

GLÁDIS DE OLIVEIRA JUCOSKI

**TOXICIDADE DE FERRO E METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EM
Eugenia uniflora L.**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae***

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

J91t
2011

Jucoski, Gládis de Oliveira, 1973-
Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em
Eugenia uniflora L. / Gládis de Oliveira Jucoski. – Viçosa,
MG, 2011.
xiv, 77f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Cambraia.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Stress oxidativo. 2. Pitanga. 3. Plantas - Nutrição.
4. Crescimento (Plantas). 5. Plantas - Efeito do ferro.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

GLÁDIS DE OLIVEIRA JUCOSKI

**TOXICIDADE DE FERRO E METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EM
Eugenia uniflora L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Aprovada em: 31 de maio de 2011

Dra. Kacilda Naomi Kuki

Prof. Dr. José Donizete Alves

**Prof. Dr. Juraci Alves de Oliveira
(Co-Orientador)**

**Prof. Dr. Sérgio Oliveira de Paula
(Co-Orientador)**

**Prof. Dr. José Cambraia
(Orientador)**

Aos meus pais, Pedro
e Dilce, meu porto seguro; e
ao meu irmão Alexandre,

MINHA HOMENAGEM.

Ao Moisés, meu parceiro,
e a todos meus amigos,
irmãos de coração,

OFEREÇO e DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor José Cambraia, pela oportunidade, orientação, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos professores Juraci Alves de Oliveira, Marco Antônio Oliva e Sérgio Oliveira de Paula, pela co-orientação e apoio.

Aos professores José Donizete Alves, Kacilda Naomi Kuki, Marco Aurélio Pedron e Silva e Marília Contin Ventrella pelas sugestões na banca de qualificação e defesa.

Aos funcionários José Antônio Bhering, Luciane de Almeida Fernandes e Rogério Mauro Gomide, pela disponibilidade, ajuda e atenção.

Aos meus amigos, companheiros de bancada, Dani Cassol, Leandro, Élcio, Cleber e Flávio pelas horas de convívio e descontração, amizade e auxílio em minha formação.

A todos os meus amigos, os quais guardo com carinho em meu coração, em especial, Alice, André, Bina, Camilo, Carol Muller, Cleber, Danilão, Eliane carioca, Ivan, Jocleita, Jorge, Joseila, Marcos, Mi Pacheco, Nani, Rosilene, Valdir, Vanessa, pela amizade, companheirismo, convívio e por serem muito importantes para mim.

A todos os colegas do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelo convívio.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

GLÁDIS DE OLIVEIRA JUCOSKI, filha de Pedro Aurélio Jucoski e Dilce Aparecida de Oliveira Jucoski, nascida em Viamão, estado do Rio Grande do Sul, aos 20 dias do mês de dezembro de 1973.

Em fevereiro de 2003 graduou-se Engenheira Florestal na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Em abril de 2005 obteve o título de Mestre em Agronomia, área de concentração, Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria.

Em março de 2007 iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa. Em abril de 2011 submeteu-se a defesa da tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Material sólido particulado e a contaminação ambiental	1
1.2. Absorção, distribuição e acúmulo de ferro	3
1.3. O ferro e o estresse oxidativo	4
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO I - Absorção, acúmulo e distribuição de ferro e seus efeitos sobre o crescimento de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> L., submetidas a níveis tóxicos deste elemento	13
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Avaliação do efeito de doses crescentes de ferro sobre o crescimento de <i>Eugenia uniflora</i>	16
2.2. Efeito da combinação de diferentes concentrações de FeEDTA e tempos de exposição aos tratamentos sobre variáveis de crescimento de <i>Eugenia uniflora</i>	17
2.3. Delineamento experimental	19

3. RESULTADOS.....	19
3.1. Efeito de doses crescentes de FeEDTA na solução nutritiva sobre algumas variáveis de crescimento.....	19
3.2. Efeito de diferentes concentrações de FeEDTA sobre o crescimento das plantas em função do tempo de exposição aos tratamentos	21
3.3. Efeito do ferro sobre os teores de alguns minerais em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>	28
3.4. Cinética de absorção de ferro.	30
4. DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CAPÍTULO II - Metabolismo antioxidativo em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> L., submetidas a níveis tóxicos de ferro.....	43
---	-----------

RESUMO	43
---------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO	44
----------------------------	-----------

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
-----------------------------------	-----------

2.1. Determinação da intensidade de peroxidação de lipídios em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , submetidas a níveis tóxicos de Fe.....	46
2.2. Determinação das atividades de enzimas antioxidativas.....	47
2.3. Determinação da concentração de metabólitos do sistema antioxidante.....	50
2.4. Delineamento experimental	51

3. RESULTADOS.....	52
---------------------------	-----------

4. DISCUSSÃO	61
---------------------------	-----------

5. CONCLUSÕES	68
----------------------------	-----------

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = ascorbato
APX = peroxidase do ascorbato
BSA = albumina de soro bovino
CAT = catalase
DAT = dias após a aplicação dos tratamentos
DCB = ditionito-citrato-bicarbonato
DHA = desidroascorbato
DMSO = dimetilsulfóxido
DNA = ácido desoxirribonucléico
DTT = ditionitrito
EDTA = ácido etileno diaminotetracético
FAD = flavina adenina dinucleotídeo
GSH = glutationa reduzida
GPX = peroxidase da glutationa
GR = redutase da glutationa
GSSG = glutationa oxidada
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
HO• = radical hidroxila
Fe²⁺ = ferro ferroso
Fe³⁺ = ferro férrico
MDA = aldeído malônico
MF = matéria fresca
MSP = material sólido particulado
MSPFe = material sólido particulado de ferro
NADP = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT = azul de ρ -nitro tetrazólio
NaOH = hidróxido de sódio
¹O₂ = oxigênio singleto
O₂•⁻ = radical ânion superóxido
PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfônico
POX = peroxidase total
PVPP = polivinilpolipirrolidona
ROS = espécies reativas de oxigênio
SH = sulfidrila
SOD = dismutase do superóxido
TBA = ácido tiobarbitúrico
TCA = ácido tricloroacético

