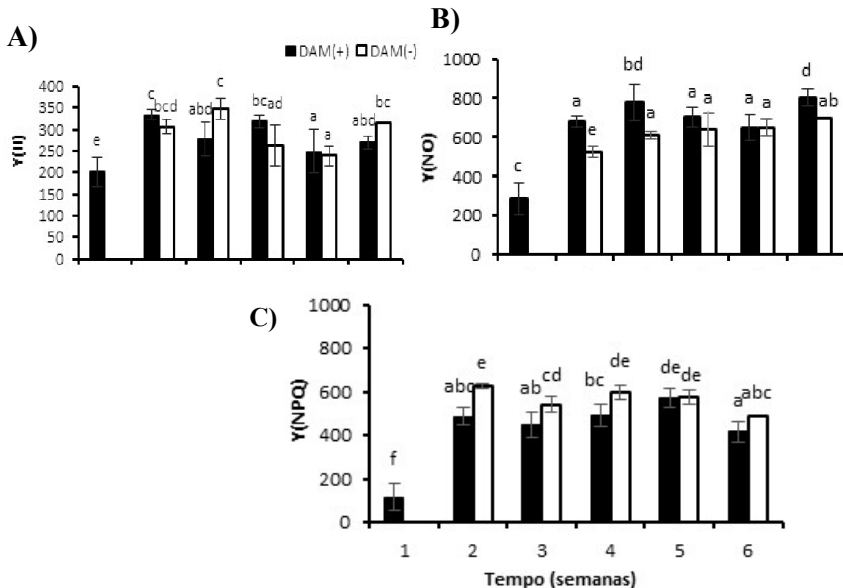


Figura 6: Dissipação da energia da fotossíntese inicial e ao longo de 5 semanas calculado com os valores das áreas das curvas de luz de *Eleocharis laevigulumis* R. Trevis. e Boldrini em de cultivo com solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado – DAM (-). (A) Rendimento quântico efetivo ($Y(II)$). (B) Dissipação não-regular $Y(NO)$. (C) Dissipação regular $Y(NPQ)$ de energia não-fotoquímica. As letras indicam

diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

Os valores reais da Taxa de Transporte de Elétrons (ETR_{real}) variaram significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo (Tab. 2). Observou-se que ocorreu uma redução gradual nos valores de ETR_{real} ao longo do experimento nos indivíduos presentes no DAM (-), apresentando ao final um valor menor quando comparado ao inicial assim como para o DAM (+). Os valores no DAM (+) na 3ª semana apresentaram uma redução comparados aos dados iniciais e em relação a 2ª semana, na 4ª semana houve aumento nesses valores se igualando ao DAM (+), porém, nas semanas seguintes os valores reduziram seguindo o mesmo padrão para o DAM (+) (Fig. 7A). Comparando-se somente entre os tratamentos, as plantas cultivadas em DAM (+) e DAM (-) apresentaram um mesmo padrão de eficiência na taxa de transporte de elétrons mantendo valores muito próximos (Fig. 7B).

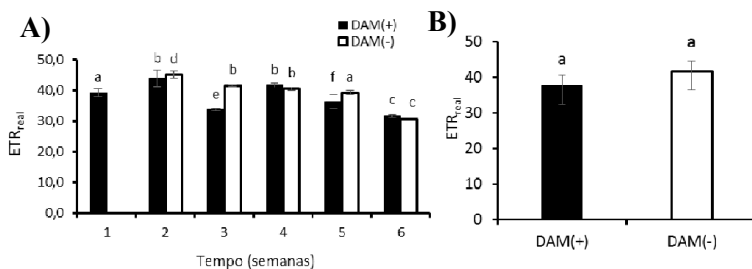


Figura 7: (A) Taxa de Transporte de Elétrons real (ETR_{real}) de *Eleocharis laevigulumis* R. Trevis. e Boldrini inicial e ao longo de 5 semanas de cultivo com solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado – DAM (-). (B) Taxa de Transporte de Elétrons real (ETR_{real}) entre os tratamentos. Letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

Os parâmetros da fotossíntese (ETR_{max} , I_k e α_{ETR}) de *E. laevigulumis* presentes no tratamento DAM (+) e no tratamento DAM (-), variaram significativamente (Tab. 2). Os valores da taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}) (Fig. 8A) e da irradiância de saturação (I_k) (Fig. 8B) variaram entre o tempo e tratamento. Destaca-se que na 2ª semana nos dois tratamentos os valores foram iguais nos dois parâmetros, entretanto, na 3ª

semana os valores em DAM (-) para esses dois parâmetros, foram muito acima dos valores apresentados durante o experimento (Fig. 8A). Os valores da eficiência da fotossíntese (α_{ETR}) apresentaram pouca variação no decorrer do experimento, com valores acima dos apresentado inicialmente. Entretanto, na 5ª semana, houve uma queda nos valores dos indivíduos presentes em DAM (-) (Fig. 8C).

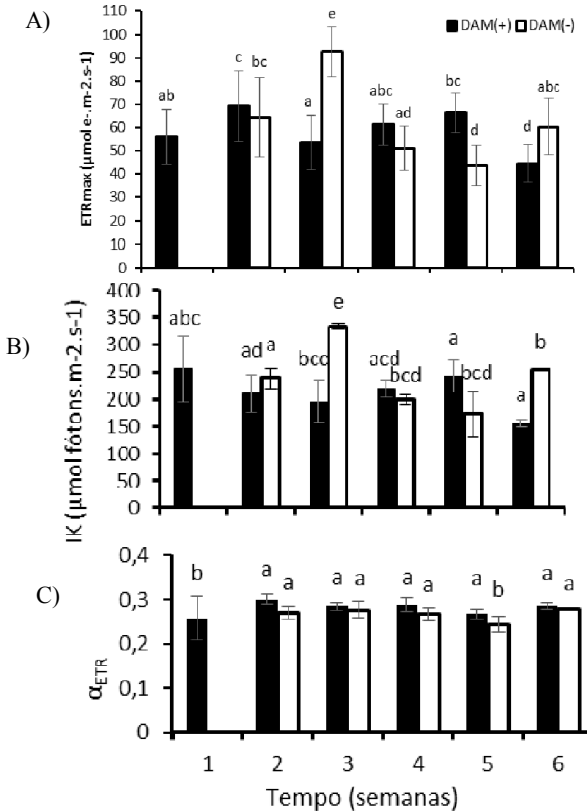


Figura 8: Parâmetros fotossintetizantes de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e Boldrini inicial e ao longo de 5 semanas de cultivo com solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado – DAM (-). (A) Taxa máxima de transporte de elétrons (ETRmax), (B) irradiância de saturação (Ik) e (C) eficiência fotossintética (α_{ETR}). As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

Os valores da fotossíntese efetiva $Y(II)$, energia não-fotoquímica $Y(NO)$ e dissipação regular de energia não-fotoquímica $Y(NPQ)$, calculados com os valores dos pulsos de luz com a planta não aclimatada ao escuro. Os valores de $Y(II)$ foram significativos em relação a todos os fatores (Tempo, Tratamento e Tempo*Tratamento) (Fig. 9A), $Y(NO)$ foi significativo apenas em relação ao fator tempo (Tab. 2), não havendo diferença significativa entre os tratamentos ao longo do experimento. Em relação ao tempo, somente na quinta semana que, ambos os tratamentos, apresentaram um valor mais elevado em relação aos valores iniciais e das semanas anteriores, mas na 6ª semana voltou a apresentar valores parecidos aos das semanas iniciais (Fig. 9C) (Tab. 2). Em $Y(NPQ)$ os valores não foram significativos no fator Tempo*Tratamento como pode ser observado na tabela 5. Nos dados de $Y(NPQ)$ relacionado ao fator tratamento, os valores de DAM (-) foram maiores do que os de DAM (+) (Fig. 9E) e em relação ao fator tempo, para ambos os tratamentos foi observado um padrão de queda para os valores em relação aos apresentados inicialmente no decorrer do experimento, com uma queda mais acentuada na quinta semana e na 6ª voltou a apresentar valores próximos aos da 3ª e 4ª semana (Fig. 9F).