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - Absorção, acúmulo e distribuição de ferro e seus efeitos sobre o crescimento de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> L., submetidas a níveis tóxicos deste elemento	13
Figura 1 - Efeito da aplicação de doses crescentes de FeEDTA sobre o comprimento da raiz primária, a altura da parte aérea e o número de folhas em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , aos 45 dias após o início da aplicação do tratamento.....	20
Figura 2 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a produção da matéria seca das raízes, caules, folhas e total em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , aos 45 dias após o início do tratamento.....	21
Figura 3 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre o crescimento e aspectos morfológicos de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , 45 dias após a aplicação dos tratamentos. (a) Crescimento da parte aérea em função de diferentes concentrações de FeEDTA; (b) Sintomas de toxidez de Fe nas folhas e pontos de abscisão de folhas mais velhas na parte inferior da planta; (c) Aspectos morfológicos do efeito de concentrações crescentes de FeEDTA na parte aérea e raízes; (d) Efeito de concentrações crescentes de FeEDTA sobre o comprimento e a coloração das raízes.	22
Figura 4 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de clorofila <i>a</i> (a), clorofila <i>b</i> (b) e carotenóides totais (c) em folhas de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.	23
Figura 5 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre número de folhas (a), altura da parte aérea (b) e comprimento da raiz primária (c) em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.	25
Figura 6 - Efeito da aplicação de Fe-EDTA na produção da matéria seca das folhas (a), do caule (b), das raízes (c) e total (d) em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.....	26
Figura 7 - Efeito da aplicação de FeEDTA na partição da biomassa aos 0 (a), 15 DAT (b), 30 DAT (c) e 45 DAT (d) em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> , após o início do tratamento.	27
Figura 8 - Velocidade de absorção de Fe (v) por plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> tratadas com FeEDTA nas concentrações de 0,045, 1,0 e 2,0 mM, durante 45 dias.	31

CAPÍTULO II - Metabolismo antioxidativo em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> L., submetidas a níveis tóxicos de ferro	43
Figura 1 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a peroxidação dos lipídios nas folhas (a) e raízes (b) em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.....	52
Figura 2 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre as atividades da SOD e CAT nas folhas (a, c) e raízes (b, d) em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.....	53
Figura 3 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a atividade POX (a, b), APX (c, d) e GPX (d, e) nas folhas e raízes em plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.....	56
Figura 4 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a atividade da GR nas folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de em função do tempo de aplicação do tratamento.....	57
Figura 5 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de ascorbato reduzido (AA), desidroascorbato (DHA) e a razão AA/DHA em folhas e raízes de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.....	58
Figura 6 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a razão GSH/GSSG em folhas e raízes de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i>, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Absorção, acúmulo e distribuição de ferro e seus efeitos sobre o crescimento de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> L., submetidas a níveis tóxicos deste elemento	13
Tabela 1 - Teores de alguns minerais em folhas, caule e raízes de plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> submetidas a diferentes concentrações de FeEDTA (0,045, 1,0 e 2,0 mM) em diferentes tempos de exposição aos tratamentos (15, 30 e 45 DAT).	29
Tabela 2 - Efeito de concentrações crescentes de Fe sobre as constantes cinéticas de absorção de Fe por plantas jovens de <i>Eugenia uniflora</i> tratadas com FeEDTA nas concentrações de 0,045, 1,0 e 2,0 mM, durante 45 dias.....	30

RESUMO

JUCOSKI, Gládis de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L.** Orientador: José Cambraia. Co-orientadores: Juraci Alves de Oliveira e Sérgio Oliveira de Paula.

O ferro é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Quando em excesso, porém, pode induzir a produção e acúmulo de espécies ativas de oxigênio, causando estresse oxidativo levando a uma redução do crescimento e, portanto, diminuição na produtividade das plantas. O objetivo do trabalho foi, portanto, avaliar o efeito de níveis tóxicos de Fe sobre a absorção e acúmulo deste elemento, e suas consequências sobre o metabolismo antioxidativo e o crescimento de plantas jovens de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Quarenta e cinco dias após a semeadura, plantas de *E. uniflora* foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, aos seguintes tratamentos: três concentrações de Fe (0,045, 1,0 e 2,0 mM), aplicado na forma de FeEDTA e três tempos de avaliação (15, 30 e 45 dias após início da aplicação do tratamento). Para cada tempo de tratamento, foram avaliadas as variáveis: número de folhas, crescimento em altura, comprimento da raiz primária, produção da matéria seca de folhas, caule, e raízes e determinados os teores de clorofila, carotenóides totais, P, Fe, Zn, Cu e Mg. Adicionalmente, foi determinado a cinética de absorção de Fe após aplicação dos tratamentos anteriormente mencionados. Além disso, determinou-se os teores de MDA, a atividade das enzimas SOD, CAT, POX, APX, GPX e GR e os teores de AA, DHA, GSH, GSSG e as razões AA/DHA, GSH/GSSG em folhas e raízes. O tratamento das plantas com níveis tóxicos de Fe resultou em decréscimo no comprimento da raiz primária, na matéria seca das três partes da planta e nos teores de pigmentos cloroplastídicos e, foram observados sintomas visuais típicos de toxidez de Fe. O excesso de Fe, também, causou uma mudança na partição de biomassa da matéria seca, com aumento relativo das folhas em relação às demais partes da planta e reduziu os teores de Zn, Cu e Mn, enquanto o de P permaneceu essencialmente inalterado nas diferentes partes da planta. O tratamento das plantas

com níveis tóxicos de Fe alterou o sistema de transporte, aumentando os valores das constantes cinéticas de absorção deste elemento (V_{\max} e K_m), resultando em maior absorção de Fe e, conseqüentemente, gerando os efeitos tóxicos manifestados sobre o crescimento das plantas. Além disso, o aumento da concentração de ferro na solução nutritiva resultou aumento da intensidade de peroxidação de lipídios, principalmente folhas. As atividades das enzimas antioxidativas SOD e GR aumentaram com os níveis de Fe na solução e com o período experimental. As enzimas CAT, POX e APX aumentaram suas atividades com o acréscimo da concentração de Fe, mas decresceram com o tempo de exposição aos tratamentos. A atividade da GPX diminuiu com o aumento da concentração de Fe e com o tempo de exposição. Os teores de AA e de GSH e as relações AA/DHA e GSH/GSSG, de modo geral, aumentaram com a concentração de Fe e com o tempo de tratamento. Os resultados indicam que plantas de *E. uniflora* sob níveis tóxicos de Fe, sofrem estresse oxidativo, que é atenuado tanto por mudanças nas atividades de enzimas antioxidativas quanto por mudanças nos teores de alguns metabólitos antioxidativos como AA e GSH.

ABSTRACT

JUCOSKI, Gládis de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May of 2011. **Iron toxicity and oxidative metabolism in *Eugenia uniflora* L.** Adviser: José Cambraia. Co-Advisers: Juraci Alves de Oliveira and Sérgio Oliveira de Paula.

Iron is an essential micronutrient for growth and development of plants. In excess, however, may induce the production and accumulation of reactive oxygen species, causing oxidative stress leading to reduced growth and thus, decreasing crop productivity. The aim of this study was to evaluate the effects of iron toxicity on the absorption and accumulation, on antioxidant metabolism and growth of young plants of *Eugenia uniflora* L.. Forty-five days-old *E. uniflora* seedlings were exposed in Hoagland solution, pH 5.0 at half ionic strength, the following treatments: three levels of Fe (0.045, 1.0 and 2.0 mM), applied as FeEDTA and three exposure times (15, 30 and 45 days after Fe treatment). At the end of each treatment time, the parameters were determined: leaves number, plant height, primary root length, dry matter production of leaves, stems, and roots and chloroplastidic pigments, P, Fe, Zn, Cu and Mg contents. Additionally, it was determined the kinetic parameters of iron absorption after application of the treatments above mentioned. In addition, the MDA levels, activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POX, APX, GPX and GR) and AA, DHA, GSH, GSSG and AA/DHA contents and GSH/GSSG ratio in the leaves and roots were determined. The treatment of plants with toxic levels of Fe resulted in a decrease in the primary root length, the dry matter production of the three parts of the plant and pigment contents and typical visual symptoms of Fe toxicity were observed. Iron in excess also caused a shift in biomass partitioning of the dry matter, with relative increase of the leaves in relation to other parts of the plant and reduced Zn, Cu and Mn contents, while P content remained essentially unchanged at the different parts of the plant. The treatment of plants with toxic levels of Fe changed the activity of the transport system, increasing the kinetic constants of Fe absorption (V_{max} and K_m), resulting in increased iron absorption by plant, resulting in the toxic effects exhibited on plant growth. In addition, the increased levels of iron in the nutrient solution resulted in higher intensity of lipid peroxidation, mainly leaves. The

activities of the antioxidant enzymes SOD and GR increased with the levels of Fe in the solution and with the time of exposure to the treatments. CAT, POX and APX activities enhanced with plant treatment with high Fe concentration, but decreased with the time of exposure to treatments. The GPX activity reduced with increasing Fe concentration and exposure time. Generally, AA and GSH contents and the AA / DHA and GSH / GSSG ratios increased with Fe concentration and time of exposure to treatments. The results show that *E. uniflora* seedlings under toxic levels of Fe undergo oxidative stress, which is mitigated both by changes in the activities of antioxidative enzymes and by changes in levels of some antioxidant metabolites such as AA and GSH.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A indústria minero-metalúrgica constitui um dos mais importantes componentes da economia do estado de Minas Gerais, tendo recebido 67% do total de investimentos nesse Estado, onde a maior parte foi alocada à região central. Nesta região estão algumas das mais importantes mineradoras, siderúrgicas e aciarias do Brasil.

As atividades minero-metalúrgicas resultam, por outro lado, na degradação de áreas e na contaminação do meio ambiente, incluindo solo, água e ar. A contaminação do ambiente pelos poluentes emitidos e, ou descartados, entretanto, não fica restrita apenas ao elemento ferro, mas abrange vários metais pesados de elevada toxidez para seres humanos, animais e vegetais.