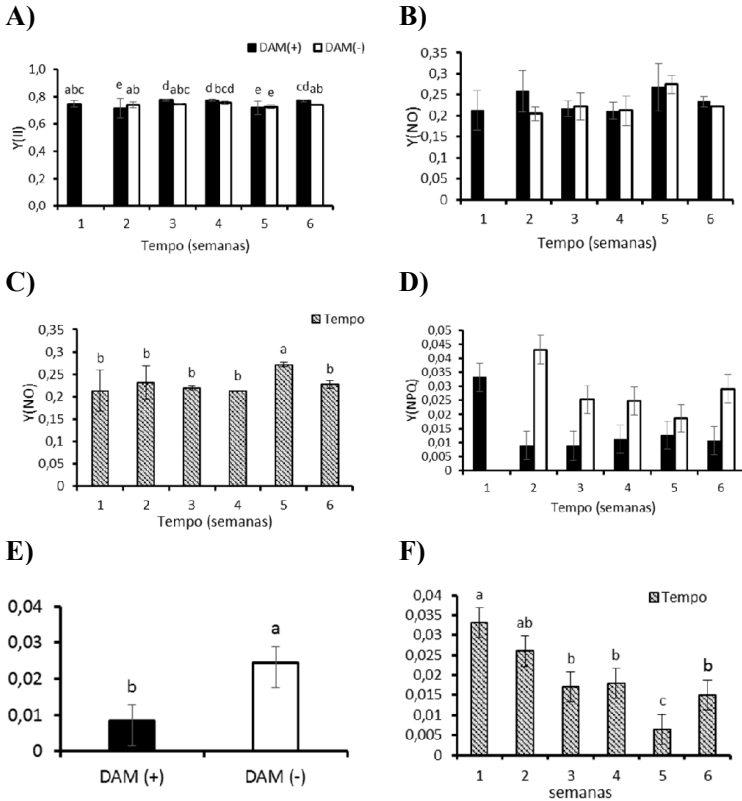


Figura 9: Dissipação da energia da fotossíntese inicial e ao longo de 5 semanas calculado com os valores dos Pulsos de luz de *Eleocharis laevigulis* R. Trevis. e Boldrini em de cultivo com solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado – DAM (-), apresentando (A) parâmetros rendimento quântico efetivo (Y(II)), (B-C) dissipação não-regular Y(NO) (B) Tempo*Tratamento sem resultados significativos, (C) variação significativa para o fator tempo, (D-F) dissipação regular de energia não-fotoquímica Y(NPQ), (D) Tempo*Tratamento sem resultados significativos, (E) Diferença significativa entre os tratamentos, (F) variação significativa para o fator tempo . As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

Os parâmetros fotossintetizantes avaliados durante o experimento, apresentaram correlação (Tab. 3). Houveram correlações negativa entre Fv/Fm e Y(NPQ) Área e Y(NO) Pulso; de Y(II) Pulso com Y(NO) Pulso e Y(NO) Pulso com Y(NPQ) Pulso. Houve também uma forte correlação positiva entre ETR_{max} e I_k o que pode ser esperado uma vez que, uma maior taxa de transporte de elétrons é necessário acréscimo na irradiância requerida para saturação.

Tabela 3: Dados de correlação de Pearson obtidos entre as variáveis dependentes avaliadas em *Eleocharis laevigulumis* R. Trevis. e Boldrini durante o experimento entre os tratamentos DAM (+) e DAM (-). Os valores significativos estão em negrito, $p < 0,005$. N=50. Legenda: A (área) dados obtidos com as curvas de luz e P (pulso) valores obtidos através do pulso de luz.

	ETR _{max}	aETR	I _k	Fv/Fm	ETR _{real}	Y(II) A	Y(NO) A	Y(NPQ) A	Y(II) P	Y(NO) P	Y(NPQ) P
ETR _{max}	1,00	0,27	0,81	0,03	0,32	0,62	0,06	0,35	-0,21	0,09	0,02
aETR		1,00	-0,13	0,21	0,15	0,42	0,30	0,08	0,14	-0,04	-0,14
I _k			1,00	0,04	0,15	0,39	-0,19	0,16	-0,19	0,01	0,19
Fv/Fm				1,00	-0,24	-0,01	-0,03	-0,38	0,71	-0,47	0,10
ETR _{real}					1,00	0,26	-0,13	0,12	-0,35	0,03	0,13
Y(II) A						1,00	0,50	0,62	0,07	-0,03	-0,18
Y(NO) A							1,00	0,60	0,21	0,11	-0,49
Y(NPQ) A								1,00	-0,15	0,23	-0,25
Y(II) P									1,00	-0,44	-0,15
Y(NO) P										1,00	-0,72
Y(NPQ) P											1,00

Os valores de clorofila e carotenóides avaliados no início e ao final do experimento, foram significativos para Clorofila *a* e Clorofila total ($p \leq 0,05$), enquanto que os valores de Clorofila *b* e Carotenóides não mostraram-se significativos entre os tratamentos e nem em relação aos valores iniciais DAM (+) IN (Tab. 2). Ao final do experimento, os valores de Chl_a mostraram-se menores em relação aos valores iniciais em ambos os tratamentos, mas o DAM (-) apresentou valor maior quando comparado com o DAM (+) final (Fig. 10A). A ChlTotal também foi maior nos indivíduos analisados inicialmente e o DAM (+) e o DAM (-) não apresentaram diferença entre os seus valores (Fig. 10B).

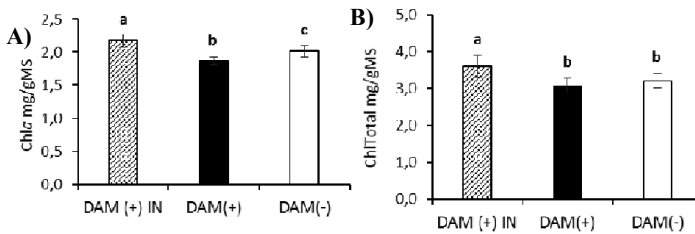


Figura 10: Quantificação dos pigmentos em *Eleocharis laevigulis* R. Trevis. e Boldrini, valor inicial DAM (+) IN e ao final do experimento; solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado - DAM (-). (A) Clorofila a (Chl a) e (B) Clorofila total (Chl Total). As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls. Os resultados são apresentados em gramas por massa seca (MS) de tecido.

A quantidade de açúcares solúveis totais, avaliada no início e ao final do experimento, variou significativamente entre os tratamentos e em relação a análise inicial, no escapo e no rizoma, não apresentando variação significativa na raiz entre o valor em relação aos valores finais dos tratamentos, nem entre os tratamentos (Tab. 6, Fig.11A). No escapo e rizoma, o teor de açúcar foi maior nos dados iniciais seguido pelo DAM (+) e DAM (-) (Fig. 11A). Com relação à quantidade de amido, esta variou nos órgãos analisados entre os tratamentos, sendo os valores finais maiores que aos iniciais no escapo, no rizoma e na raiz, os valores em DAM (-) foram maiores em comparação ao valor inicial DAM (+) IN e o DAM (+) final (Fig. 11B).

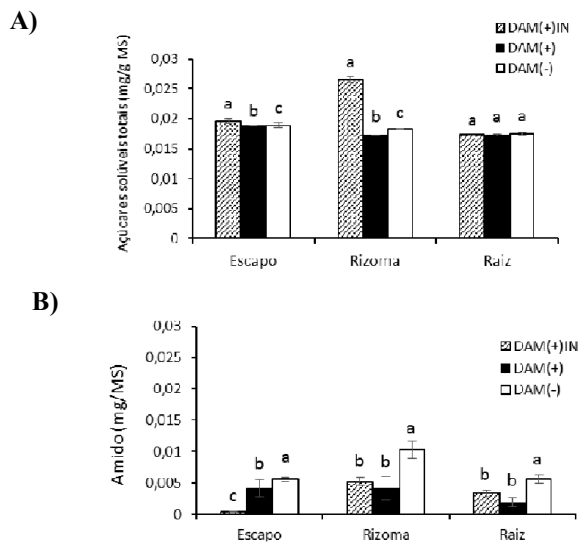


Figura 11: Teor de (a) açúcares solúveis totais e (b) amido por grama de Massa Seca (MS) de *Eleocharis laevigulumis* R. Trevis. e Boldrini, valor inicial DAM (+) IN e ao final do experimento solo contaminado com drenagem ácida - DAM (+) e em solo não contaminado - DAM (-). As letras indicam diferenças significativas, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) dado pelo teste *a posteriori* Newman Keuls.