A toxidez de ferro usualmente não é problema na maioria dos solos, exceto em solos alagados ou em áreas em que o minério de ferro está sendo extraído, e ou recebendo beneficiamento. Usinas de pelletização de minério de ferro, por exemplo, são responsáveis pelo aumento dos níveis atmosféricos de muitos poluentes, especialmente óxido férrico e gases tóxicos, como óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, monóxido e dióxido de carbono. Esses poluentes são gerados em praticamente todas as etapas da produção, incluindo a queima de combustíveis fósseis, o manuseio do minério de ferro, o armazenamento, o transporte e a recuperação de produtos (Ottaway, 1982).

1.1. Material sólido particulado e a contaminação ambiental

Indústrias, mineração e atividades agrícolas têm sido apontadas como as principais responsáveis pela contaminação do ar, solo e água por metais, originando problemas ambientais (Briat e Lebrun, 1999). Como as plantas estão diretamente expostas a estes poluentes são elas que sofrem e refletem o grau de contaminação do ambiente. O conhecimento dos mecanismos que controlam a absorção, a distribuição e o acúmulo destes poluentes, bem como dos mecanismos envolvidos na resistência das plantas a níveis tóxicos é de fundamental importância (Briat e Lebrun, 1999)

para a seleção e, ou melhoramento de plantas capazes de detectar e, ou desintoxicar áreas poluídas, sem comprometimento dos sistemas biológicos.

Diversos tipos de indústrias mineradoras emitem para a atmosfera o chamado “material sólido particulado” (MSP). O MSP é constituído de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos, cuja composição pode variar significativamente, dependendo da natureza dos materiais industrializados e da localização da fonte de emissão. Este MSP poderá afetar a vegetação diretamente, pela deposição na superfície foliar, ou indiretamente pela deposição no solo, alterando suas propriedades químicas ou diminuindo a radiação que chega à superfície da terra (Almeida, 1999; Grantz et al., 2003). A deposição deste material além de reduzir a radiação recebida, provoca aumento da temperatura foliar e bloqueio da abertura estomática, reduzindo a taxa fotossintética e a produção de carboidratos, necessários ao crescimento normal das plantas (Farmer, 1993).

No litoral do estado do Espírito Santo, uma das principais indústrias responsável pela exploração e beneficiamento do minério de ferro localiza-se próxima a fragmentos de restinga. Durante o beneficiamento é gerado minério de ferro em pó (ou material sólido particulado de ferro – MSPFe), que pode causar danos à vegetação nativa uma vez que ao ser absorvido pelas plantas eleva os teores tissulares deste elemento resultando em reduções significativas nas taxas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e induzindo estresse oxidativo (Neves et al., 2009; Pereira et al., 2009). Além do agravante provocado pelo MSP, o MSPFe apresenta adicionalmente o inconveniente de elevar excessivamente os níveis de ferro nos solos e nas plantas.

Neste sentido, o ferro em excesso no solo pode precipitar em torno das raízes das plantas, formando uma crosta de óxido de ferro comumente chamada de “placa de ferro” (Ando et al., 1983). Considerado um mecanismo de tolerância ao excesso de ferro por alguns pesquisadores, estas placas de hidróxidos de Fe formadas em torno das raízes, as quais apresentam propriedades químicas e físicas similares aos óxidos de Fe encontrados no solo (Bacha e Hosnerr, 1997), são capazes de adsorver nutrientes como o fósforo, potássio e zinco (Kuo et al., 1996; Zhang et al., 1999) podendo levar a um distúrbio nutricional nessas plantas. Além disso, as plantas que se desenvolvem sob condições de elevados níveis de Fe podem sofrer estresse

oxidativo, com a formação de intermediários reativos de oxigênio, principalmente pela formação de radicais hidroxila.

A escassez de dados sobre a sensibilidade das espécies tropicais em relação à poluição, inclusive a de Fe, limita a aplicação de possíveis programas de biomonitoramento e, ou de outros tipos de avaliação de impactos ambientais, reforçando a necessidade de mais estudos sobre essas espécies (Silva, 2003).

1.2. Absorção, distribuição e acúmulo de ferro

O Fe representa um dos mais versáteis metais na biologia. Considerado um nutriente essencial, o Fe está diretamente envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e de hormônios (Becana et al., 1998; Briat e Lobréaux, 1997).

O Fe é componente de muitas proteínas e enzimas envolvidas em diferentes processos celulares incluindo citocromos, catalase, peroxidases não-específicas, dismutase do superóxido, enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, nitrogenase, leghemoglobina e várias enzimas envolvidas na biossíntese de clorofilas (Asada, 1992; Kampfenkel et al., 1995).

Suas funções são baseadas principalmente na reversibilidade das reações de redox dos íons Fe^{2+} (ferroso) e Fe^{3+} (férico), que lhe permitem participação na transferência de elétrons nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, em pH fisiológico (Becana et al., 1998; Briat e Lobréaux, 1997; Hell e Stephan, 2003).

Os vegetais apresentam diferentes estratégias para absorção de ferro pelas raízes sob diferentes condições de solo. Na estratégia I, comumente encontrada em dicotiledôneas, as plantas melhoram a absorção de ferro pela: (i) excreção de prótons mediada pela H^+ -ATPase da membrana plasmática, acidificando a solução da rizosfera e, assim, aumentando a solubilidade de Fe^{3+} ; (ii) redução do Fe^{3+} por uma redutase de quelato- Fe^{3+} para a forma Fe^{2+} , mais solúvel; e (iii) transporte do Fe^{2+} através da membrana plasmática por um transportador de Fe^{2+} (Hell e Stephan, 2003). As redutases de quelato- Fe^{3+} são proteínas integrais da membrana plasmática e são codificadas por genes FRO e pertencentes a uma família de proteínas que transferem elétrons do NADPH citossólico para o FAD e, subsequentemente, via

grupos heme, para aceptores de elétrons no lado externo da plasmalema (Waters et al., 2002).

Uma vez no córtex, o ferro (complexado e re-oxidado) passa de uma célula a outra através de plasmodesmas, até chegar ao xilema onde é encontrado, em grande parte, na forma de citrato férrico (Briat e Lobréaux, 1997). A absorção de ferro pelas células do mesofilo também requer uma etapa de redução, com liberação do íon férrico da molécula de citrato, sugerindo a existência de um transportador específico de Fe^{2+} localizado na plasmalema das células foliares (Bruggemann et al., 1993).

Apesar do forte controle pelo sistema de absorção nas raízes as plantas podem acumular Fe em função de condições ambientais desfavoráveis. O excesso de Fe, não usado pelo metabolismo celular, necessita, portanto, ser armazenado, prevenindo a manifestação de sua toxicidade (Briat e Lebrun, 1999).

O armazenamento de Fe pode ocorrer nos vacúolos, ligado a certos ácidos orgânicos e aminoácidos (Briat e Lebrun, 1999) ou no apoplasto na forma oxidada e precipitada como hidróxido ou sal de fosfato (Kosegarten et al., 1999). Além disso, parte do ferro pode ser armazenada em forma biodisponível de ferritina (Harrison e Arosio, 1996).

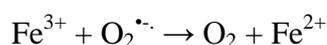
1.3. O ferro e o estresse oxidativo

Devido às suas propriedades físico-químicas, o ferro em excesso pode deslocar o balanço redox celular para um estado pró-oxidante, levando a uma diversidade de sintomas morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (Briat e Lebrun, 1999; Hell e Stephan, 2003), gerando estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1984).

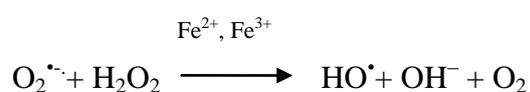
O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) embora causem danos oxidativos às células, não o fazem com tanta intensidade quanto os chamados radicais hidroxilas (HO^{\cdot}). Ânion superóxido e peróxido de hidrogênio podem reagir com excesso de Fe^{2+} livre na célula, através da reação de Fenton (Becana et al., 1998; Hell e Stephan, 2003; Vansuyt et al., 1997). Numa primeira fase o Fe^{2+} reage com H_2O_2 produzindo radicais hidroxilas:



Nos sistemas biológicos, contudo, o consumo de Fe^{2+} poderia limitar a reação; íons Fe^{3+} , entretanto, podem ser reciclados para a forma ferrosa por agentes de redução como os superóxidos:



O conjunto destas duas reações, chamado reação de Haber-Weiss, explica a formação de radicais hidroxílicos, na presença de Fe^{2+} :



Os radicais hidroxilas são espécies de oxigênio extremamente reativas, não-seletivas, oxidando quase todas as moléculas encontradas em células vivas, incluindo DNA, proteínas, lipídios, membranas e açúcares (Becana et al., 1998; Connolly e Guerinot, 2002; Hell e Stephan, 2003; Sinhá et al., 1997).

Além disso, o excesso de Fe^{2+} livre nos sistemas vegetais acelera a oxidação, mediada pelo O_2 e H_2O_2 , de importantes metabólitos como ascorbato, glutatona e nucleotídeos (Becana et al., 1998; Kampfenkel et al., 1995); estimula a produção de etileno (Peng e Yamauchi, 1993); inibe a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (Santos et al., 2001); aumenta o teor de citocromo b_6f nos cloroplastos (Suh et al., 2002), reduz o teor de clorofila (Neves et al., 2009), contribuindo para aparecimento de manchas cloróticas e marrons e para a diminuição da taxa fotossintética (Kampfenkel et al., 1995; Neves et al., 2009) e, conseqüentemente, do crescimento e da produtividade da planta (Neves et al., 2009).

A intensificação do estresse oxidativo, por sua vez, elicita a ativação de sistemas de defesa antioxidantes (Briat e Lebrun, 1999) de natureza enzimática e não-enzimática (Becana et al., 1998; Vansuyt et al., 1997). O sistema de defesa não-enzimático pode ser de natureza lipossolúvel, onde se destacam carotenos, xantofilas, ácido lipóico e α -tocoferol, que são capazes de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo a peroxidação lipídica e interrompendo a propagação de ciclos oxidativos entre radicais orgânicos (Demming-Adans et al., 1996); ou de natureza hidrossolúvel, que opera na membrana ou no estroma, agindo diretamente

sobre os radicais livres, eliminando-os (Becana et al., 1998; Noctor e Foyer, 1998; Mittler, 2002). Os antioxidantes hidrossolúveis mais abundantes em plantas são o ácido ascórbico e a glutathiona (Noctor e Foyer, 1998).

O ascorbato/desidroascorbato e a glutathiona, além de suas importâncias individuais, estão interligados pelo ciclo ascorbato-glutathiona (Noctor e Foyer, 1998). O ácido ascórbico, além de eliminar H_2O_2 , também remove $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 e HO^{\cdot} e, ainda, inibe reações desencadeadas por ROS, protegendo os lipídios de membrana (Noctor e Foyer, 1998).