3.4 Análise dos órgãos vegetativos com EDS

Através da microanálise com energia dispersiva de raios-X foi possível determinar o percentual dos minerais presentes na raiz, rizoma e escapo de *E. laevigulumis* cultivados em DAM (+) e em DAM (-) (Fig. 12-13). Os indivíduos cultivados em DAM (+) apresentam maior percentual de minerais em relação aos indivíduos cultivados em DAM (-) (Fig. 12-13). Nas plantas DAM (+) (Fig. 12) os elementos com maior percentual médio foram Fe e Si seguidos por Cu, Al, S, Mo e Mg, Zn, Mo e Ca. Com exceção da Si, todos os demais elementos ocorrem com taxas mais elevadas na raiz. O Fe foi detectado em todos tecidos de todos os órgãos. Nas plantas DAM (-) (Fig. 13) não foi detectado Fe. O elemento com maior percentual foi Si seguido

pelo Ca, Al, Cu e Zn. Os maiores percentuais foram nas raízes com exceção de Cu e o Zn que só foram detectados nos escapos. A análise também mostrou a percentagem dos elementos químicos por tecido individualmente (Tab. 4), indicando que a epiderme, das raízes e rizomas dos indivíduos DAM (+), apresenta os maiores percentuais para a maioria dos minerais encontrados na epiderme. Em relação ao Fe, o metal mais abundante, percebe-se que as taxas decrescem da epiderme da raiz passando pelo parênquima (aerênquima), endoderme e elementos de vaso. No rizoma, chama a atenção a grande retenção de Fe na endoderme. Nos escapos das plantas DAM (-) os metais com Cu, Zn e Al ocorrem em maiores quantidades na epiderme e elementos de vaso, não sendo acumulados em grande quantidade no parênquima.

Tabela 4: Percentagem média dos elementos químicos detectados nos tecidos dos órgãos de *Eleocharis laevigulumis* R. Trevis. e Boldrini (Cyperaceae) submetida em ambos os tratamentos DAM (+) e DAM (-) através da microanálise com energia dispersiva de raios-X (EDS): nd (Não detectado)

Órgão		Tecido											
		Elementos (%)											
		Mg	Na	Ca	Si	S	Fe	Cu	Zn	Al	Mo		
Raiz	DAM (+)	Epiderme	0,16 ± 0,08	0,87 ± 0,17	2,6 ± 0,53	10,06 ± 5,8	1,58 ± 0,41	59,73 ± 10,05	4,96 ± 0,42	2,92 ± 0,48	15,07 ± 0,2	1,69 ± 0,24	
		Aerênquima	0,98 ± 0,16	2 ± 0,17	nd	14,57 ± 1,89	7,13 ± 0,59	54,18 ± 1,80	4,41 ± 0,24	1,57 ± 0,07	13,9 ± 0,41	1,26 ± 0,10	
		Endoderme	nd	0,32 ± 0,02	2,4 ± 0,6	22,14 ± 5,82	3,29 ± 0,4	51,79 ± 0,17	4,86 ± 0,2	nd	14,2 ± 0,16	nd	
		Elemento de Vaso	nd	2,22 ± 0,14	6,76 ± 0,16	38,7 ± 2,67	5,03 ± 0,65	31,62 ± 2,92	nd	3,75 ± 0,56	11,92 ± 0,17	nd	
		DAM (-)	Epiderme	nd	3,98 ± 0,21	16,66 ± 0,14	39,43 ± 2,67	nd	nd	8,67 ± 0,42	6,85 ± 0,05	22,91 ± 0,28	nd
		Aerênquima	1,98 ± 0,03	4,32 ± 0,11	37,68 ± 2,89	14,78 ± 2,78	nd	nd	6,11 ± 0,32	9,76 ± 0,21	22,32 ± 1,74	2,11 ± 0,25	
		Endoderme	2,23 ± 0,01	nd	11,23 ± 0,12	36,35 ± 2,18	nd	nd	7,14 ± 0,15	16,87 ± 0,11	21,57 ± 0,06	2,89 ± 0,17	
		Elemento de Vaso	nd	nd	21,91 ± 0,34	43,78 ± 3,79	nd	nd	nd	nd	14,31 ± 1,64	nd	
	Rizoma	DAM (+)	Epiderme	0,67 ± 0,03	6,5 ± 0,08	nd	30,67 ± 0,48	12,45 ± 0,65	28,11 ± 2,01	2,8 ± 0,29	2,1 ± 0,02	13,92 ± 0,24	1,78 ± 0,01
			Parênquima	2,25 ± 0,52	4,33 ± 0,11	11,72 ± 0,21	29,75 ± 1,51	10,95 ± 1,39	21,6 ± 1,73	4,63 ± 0,38	2,45 ± 0,09	5,76 ± 0,25	1,56 ± 0,28
			Endoderme	nd	2,32 ± 0,08	nd	46,58 ± 5,82	8,29 ± 0,32	27,26 ± 0,92	6,86 ± 0,29	nd	6,79 ± 0,08	1,79 ± 0,03
			Elemento de Vaso	2,47 ± 0,06	2,89 ± 0,06	16,78 ± 0,34	14,83 ± 0,45	18,84 ± 1,40	21,52 ± 7,81	7,91 ± 0,51	1,98 ± 0,03	7,29 ± 0,33	4,29 ± 0,43
		DAM (-)	Epiderme	0,82 ± 0,02	4,56 ± 0,11	11,33 ± 0,26	38,67 ± 0,38	nd	nd	9,88 ± 0,07	8,45 ± 0,08	21 ± 0,18	2,11 ± 0,02
		Parênquima	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		Endoderme	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
		Elemento de Vaso	1,02 ± 0,04	6,69 ± 0,08	19,38 ± 1,48	35,48 ± 3,57	nd	nd	16,78 ± 0,12	9,76 ± 0,04	7,14 ± 1,38	3,12 ± 0,06	
Escapo		DAM (+)	Epiderme - DAM(+)	1,19 ± 0,10	1,43 ± 0,11	nd	54,49 ± 5,46	5,14 ± 0,95	22,35 ± 0,75	5,35 ± 0,89	nd	2,21	nd
			Parênquima - DAM(+)	6,97 ± 0,21	2,79 ± 0,05	4,11 ± 0,08	49,08 ± 4,12	6,16 ± 0,76	6,9 ± 0,03	5,68 ± 0,66	6,79 ± 0,25	6,27 ± 0,05	3,89 ± 0,12
			Elemento de Vaso - DAM(+)	5,75 ± 0,22	2,23 ± 0,31	5,7 ± 0,69	52,69 ± 3,54	7,83 ± 0,42	4,36 ± 0,36	8,76 ± 0,42	5,2 ± 0,14	5,29 ± 0,67	1,87 ± 0,03
			DAM (-)	Epiderme - DAM(-)	nd	nd	nd	65,69 ± 0,23	nd	nd	13,38 ± 1,42	7,45 ± 0,92	12,58 ± 0,15
		Parênquima - DAM(-)	12,76 ± 0,34	7,79 ± 0,08	16,49 ± 0,18	42,18 ± 5,86	nd	nd	2,81 ± 0,47	7,68 ± 0,56	3,84 ± 0,78	5,89 ± 0,11	
		Elemento de Vaso - DAM(-)	8,89 ± 0,12	4,87 ± 0,88	9,32 ± 0,45	47,12 ± 8,91	nd	nd	9,36 ± 1,89	13,95 ± 2,79	1,57 ± 0,05	3,11 ± 0,09	

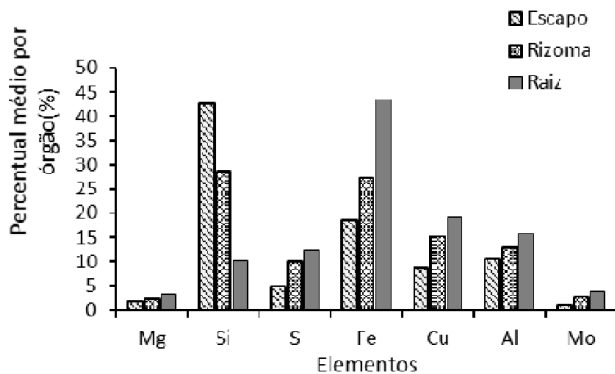


Figura 12: Percentual médio dos elementos químicos detectados nos órgãos de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e Boldrini submetida ao tratamento DAM (+) através da microanálise com energia dispersiva de raios-X (EDS).

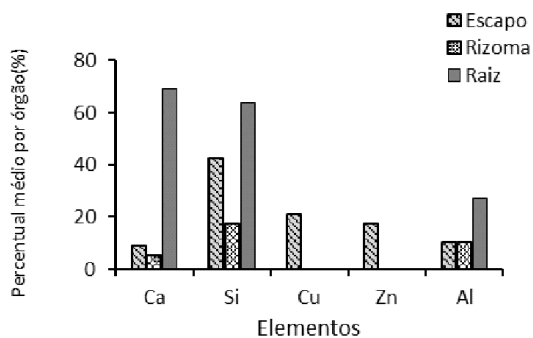


Figura 13: Percentual médio dos elementos químicos detectados nos órgãos de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e Boldrini submetida ao tratamento DAM (-) através da microanálise com energia dispersiva de raios-X (EDS).