A glutathiona é um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína. Trata-se do maior composto tipo tiol não-protéico de baixa massa molecular para muitas plantas e, é considerada essencial para o funcionamento normal de vários processos celulares (Edwards et al., 1994). A glutathiona pode agir de diferentes maneiras. Funciona como substrato da peroxidase da glutathiona na remoção do H_2O_2 evitando a peroxidação de lipídios. Além disso, a glutathiona na forma reduzida (GSH) pode reagir quimicamente com oxigênio singlete e radical hidroxila, protegendo os grupos SH de certas enzimas e, ainda tem papel importante na regeneração do ascorbato (Noctor e Foyer, 1998). A glutathiona pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG).

O sistema enzimático de defesa antioxidativo é constituído de enzimas como a dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidases (POX, E.C. 1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11); peroxidase da glutathiona (GPX, E.C. 1.11.1.9) e redutase da glutathiona (GR, E.C. 1.6.4.2) que atuam na eliminação dos vários tipos de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Becana et al., 1998; Fang e Kao, 2000).

As dismutases dos superóxidos são metaloproteínas encontradas em animais, plantas e microorganismos. As SODs são enzimas-chave na proteção das células catalisando a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ e produzindo H_2O_2 e O_2 (Alscher et al., 2002; Ehsani-Moghaddam et al., 2006). O peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada pela SOD pode ser eliminado pelas CAT e APX (Arora et al., 2002). Em plantas superiores as SODs apresentam-se sob a forma de diferentes isoenzimas, classificadas de acordo com o íon metálico presente no grupo prostético: Mn-SOD (mitocôndrias e peroxissomos), Cu/Zn-SOD (cloroplastos e citossol) e Fe-SOD

(cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias) (Alscher et al., 2002; Giannopolitis e Ries, 1977).

As catalases são enzimas tetraméricas que possuem grupo Fe-heme, encontradas em peroxissomos e glioxissomos de animais e vegetais (Asada, 1992; Becana et al., 1998), capazes de decompor H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Moller, 2001).

As peroxidases, também, decompõem H_2O_2 , mas diferentemente da catalase, elas podem utilizar vários compostos orgânicos como doadores de elétrons para a redução do H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Asada, 1992). A peroxidase do ascorbato (APX) utiliza o ácido ascórbico como substrato redutor, doando elétrons para a eliminação de H_2O_2 (Asada, 1992). Essa enzima é específica de plantas, sendo encontrada nos cloroplastos, citossol, peroxissomos e mitocôndrias (Arora, et al., 2002; Mittler, 2002). A APX é enzima-chave no funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa, em que o ascorbato é reciclado pela oxidação da glutatona reduzida (Becana et al., 1998). A peroxidase da glutatona (GPX), por outro lado, utiliza a glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons catalisando a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos ou lipídicos (Eshdat et al., 1997).

A redutase da glutatona (GR) catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) produzindo duas moléculas de glutatona reduzida (Carlberg e Mannervik, 1985). A GR é dependente de NAD(P)H e participa de reações do ciclo ascorbato-glutationa, sendo de grande importância na manutenção dos níveis elevados de GSH, substrato utilizado pela redutase do desidroascorbato (DHAR) na regeneração ascorbato (Mittova et al., 2004; Noctor e Foyer, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a absorção, o acúmulo e a distribuição do ferro e seus efeitos sobre o metabolismo antioxidativo em plantas jovens de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), submetidas a níveis tóxicos de ferro.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir os objetivos gerais, os seguintes parâmetros foram estudados:

- a) O crescimento e desenvolvimento de plantas de *Eugenia uniflora*, em solução nutritiva, sob condições de toxidez de ferro;
- b) a absorção, o acúmulo e a distribuição de ferro nas diferentes partes das plantas;
- c) a indução de estresse oxidativo e a reação dos principais mecanismos antioxidativos, de caráter enzimático e não-enzimático, utilizados pelas plantas de *Eugenia uniflora* na defesa contra o excesso de ferro aplicado em solução nutritiva.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I.T. **A poluição atmosférica por material particulado na mineração a céu aberto**. Dissertação de mestrado em Engenharia, EP/USP, 194p. 1999.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1331-1341, 2002.

ANDO, T.; YOSHIDA, S.; NISHIYAMA, I. Nature of oxidizing Power of Rice roots. **Plant and Soil**, 72: 57-71, 1983.

ARORA, A., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, 82: 1227-1238, 2002

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85: 235-241, 1992.

BACHA, R.E.; HOSSNER, L.R. Characteristics of coating formed on rice roots as affected by iron and manganese additions. **Soil Science Society of America Journal**, 41: 931-935, 1977.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ORMAETXE, I. I. Iron–dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, 201: 137-147, 1998.

BRIAT, J.F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, 2: 187-193, 1997.

BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **C.R. Académie des Science**, 322: 43-54, 1999.

BRUGGEMANN, W.; MASS-KANTEL, K.; MOOG, P. R. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. **Planta**, 190: 151-155, 1993.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, 113: 484-495, 1985.

CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M. L. Iron stress in plants. **Genome Biology**, 3: 10241-10245, 2002.