3.5 Estudo morfológico

As análises morfológicas, ao final do experimento indicam que os indivíduos de *E. laeviglumis* cultivados em DAM (-) apresentam os maiores valores para altura, diâmetro e área total do escapo (Tab. 5).

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão, obtidos em análises morfológicas realizadas no escapo de *Eleocharis laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini coletados em substrato contaminado com Drenagem Ácida de Mina – DAM (+) e não contaminado – DAM (-) ao final do experimento. As letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Parâmetros	DAM (+)	DAM (-)
Altura do escapo (cm)	19,89 ± 7,97 ^b	35,22 ± 9,24 ^a
Diâmetro do escapo (cm)	0,96 ± 0,18 ^b	1,56 ± 0,26 ^a
Área total (cm ²)	62,70 ± 30,88 ^b	173,92 ± 47,74 ^a

3.6 Estudo anatômico

3.6.1 Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura (MEV)

3.6.1.1 Análises qualitativas

Em vista frontal, a epiderme do escapo, em ambos os tratamentos, apresenta células alongadas no sentido longitudinal, com paredes anticlinais sinuosas e com estômatos do tipo paracítico distribuídos em fileiras longitudinais (Fig. 14A-D).

Em secção transversal, em ambos os tratamentos, o escapo possui formato circular (Fig. 15A-F), epiderme unisseriada com células de formato retangular a arredondado e com cutícula fina, estômatos localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas e presença de cordões de fibras subepidérmicas (Fig. 15C, F).

Na região cortical, observa-se o parênquima clorofiliano paliádico composto por 1-3 camadas de células com presença de idioblastos com compostos fenólicos evidenciados pelo teste com cloreto férrico (Fig. 15C, F). Chama-se atenção pela diferença observada nas células do parênquima paliádico, as quais em DAM (+) são menos alongadas constituindo apenas duas camadas (Fig. 15C), em DAM (-) observam-se células conspicuamente

alongadas com a formação de duas a três camadas bem definidas (Fig. 15F).

O sistema vascular é composto por feixes vasculares colaterais os quais se distribuem próximos ao córtex e na região medular (Fig. 15A-B, D-E). Todos os feixes são envolvidos externamente por uma bainha parenquimática, constituída de células conspicuas e internamente, por uma segunda bainha cujas células apresentam paredes periclinais internas espessadas em “U” envolvendo o floema (Fig. 16A-B, seta preta), cordões de células espessadas ainda, ocorrem entre as duas bainhas em ambos os polos (Fig. 16A-B, seta branca).

Na região central, ocupando maior área do escapo, ocorre o aerênquima, constituído por células parenquimáticas de paredes finas as quais delimitam grandes lacunas de ar (Fig. 15A-B, D-E), tais lacunas podem ser interrompidas por diafragma constituído por uma única camada de células braciiformes (Fig. 15A-B; 16C-D). Os testes histoquímicos realizados nos escapos cultivados em ambos os tratamentos, não apresentaram diferenças qualitativas, apresentando reações similares, como ausência de compostos lipídicos, e fraca reação para amido no parênquima paliçádico, com exceção da presença de compostos fenólicos onde a reação foi mais intensa em escapos DAM (+) em idioblasto presentes nas células do parênquima paliçádico (Fig. 15C, F)

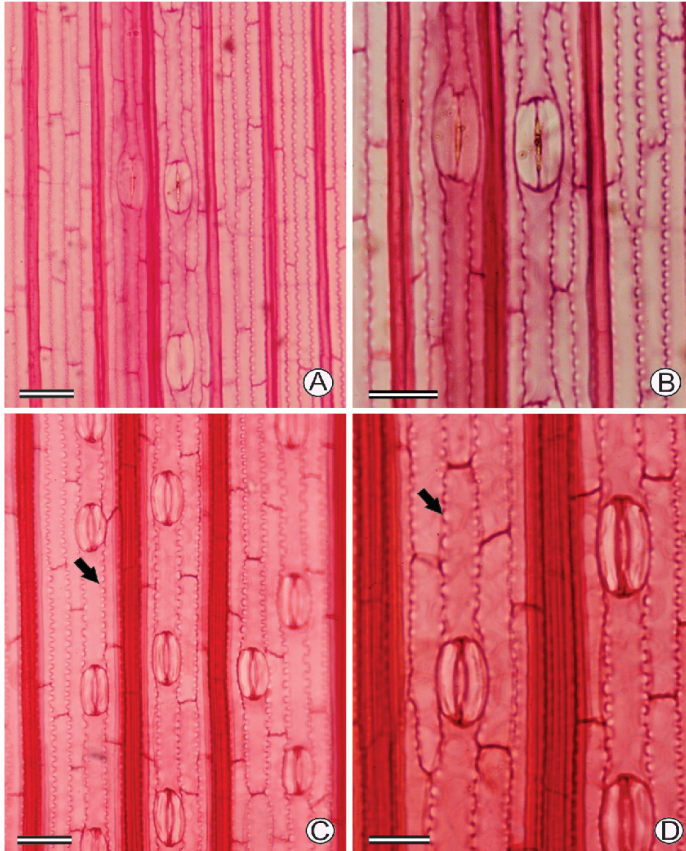


Figura 14: Secções paradérmicas do escapo floral de *Eleocharis laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini. (A-B). DAM (+), (C-D). DAM (-). Observam-se células epidérmicas alongadas no sentido longitudinal com paredes anticlinais sinuosas (setas) e estômatos do tipo paracítico distribuídos em fileiras longitudinais. Barras A,C = 40 μ m; B,D = 20 μ m

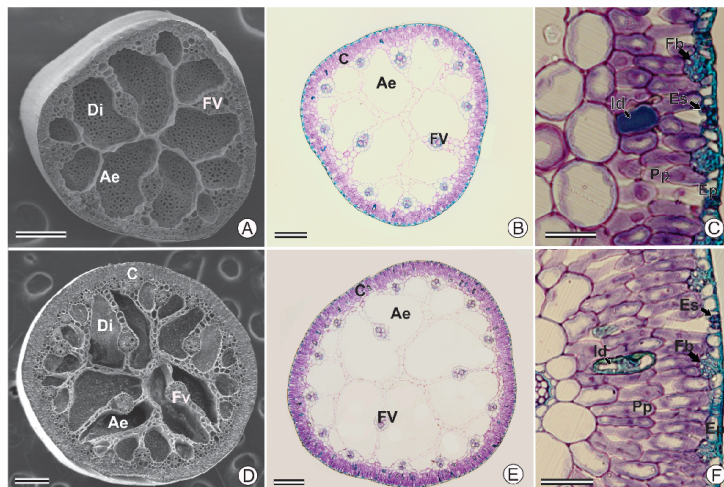


Figura 15: Seções transversais do escapo de *Eleocharis laevigulis* R. Trevis. e Boldrini. (A-C) Escapos cultivados em Drenagem Ácida de Mina DAM (+). (D-F) Cultivados em substrato livre de contaminação por Drenagem Ácida de Mina DAM (-). Escapo circular (A, D) MEV (Kv10), (B, C, E, F) Microscopia de luz, epiderme unisseriada com estômatos no mesmo nível e com a presença de cordões de fibras subepidêmicas (D, F). Parênquima paliçádico com idioblastos (Id), Feixes vasculares colaterais próximos ao córtex e na região medular onde ocorre células parenquimáticas delimitando grandes lacunas de ar com a presença de diafragmas (A-B, D-E). Ae (Aerênquima), C (Córtex), FV (Feixe vascular), Di (Diafragma), Ep (epiderme), Es (Estômato), Pp (Parênquima paliçádico), Fb (Fibras), Id (Idioblasto). Barras A-B, D-E = 200 μ m; E, F = 40 μ m

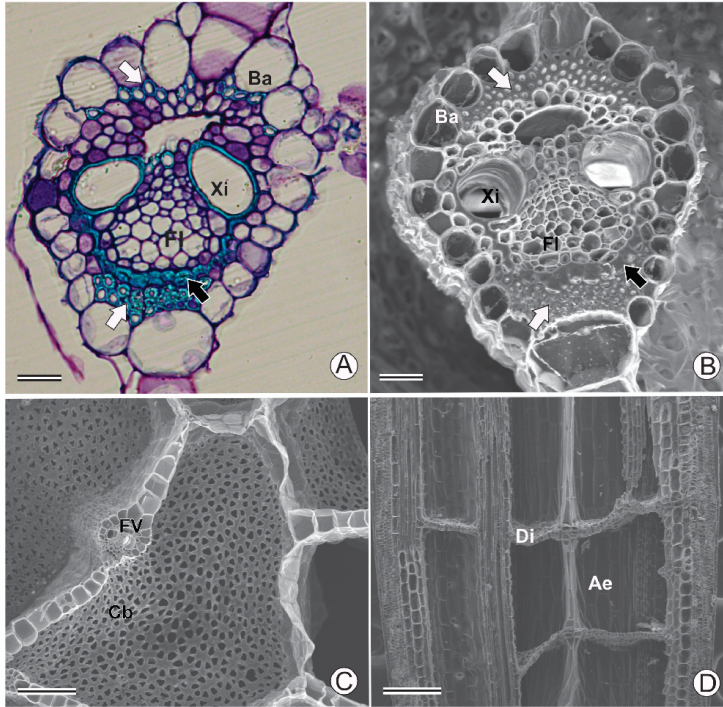


Figura 16: Seções transversais (A-C) e longitudinal (D) do escapo floral de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e Boldrini. (A). Microscopia de luz. (B-D) MEV (10Kv; 15Kv; 10Kv) Microscopia eletrônica de varredura. (A-B) Feixe vascular colateral envolvido externamente por bainha parenquimática, observam-se ainda internamente células com as paredes espessadas em ambos os polos (seta branca) e bainha interna com células espessadas em “U” na região do floema (seta preta). (C-D) Aerênquima constituindo por grandes lacunas interrompidas por diafragma constituído por uma única camada de células braciformes. Ba (Bainha), Xi (Xilema), Fl (Floema), FV (Feixe vascular), Di (Diafragma), Cb (Célula braciformes). Barras A = 20µm; B= 25µm; C-D=200µm

3.6.1.2 Análises quantitativas

As análises quantitativas realizadas nos escapes de *E. laeviglumis* revelaram que as plantas cultivadas em DAM (+) apresentam os menores valores para todos os parâmetros mensurados, sendo todos eles diferentes estatisticamente de DAM (-), com exceção da área proporcional de aerênquima, conforme tabela 4.

Tabela 6: Comparação dos valores médios obtidos em medidas realizadas no escape de *E. laeviglumis* R. Trevis. e Boldrini coletados em substrato contaminado com Drenagem Ácida de Mina – DAM (+) e não contaminado – DAM (-) ao final do experimento.

Parâmetros	DAM (+)	DAM (-)
Altura das células da epiderme (µm)	11,93 ± 2,77 ^b	15,61 ± 1,78 ^a
Espessura da parede periclinal externa das células epidérmicas (µm)	2,75 ± 0,64 ^b	3,43 ± 0,57 ^a
Espessura total do parênquima paliçádico (µm)	35,48 ± 2,37 ^b	78,99 ± 2,39 ^a
Altura das células do parênquima paliçádico (µm)	26,15 ± 6,56 ^b	42,12 ± 6,45 ^a
Densidade estomática (mm²)	29,25 ± 4,89 ^b	57,92 ± 2,26 ^a
Área proporcional de aerênquima (%)	43,92 ± 11,90 ^a	46,04 ± 3,41 ^a

Legenda: (±) Desvio Padrão, as letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises ultraestruturais do escapo floral em *E. laeviglumis*, indicam que não ocorrem variações nas células do parênquima paliçádico entre os tratamentos DAM (+) e DAM (-) (Fig. 17A-G). Em ambos os tratamentos foram observados cloroplastos com formato alongado, contendo grana evidente e bem estruturado (Fig. 17A-B). Alguns apresentaram grãos de amido e plastoglóbulos de tamanhos variados, sendo observada maior frequência de grãos de amido nas amostras de DAM (-) (Fig. 17C) e de plastoglóbulos no tratamento DAM (+) (Fig. 17D). A localização dos cloroplastos ficou restrita às proximidades da parede celular com a presença de mitocôndrias e peroxissomos, todos apresentando contornos íntegros e sem evidência de alterações (Fig. 17E-F). Também foram observados alguns corpos eletrodensos nas amostras de DAM (+) dentro dos vacúolos (Fig. 17G) podendo ser os compostos fenólicos presentes nos vacúolos os quais foram detectados nos testes histoquímicos em microscopia de luz.

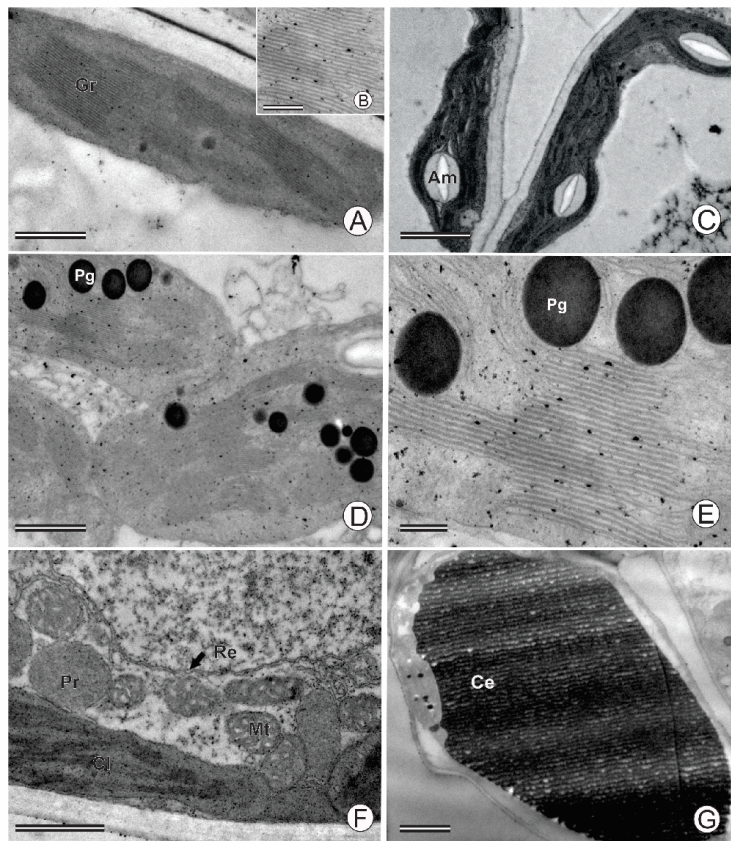


Figura 17: Eletromicrografias do parênquima paliçádico de *Eleocharis laevigulum* R. Trevis. e Boldrini, A-C, F DAM (-) e D-E, G-H DAM (+). Em ambos os tratamentos cloroplastos com formato alongado contendo grana evidente e bem estruturado (A-B). Observa-se maior frequência de grãos de amido nas amostras de DAM (-) (C). Maior frequência de plastoglóbulos com tamanhos variados no tratamento DAM (+) (D-E). Presença de mitocôndrias e peroxissomos, todos apresentando contornos íntegros e sem evidência de alterações (F) DAM (-). Presença de corpos eletrodensos nas amostras de DAM (+) dentro dos vacúolos (G). Gr (grana), Am (amido), Pg (plastoglóbulos), Re (retículo endoplasmático), Pr (peroxissomos), Mt (mitocôndria) e Ce (corpos eletrodensos). Barras: A, C, D e F = 0,5 μ m; B e E = 0,2 μ m; G = 2 μ m

4. DISCUSSÃO

Embora traços de Fe tenham sido detectados através da microanálise com energia dispersiva de raios-X no escapo de *E. laeviglumis*, essa espécie mostrou eficiente retenção de ferro no sistema subterrâneo, acumulando-o em maior quantidade na raiz, seguido pelo rizoma, sendo, nestes órgãos, a epiderme o tecido com as maiores taxas percentuais, ocorrendo diminuição gradual nos tecidos mais internos, permitindo que pequena quantidade chegasse nas partes aéreas tanto do Fe como dos demais elementos, como observado em outras espécies aquáticas também sujeitas à DAM como *Typha latifolia* L. (Hozhina *et al.* 2001), *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (Weis e Weis, 2004) e *Eleocharis equisetina* J.Presl e C.Presl (Lottermoser e Ashley 2011), as quais, em análises de bioacumulação de metais, apresentaram percentagens maiores em suas raízes Fe, Cu, Zn, Al, Cd, Ni.