- DEMMING-ADAMS, B.; GILMORE, A.M.; ADAMS, W.W. In vivo functions of carotenoids in higher plants. **FASEB Journal**, 10: 403-412, 1996.
- EDWARDS, E.A.; ENARD C.; CREISSEN G.P. e MULLINEAUX, P.M. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. **Planta**, 192: 137-143, 1994.
- EHSANI-MOGHADDAM, B.; CHARLES, M.T.; CARISSE, O. e KHANIZADEH S., Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. **Journal of Plant Physiology**, 163: 147-153, 2006.
- ESHDAT, Y., HOLLAND, D., FALTIN, Z., BEM-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, 100: 234-240, 1997.
- FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess of iron, copper and zinc. **Plant Science**, 158: 71-76, 2000.
- FARMER, A.M. The effects of dust on vegetation a review. **Environmental Pollution**, 79: 63-75, 1993.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59: 309-314, 1977.
- GRANTZ, D. A., SILVA, V., TOYOTA, M., OTT, N. Ozone increases root respiration but decreases leaf CO₂ assimilation in cotton and melon. **Journal of Experimental Botany**, 391: 2375-2384, 2003.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, 219: 1-14, 1984.
- HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1275: 161-203, 1996.
- HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, 216: 541-551, 2003.
- KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225: 165-167, 1995.
- KOSEGARTEN, H.U.; HOFFMANN, B.; MENGEL, K. Apoplastic pH Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. **Plant Physiology**, 121: 1069-1079, 1999.
- KUO, S. Concurrent sorption of phosphate and zinc, cadmium, or calcium by a hydrous ferric oxide. **Soil Science Society of America Journal**, 50: 1412-1419, 1986.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7: 405-408, 2002.

MITTOVA, V., GUY, M., TAL, M., VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Experimental Botany**, 55: 1105-1113, 2004.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52: 561-591, 2001.

NEVES, N. R.; OLIVA, M.A.; CENTENO, D.C.; COSTA, A.C.; RIBAS, R.F.; PEREIRA, E.G. Photosynthesis and oxidative stress in the resting plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, 407: 3740-3745, 2009.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49: 249-79, 1998.

OTTAWAY, J. H. **Bioquímica da poluição**. E.P.U. EDUSP, p 33-35. 1982.

PENG, X.X.; YAMAUCHI, M. Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron. **Plant and Soil**, 149: 227-234. 1993.

PEREIRA, E.G.; OLIVA, M.A.; KUKI, K.N.; CAMBRAIA, J. Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees**, 23:277-285. 2009.

SANTOS, P. S.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; ALVES, P. C. C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1512: 357-366, 2001.

SILVA, L. C. **Avaliações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre espécies vegetais**. Tese de doutorado, Viçosa, UFV, 109p., 2003.

SINHÁ, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 38: 286-291, 1997.

SUH, H. J.; KIM, C. S.; LEE, J. Y.; JUNG, J. Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology**, 75: 513-518, 2002.

VANSUYT, G.; LOPES, F.; INZÉ, D.; BRIAT, J. F.; FOURCROY, P. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letters**, 410: 195-200, 1997.

ZHANG, X., ZHANG, F., MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. **Plant and Soil**, 209: 187-192, 1999.

WATERS, B.M.; BLEVINS, G.; EIDE, D.J. Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition. **Plant Physiology**, 129: 85-94, 2002.

CAPÍTULO I

ABSORÇÃO, ACÚMULO E DISTRIBUIÇÃO DE FERRO E SEUS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE *Eugenia uniflora* L., SUBMETIDAS A NÍVEIS TÓXICOS DESTE ELEMENTO

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Em excesso, porém, este elemento pode levar a uma redução do crescimento e, portanto, diminuição na produtividade das plantas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de níveis tóxicos de Fe sobre a absorção e acúmulo deste elemento e suas consequências sobre o crescimento de plantas jovens de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Quarenta e cinco dias após a semeadura, plantas de *E. uniflora* foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, aos seguintes tratamentos: três níveis de Fe (0,045 (controle), 1,0 e 2,0 mM), aplicado na forma de FeEDTA e três tempos de avaliação (15, 30 e 45 dias após início da aplicação do tratamento). Para cada tempo de tratamento, foram avaliadas as variáveis: número de folhas, crescimento em altura, comprimento da raiz primária, produção da matéria seca de folhas, caule, e raízes e determinados os teores de clorofila, carotenóides totais, P, Fe, Zn, Cu e Mg. Adicionalmente, foi avaliada a cinética de absorção de Fe após aplicação dos tratamentos anteriormente mencionados. O tratamento das plantas com níveis tóxicos de ferro resultou em decréscimo no comprimento da raiz primária, na matéria seca das três partes da planta e nos teores de pigmentos cloroplastídicos. Além disso, foram observados sintomas visuais típicos de toxidez de Fe. O excesso de Fe, também, causou uma mudança na partição de biomassa da matéria seca, com aumento relativo das folhas em relação às demais partes da planta e reduziu os teores de Zn, Cu e Mn, enquanto o de P permaneceu essencialmente inalterado nas diferentes partes da planta. O tratamento das plantas com níveis tóxicos de Fe alterou o sistema de transporte, aumentando os valores das constantes cinéticas de absorção deste elemento (V_{max} e

K_m), resultando em maior absorção de Fe e, conseqüentemente, gerando os efeitos tóxicos manifestados sobre o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Crescimento, cinética de absorção, teores de nutrientes, toxidez de ferro.

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, envolvido em vários processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (Becana et al., 1998; Briat e Lobréaux, 1997; Schmidt, 2003).

Este elemento é abundante na natureza, chegando a constituir cerca de 5% da crosta terrestre. Apesar disto, a toxidez de ferro normalmente não é um problema para as plantas, pois a maior parte desse nutriente nos solos encontra-se indisponível para as plantas (Guerinot e Yi, 1994). Em solos ácidos e/ou alagados, ou em áreas em que o minério de Fe está sendo extraído ou recebendo beneficiamento o aumento da concentração de Fe pode levar à absorção excessiva deste metal, que rapidamente é acumulado nas folhas e muitas vezes atingindo níveis de toxicidade (Sahrawat, 2004).