Segundo Barceló e Poschenrieder (1999), a maior retenção de metais nas raízes, principalmente nos tecidos da epiderme e endoderme, pode ser justificada pela forma de absorção dos metais pelas raízes, esse transporte ocorre por via apoplástica e encontra na exoderme a primeira barreira de translocação e na endoderme o principal filtro de regulação, constituindo as principais barreiras. Os metais que passam por essas barreiras, seguem essencialmente via xilema podendo alcançar os demais tecidos (Van Assche e Clijsters, 1990).

Mesmo apresentando taxas elevadas de retenção de Fe nas raízes, os indivíduos de *E. laeviglumis* cultivados em DAM (+), apresentaram taxa de crescimento abaixo daqueles cultivados em DAM (-). De acordo com a literatura, espécies que crescem em ambientes ácidos ricos em metais, mesmo apresentando mecanismos de retenção em suas raízes e limitando a translocação destes para suas partes aéreas, o excesso de determinado elemento no solo, principalmente de elementos tóxicos, pode interferir de maneira desfavorável na absorção e na translocação de elementos essenciais para a planta (Rai *et al.*, 2005; Sharma e Dubey, 2005; Pandey *et al.*, 2007). Segundo Arduini *et al.*, (1998), alguns elementos quando em excesso, podem competir pelos sítios de ligação de carreadores presentes na membrana plasmática que são utilizados pelos elementos essenciais para o crescimento da planta, causando redução da absorção desses elementos e consequente distúrbios nutricionais

reduzindo a taxa de crescimento. Os resultados da taxa de crescimento estão diretamente relacionados aos dados morfológicos como altura, diâmetro e área total do escapo, onde os valores médios obtidos nos indivíduos cultivados em DAM (+) foram significativamente menores quando comparados com os indivíduos cultivados em DAM (-).

Anatomicamente, os indivíduos de *E. laevigulumis* cultivados em DAM (+) também apresentaram variações principalmente na redução do tecido fotossintético que pode ser um indicativo de estresse por metais, conforme relata Barceló e Poschenrieder (1992) para outras espécies. Outros estudos têm demonstrado a redução dos tecidos fotossintetizantes por excesso de metais pesados no solo, como Bini *et al.* (2012) que avaliando as respostas de *Taraxacum officinale* Web crescendo em substrato com altas concentrações de Cu, Fe, Zn, observaram que o parênquima esponjoso apresentava poucas células arredondadas com grandes espaços intercelulares, o parênquima paliádico praticamente ausente, e forte redução da espessura da folha, em comparação com amostras de local não contaminado. Santana (2014) submetendo *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen à diferentes concentrações de ferro, notou alterações bruscas nas células da epiderme, desorganização das células do mesofilo à medida que as concentrações de Fe aumentavam. Segundo Santana *et al.* (2014), uma quantidade excessiva de Fe no substrato, pode reduzir o crescimento das raízes e da parte aérea devido ao desarranjo nutricional, uma vez que o Fe pode interferir nos teores de nitrogênio, potássio e cálcio. O cálcio atua na composição estrutural das paredes celulares e na regulação da permeabilidade da membrana plasmática (Marschner, 1995). Uma redução de Ca^{2+} em DAM (+), pode ter tido influência na alteração do formato celular e na formação do parênquima paliádico em DAM (+).

A tendência dos indivíduos de *E. laevigulumis* cultivados em DAM (+) de terem uma redução da densidade estomática, tem possível relação com as condições de estresse por metais pesados. Segundo Gomes (2011), alterações na densidade estomática, na presença de metais pesados, pode ser considerado como uma estratégia compensatória que reduz a área de transpiração, pois muitos estômatos próximos uns dos outros favorece a formação de arcos de transpiração mais próximos entre si, retendo maior

umidade na área estomática e evitando maior perda de água pela planta (Larcher, 2004). *E. laevisglumis* pode ter desenvolvido essa estratégia compensatória para reduzir a transpiração, e consequentemente reduzir a quantidade de translocação de metais para parte aérea e assim reduzir o estresse causado pelos mesmos.

Apesar da redução do tecido fotossintetizante, nos indivíduos DAM (+) as análises ultraestruturais do parênquima paliádico não revelaram variação significativa entre os tratamentos. Chama-se atenção a ocorrência de idioblastos com compostos fenólicos nos indivíduos DAM (+), os quais também foram observados na microscopia de luz e em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Metabólicos secundários, como compostos fenólicos, produzidos pelas plantas, podem atuar como moléculas antioxidantes que tendem a quelar metais pesados prevenindo a formação de radicais livres (Michalak, 2006). De acordo com Jung *et al.* (2003) a formação de complexos estáveis entre fenóis e metais pode restringir a absorção de metais e assim ocorrer uma redução da toxicidade do metal na planta.

A maior frequência de plastoglóbulos, nos cloroplastos das células do parênquima paliádico das plantas cultivadas em DAM (+) corrobora o observado por outros autores em outras espécies cultivadas com metais pesados como Probst *et al.* (2009) em *Vicia faba* L., avaliando a acumulação de Zn e Cd, Najeeb *et al.* (2009) em *Juncus effuses* L., cultivada em elevado ter de magnésio (Mn) e Gill *et al.* (2015) em *Brassica napus* L., avaliando o estresse por Cr. De acordo com Soikkeli (1981) e Inada *et al.* (1998) a formação de plastoglóbulos está relacionada com a degradação de tilacóides e pode indicar metabolismo lipídico perturbado. Entretanto, na espécie em estudo, não foram observadas degradação ou a desestruturação dos tilacóides nos cloroplastos, os quais apresentam-se bem estruturados em ambos os tratamentos. Desta forma, as alterações na frequência e no tamanho dos plastoglóbulos observados provavelmente não parecem relacionadas com degradação de tilacóides.

Alterações estruturais nos cloroplastos podem refletir diretamente nas respostas fotossintéticas das plantas, e as análises da atividade fotossintética a partir da fluorescência da clorofila *a*, assim como os parâmetros F_v/F_m e Y(II) refletem diretamente a capacidade do uso da luz para o transporte de elétrons através do PSII (Baker e Rosenqvist, 2004), e são utilizados como um

sensível indicador de desempenho fotossintético da planta (Kolber e Falkowski, 1993). No presente trabalho o parâmetro fotossintético analisado F_v/F_m , mostrou-se eficiente em ambos os tratamentos. Apesar de variarem significativamente, os valores médios obtidos ao longo do experimento foram de 0,79 para as plantas cultivadas em DAM (+) e 0,77 para as plantas cultivadas em DAM (-), indicando que não houve redução no rendimento quântico máximo em ambos os tratamentos. Segundo Ögren e Öquist (1985) uma planta não estressada apresenta a razão F_v/F_m entre 0,75 a 0,85. O valor de F_v/F_m é proporcional ao rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese e um declínio dessa razão, é um bom indicador de dano fotoinibitório sugerindo comprometimento da utilização da energia luminosa do o metabolismo do carbono em plantas expostas ao estresse (Björkman e Deming, 1987).

O mesmo padrão de resposta no parâmetro ETR foi observado nos espécimes de *E. leaviglumis* em ambos os tratamentos, o que poderia ser esperado já que o ETR é uma medida que depende do valor de Y(II) para ser calculado (Baker, 2008). Este parâmetro está relacionado com o fluxo de elétrons através do PSII que potencialmente levará à formação de NADPH e ATP, se esse parâmetro sofre redução isso reforça a ocorrência de fotoinibição do PSII, dessa forma os dados do presente estudo mostram que tanto os indivíduos de *E. leaviglumis* presentes em DAM (+) quanto os presentes em DAM (-) não sofreram fotoinibição, evidenciando que a drenagem ácida, não é fator limitante a ponto de comprometer o rendimento fotossintético no PS(II) nessa espécie. Resultados diferentes foram obtidos em *Senecio ceneraria* DC. e *Centaurea moschata* (L) DC. (Asteraceae), as quais apresentaram taxas de rendimento fotossintético e valores de clorofila reduzidos quando cultivadas em solo rico em metais (derivados de minério de ferro) com altos níveis de Fe e com quantidades consideráveis de Mn e Cu, apesar das espécies mostrarem ser excelentes acumuladoras para os três metais (Farooqui *et al.*, 1995). Em *Salvinia natans*, Dhir *et al.*, (2011) observaram redução nas taxas de fluorescência levando a foto inibição quando expostas ao Cu, Pb, Cd e Zn e quando exposta ao Fe, Ni e Cr, houve alterações mínimas, não levando a fotoinibição.

Os parâmetros dissipação regular de energia não-fotoquímica $Y(NPQ)$ e de energia não-fotoquímica não regular $Y(NO)$ representam diferentes destinos de energia de excitação no PSII, fornecendo informações sobre a capacidade do organismo de se adaptar ao excesso de energia de excitação em diferentes condições (Maxwell e Johnson, 2000). Os dados apresentados no presente estudo, mostram que os espécimes de *E. laeviglumis*, cultivados em DAM (-) estão dissipando maior quantidade de energia na forma de calor, ou seja, apresentando mecanismo de fotoproteção mais eficiente do que as plantas presentes em DAM (+) as quais apresentam menores valores em $Y(NPQ)$ e maiores em $Y(NO)$, considerando que ambos os tratamentos encontravam-se na mesma condição de luminosidade.

Na avaliação dos dados de irradiância de saturação (I_k), as plantas cultivadas em DAM (+) mostraram, ao contrário das cultivadas em DAM (-), que precisam de menor quantidade de luz para que ocorra saturação em seus centros de reação. Esses resultados, juntamente com os maiores valores de $Y(NO)$ também observados nos espécimes cultivados em DAM (+), podem ser justificados pelas diferenças observadas no tecido fotossintetizante desses indivíduos em relação aos cultivados em DAM (-), os quais apresentaram redução do parênquima paliçádico, tanto em tamanho de células e quanto em número de camadas, além de menor valor de clorofila *a*. Quando o parênquima paliçádico é bem desenvolvido, ocorre maior quantidade de cloroplastos por célula, e conseqüentemente melhor captação de energia luminosa, por meio da clorofila *a*, como também maior proteção na dissipação de energia excedente através de outros pigmentos acessórios como os carotenoides, os quais incluem os carotenos e as xantofilas, cuja uma das funções é ampliar o espectro de absorção dos pigmentos (Williams *et al.*, 2003). Entretanto, tais características observadas em DAM (+) não impedem o seu desenvolvimento no ambiente contaminado, já que a planta apresenta um potencial fotossintético eficiente.

A sacarose é o principal carboidrato translocável das plantas, podendo ser armazenada nos vacúolos celulares até o momento de ser metabolizada (Farrar *et al.*, 2000). Segundo Chen *et al.*, (2005) a sacarose pode ser transformada, dependendo da espécie, em outros carboidratos, como o amido que pode ser considerado como o mais importante polissacarídeo de reserva

das plantas, o qual em órgãos subterrâneos, geralmente é mobilizado para o processo de brotação de gemas. Os teores mais elevados de amido presentes nos rizomas e nas raízes dos indivíduos cultivados em DAM (-) pode ser uma estratégia da espécie, que pode ter direcionado sua reserva energética investindo em crescimento, resultado que pode ser observado nas maiores taxas de crescimento no tratamento DAM (-). Já a redução das concentrações de amido, como ocorreu nos indivíduos cultivados em DAM (+) pode estar relacionada à um aumento no gasto energético para se manter no ambiente, o qual gera aumento da síntese de sacarose e redução na síntese de amido e consequentemente baixa estocagem desse polissacarídeo nos órgãos (Pezeshki, 1995, 2001).

De acordo com Vose *et al.* (2000), algumas características são essenciais para que espécies vegetais possam ser consideradas nos processos de fitorremediação, como tolerância às altas concentrações de poluentes no meio, mantendo o poluente no sistema radicular ou translocando-o para a parte aérea, fácil propagação, e ocorrência natural em áreas poluídas.

Observa-se com os resultados deste estudo que, *E. laeviglumis*, apresenta as principais características propostas por Vose (2000), podendo ser considerada como tolerante à presença de metais pesados apresentando mecanismo eficaz de retenção dos mesmos nos tecidos das raízes, limitando sua translocação para as partes aéreas.

Segundo Santana *et al.* (2014), maior retenção de metais nas raízes e consequentemente redução do transporte destes para as partes aéreas, pode ser considerado como importante mecanismo de tolerância, mas ao mesmo tempo se torna limitante para o uso da espécie nas técnicas de fitoextração. No entanto, tais espécies podem ser extremamente favoráveis na aplicação de biorremediação rizosférica através da fitoestabilização, ou seja, uma estratégia de inativação de contaminantes potencialmente tóxicos no solo (Vangronsveld *et al.*, 2009).

Essa limitação de transporte para as partes aéreas observado em *E. laeviglumis*, pode ter possibilitado a conservação de seu aparato fotossintético e consequentemente a manutenção de sua eficiência fotossintética em níveis similares às plantas que se desenvolveram em solo livre de drenagem ácida de mina, resultados que podem ser considerados requisitos

necessários para uma planta ser considerada com potencial para programas de fitorremediação, mais especificamente, fitoestabilização, em ecossistemas aquáticos poluídos por drenagem ácida.

6. REFERÊNCIAS

- Alexandre, N.Z. 1999. Diagnóstico Ambiental da Região Carbonífera de Santa Catarina: Degradação dos Recursos Naturais. *Revista de Tecnologia e Ambiente*, Criciúma, 5:2.
- Almeida, R.O.P.O. 2002. *Revegetação de áreas mineradas: Estudo dos procedimentos aplicados em minerações de areia*. 2002. 160f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; Departamento de Engenharia de Minas de Petróleo, São Paulo.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M, Cunha-Queda, A.C., Duarte, E. e Vallini, G. 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environmental International*, 33:505-513.
- Alves, M.V., A. C. Araújo, A. N. Prata, F. Vitta, S., Hefler, Trevisan, R., Gil, A.S.B., Martins, S. e Thomas, W. 2009. Diversity of Cyperaceae in Brazil. *Rodriguésia*, 60:771-782.
- Arduini, L., Godbold, D.L., Onnis, A., Stefani, A. 1998. Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere*, 36:739-744.
- Arnold, W., Mitrenga, D. e Mayersbach, H. 1975. Gefriertrocknung und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA)-ergebnisse histochemischer reaction. *Acta Histochemistry* 14:271-277.
- Baker, N.R., 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3:643-654.
- Baker, N.R., e Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55:1607-1621.

Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual review Plant Biology*, 59:89-113.

Barceló, J.e Poschenrieder, C.H.M 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelos y Planta*, 2:345-361.

Barceló, J., Poschenrieder, C.H.M. 1999. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. Pp 183-205 In: M.N.V. Prasad e J. Hagemeyer (eds.) *Heavy Metal Stress in Plants;from Molecules to Ecosystems*. Springer Verlag, Berlin.

Bini, C., Wahsha, M., Fontana, S. e Maleci, L. 2012. Effects of heavy metals on morphological characteristics of *Taraxacum officinale* Web growing on mine soils in NE Italy. *Journal of Geochemical Exploration*, 123:101-108.

Bjorkman, O. e Deming, B. 1987. Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504

Bozzola, J.J. e Russel, L.D. 1991. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Boston, Jones and Barlett Publishers.542p.

Bukatsch, F. 1972. Bermerkungen zur Doppel färbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61:255.

Chardonnens, A.N., Ten Bookum, W.M., Kuijper, D.J., Verkleij, J.A.C. e Ernst, W.H.O. 1998. Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiology Plantarum*, 104:75-80.

Chen, H., Qualls, R.G. e Blank, R.R. 2005. Effect of soil flooding on photosynthesis, carbohydrate partitioning and nutrient uptake in the invasive exotic *Lepidium latifolium*. *Aquatic Botany*, 82:250-268.

Cook, C.D.K. 1996. *Water plants of world*. Amsterdam, SPB Academic Publishing. 228p.

Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., Sharma, S., Kumar, R. e Mehta, D. 2011. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:1678-1684.

Diego-Pérez, N. 1997. *Cyperaceae*. In *Flora de Gerrero*, Universidad Nacional Autónoma de México, Cidade do México, pp.1-169.

Faria, A.D. 1998. *O gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas; Departamento de Botânica, Campinas.

Farooqui, A., Kulshreshtha, K., Srivastava, K., Singh, S.N., Farooqui, S.A., Pandey, V. e Ahmad, K.J. 1995. Photosynthesis, stomatal response and metal accumulation in *Cineraria maritima* L. and *Centaurea moschata* L. grown in metal-rich soil. *The Science of the Total Environment*, 164:203-207.

Farrar, J., Pollock, C. e Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science*, 154:1-11.

França, F., Melo, E.D.E; Góes Neto, A., Araújo, D., Bezerra, M.G., Ramos, H.M.; Castro, I. e Gomes, D. 2003. Flora vascular de açudes de uma região do semi-árido da Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 17:549-559.

Franklin, G.L. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resin and wood-resin composites, and a new marcerating method for wood. *Nature*, 3924:51.

Fungaro, D.A. e Izidoro, J.C. 2005. Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. *Quimica Nova*, 29:735-740.

Gill, R.A.I, Zang, L., Ali, B., Farooq, M.A., Cui, P., Yang, S., Ali, S. e Zhou, W. 2015. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 120:154–164.

Goetghebeur, P. 1998. Cyperaceae.. In: K. Kubitzki; H.Huber, P. Rudall; P. Stevens e T. Stützel (Eds.). *The families and genera of vascular plants*. Berlin, Spreng-Verlag, pp.141-190.

Gomes, M.P.; Marques, T.C.L.L.S.M., Nogueira, M.O.G., Castro, E.M. e Soares, A.M. 2011. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Scientia Agricola*, 68:566-573.

González-Elizondo, M.S., Tena-Flores, J.A., Alarcón-Herrera, M.A.T., Flores-Tavizón, E. e Barajas-Acosta, N. 2005. An arsenic-tolerant new species of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Chihuahua, Mexico. *Brittonia*, 57:150–154.

Ha, N.T.H., Sakakibara, M. e Sano, S. 2011. Accumulation of Indium and o ther heavy metals by *Eleocharis acicularis*: An option for phytoremediation and phytomining. *Bioresource Technology*, 102:2228–2234.

Hozhina, E.I., Khramov, A.A., Gerasimov, P.A., Kumarkov, A.A., 2001. Uptake of heavy metals, arsenic, and antimony by aquatic plants in the vicinity of ore mining and processing industries. *Journal of Geochemical Exploration* 74:153-162.

Inada, N., Sakai, A., Kuroiwa, H. e Kuroiwa, T. 1998. Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles, investigations by fluorescence and electron microscopy, *Planta*, 206:585–597

Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Will, 491p.

Jung, C., Maeder, V., Funk, F., Frey, B., Sticher, H. e Frossard, E. 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant and Soil*, 252:301-312

Khan, R.; Israili, S.H.; Ahmad, H. e Mohan, A. 2005. Heavy Metal Pollution Assessment in Surface Water Bodies and its Suitability for Irrigation around the Neyevli Lignite Mines and

Associated Industrial Complex, Tamil Nadu, India. *The Environment, 24 and mine Water*, 1: 155-161.

Kuckenberg, J., Tartachnyk, I. e Noga, G., 2009. Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precision Agric*, 10:34-44.

Kolber, Z. e Falkowski, P.G., 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnology Oceanographic*. 38:1646–1665.

Kraus, J.E. e Arduin, 1997. A. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, Seropédica. 198p.

Larcher, W. 2004. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, RiMa. 532p.

Li, H., Ye, Z. H., Wei, Z.J e Wong, M.H. 2011. Root porosity an radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake wetland plants. *Environmental Pollution*, 159:30-37

Lottermoser, B.G. e Ashley P.M. 2011. Trace element uptake by *Eleocharis equisetina* (spike rush) in an abandoned acid mine tailings pond, northeastern Australia: Implications for land and water reclamation in tropical regions. *Environmental Pollution*, 159:302-3035

Lux, A., Sottniková, A., Opatrná, J. e Greger, M. 2004. Differences in struture of adventitious roots in: *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia plantarum*, 120:537-545.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plant. 2. ed. NewYork, Academic, 889p.

Maxwell, K., e Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51:659-668.

Matias, L.Q., Amado, E.R. e Nunes, E.P. 2003. Macrófitas aquáticas da lagoa Jijoca de Jericoacoara, Ceará, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 17:623-623.

McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V. e Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry*, 22:1156-1158.

Mello, J.W.V; Abrahão, W.A.P. 1998. Geoquímica da drenagem ácida. In: *Recuperação de áreas degradadas*. Viçosa, p. 45-57.

Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15:523-530

Motta Marques, D.M.L., Pinheiro, C.B. E Crisman, T.L. 1997. *The effectiveness of constructed wetlands to manage coal acid mine drainage without external electron acceptors advanced wastewater treatment process*, University of Leeds Conference, UK.

Najeeb, U., Xu, L., Ali, S., Jilani, G., Gong, H.J., Shen, W.Q. e Zhou, W.J. 2009. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effuses* L. *Journal of Hazardous Materials*. 170:1156–1163.

Neves, J e Sambugaro, M.L. 2007. Revista Discente Expressões Geográficas. Florianópolis – SC, 2:145-164.

O'Brien, T.P., Feder N. e McCully, M.E. 1964. Polyehromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma*. 367-373

Ögren, E. e Öquist, G. 1985. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves, *Planta*, 166:380.

Pandey, S., Grupta, K., e Mukherjee, A.K. 2007. Impact of cadmium and lead on *Catharanthus roseus* - A phytoremediation study. *Journal of Environmental Biology*, 28:655-662.

- Pezeshki, S.R. 1995. Plant responses to flooding. In: Wilkinson, R.E. (Ed.), *Plant-Environment Interactions*. New York, Marcel Dekker, 321p.
- Pezeshki, S.R., 2001. Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46:299-312.
- Probst, A., Liu, H., Fanjul, M., Liao, B. e Hollande, E. 2009. Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: Geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environmental and Experimental Botany*, 66:297-308.
- Rai, V., Khatoon, S., Bisht, S.S. e Mehrotra, S. 2005. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *Chemosphere*, 61:1644-1650
- Rasband, W., ImageJ documentation. Disponível em: www.rsb.info.nih.gov, acesso em 13/10/2014
- Reynolds, E.S. 1963. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17:208.
- Ritchie, R.J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthetica*, 89:27-41.
- Ritchie, R.J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46: 115-126.
- Santana, B.V.N., Araújo, T.O., Andrade, G.C., Freitas-Silva, L., Kuki, K.N., Pereira, E.G., Azevedo, A.A. e Marschner Silva, L.C. 2014. Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:2550-256.

Schat, H., Llugany, M. e Bernhard, R. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non hyperaccumulating metallophytes. En: Terry N. y Banuelos G. Eds. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Boca Raton, Florida, CRC Press:171-188.

Scheibe, L.F. 2002. O carvão de Santa Catarina: mineração e consequências ambientais. In: Teixeira, E. C. (Coord.) *Meio Ambiente e Carvão Impactos da 50 exploração e utilização*. Porto Alegre: FINEP/ CAPES/ PADCT/ GTM/ PUCRS/UFSC/ FEPAM, *Cadernos de Planejamento e Gestão Ambiental* 2, 498p.

Shanon, J.C. 1968. A procedure for extraction and fractionation of Carbohydrates from imature *Zea mays* kernels. *Res. Bul.* 842:1-8

Sharma, P. e Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17:35-52.

Soikkeli, S. 1981. A review of the structural effects of the air pollution on mesophyll tissue on the plants at the light and transmission electron microscope level, *Savonia*, 4:11-54.

Souza, V.L., Silva D. C., Santana, K.B., Mielke, M. S., Almeida, A.F., Mangabeira, P.A.O. e Rocha, E. A. 2009. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas, *Acta botânica brasileira*. 23:343-354.

Spurr, A.R.J. 1969. *Ultrastructure Research Journal*. 26: 31.

Tirelli, J., Burgos, R. e Barbosa, T.C.P. 2007. *O campo de peixes e os senhores do asfalto: memórias das lutas do Campeche*. Florianópolis: Cidade Futura, p.107-108

Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J., 2008. In vivo assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of Mycorrhization on host plants.

Trevisan, R. e Boldrini, I. I. 2006. A New Species of *Eleocharis* R. Brown (Cyperaceae) from Southern Brazil. *Missouri Botanical Garden Press*, 16:155-157.

Trevisan, R, González-Elizondo, M.S., Rosen, D.J. e Boldrini I.I. 2012. Three new species of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Brazil. *Brittonia*, 64:15–22.

Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter, M., Lux A., e Hauser M.T. 2012. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environmental Pollution*, 163:117-126.

Van Assche, F. e Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 13:195-206.

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D. e Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16: 765-794.

Vose, J.M., Wayne T. S., Harvey G.J., Clinton B.D. e Sobek C. 2000. Leaf water relations and sapflow in Eastern cottonwood (*Populus detoides* Bartr.) trees planted for phytoremediation of a groundwater pollutant. *International Journal of Phytoremediation*, 2:53-73.

Webb, W.L, Newton, M. e Starr, D. 1974. Carbon dioxide Exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia*, 17: 281-291

Weis, J.S. e Weis, P. 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International*. 2: 685-700

Williams, W.E., Gorton, H.L. e Witiak, S. M. 2003. Chloroplast movements in the field. *Plant Cell Environment*, 26:2005-2014.

Wójcik, M., Vangronsveld, J., D'haen, J. e Tukiendorf, A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, 53:163-171.