Embora sejam numerosos os estudos abordando a absorção e metabolismo de Fe na faixa de concentração encontrada na maioria dos solos sob cultivo, o mesmo não é verdadeiro para condições em que as concentrações deste metal atingiram níveis tóxicos para as plantas (Amils et al., 2007). Plantas submetidas a concentrações tóxicas de Fe, geralmente, apresentam sintomas visuais típicos como o amarelecimento/bronzeamento das folhas, inicialmente nas mais velhas; e com formação/deposição de pigmentos amarronzados que resultam em escurecimento do sistema radicular; há ainda, redução do crescimento e, em casos mais severos, morte da planta (Ponnamperuma, 1972). A toxidez causada por excesso de Fe na solução do solo ou em solução de cultivo hidropônico caracteriza-se pelo acúmulo desse elemento acima dos níveis críticos de toxidez nos tecidos vegetais, especialmente nas folhas (Olaleye et al., 2001; Sahrawat, 2000; Silveira et al., 2007). Nestas condições,

os níveis tóxicos de Fe resultam, quase sempre, em desbalanços nutricionais provocando deficiência de nutrientes essenciais como P, Ca, K, Mg e Zn (Benckiser et al., 1984; Yamuchi, 1989).

Sob níveis elevados de Fe e, ou sob condições redutoras, frequentemente, se forma na superfície radicular a chamada “placa de ferro” em plantas aquáticas e em algumas plantas terrestres sujeitas ao alagamento (Armstrong, 1967; Chen et al., 1980; St-Cyr e Campbell, 1996; Taylor e Crowder, 1983; Ye et al., 1997). A formação destas placas está intimamente relacionada com a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} e a consequente precipitação de óxidos de ferro na superfície radicular (Armstrong, 1964; Liu et al., 2004 a,b; Taylor et al., 1984; Zhang et al., 1999). Embora, se admita que a formação da placa de ferro possa fazer parte de um mecanismo utilizado pelas plantas para tolerar altos níveis de ferro na solução (Ando et al., 1983) o assunto é bastante controverso. Devido à alta capacidade de adsorção dos grupos funcionais dos óxidos e hidróxidos de Fe, a placa de ferro pode atuar como uma barreira à absorção de nutrientes e metais tóxicos pela adsorção e, ou co-precipitação, interferindo na disponibilidade desses elementos na rizosfera e sua subsequente absorção e translocação para a parte aérea (Batty et al., 2000; Greipsson e Crowder, 1992; Otte et al., 1989). Por outro lado, alguns estudos demonstram que a placa de ferro pode atuar como um reservatório de nutrientes, aumentando a absorção dos elementos pelas plantas durante períodos de deficiência no meio de crescimento (Conlin e Crowder, 1989; Ye et al., 2001; Zhang et al., 1999). Os resultados controversos obtidos podem estar relacionados às diferentes espécies vegetais, espécies iônicas e suas concentrações, quantidade de placa de ferro formada nas raízes, pH da solução de cultivo ou da rizosfera, elementos associados ao meio de crescimento e idade das raízes (Liu et al., 2004a; Ye et al., 1997; Zhang et al., 1999).

A espécie *Eugenia uniflora* apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, incluindo regiões que abrigam usinas minero-metalúrgicas, responsáveis pela emissão de poluentes tóxicos, como gases tóxicos e óxidos de Fe. Poucas são as informações na literatura sobre os efeitos de excesso de ferro em espécies vegetais tropicais e o estudo da absorção, acúmulo e efeitos da toxicidade de ferro poderá contribuir para avaliação de sua sobrevivência neste microambiente submetido ao impacto ambiental causado por essas emissões.

Usando o sistema de cultivo hidropônico, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do Fe sobre o crescimento, a produção e partição da matéria seca e sobre a absorção do Fe e outros nutrientes minerais em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, submetidas a níveis tóxicos de Fe.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Myrtaceae) coletadas de uma única matriz, crescida em solo não contaminado com excesso de Fe, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, foram selecionadas quanto ao tamanho e forma e desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 3% durante 15 min. Posteriormente, foram tratadas com solução fungicida à base de Benlate a 0,2% (p/v), lavadas e colocadas para germinar em rolos de papel “germitest”, parcialmente mergulhados em vasos contendo solução de CaCl₂ 0,5 mM, sob aeração contínua e temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

Quarenta e cinco dias após a semeadura, as plantas de *E.uniflora* foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, número de folhas e estado fitossanitário e, então, transferidas para vasos de polietileno, pintados externamente de preto, contendo 1,6 L de solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, suprida com Fe na concentração de 0,045 mM, aplicado na forma de FeEDTA (Hoagland e Arnon, 1938).

Após período de adaptação de sete dias, sob condições da sala de crescimento, as plantas foram submetidas aos diferentes tratamentos. O cultivo das plantas foi realizado em sala de crescimento com temperatura controlada para 25 ± 1 °C, sob irradiância de 230 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. A solução nutritiva foi aerada continuamente e o valor de pH ajustado diariamente para 5,0 pela adição de HCl ou NaOH, sendo renovada a cada sete dias.

2.1. Avaliação do efeito de doses crescentes de ferro sobre o crescimento de *Eugenia uniflora*

As plantas de *Eugenia uniflora*, após período de adaptação de sete dias, conforme descrito anteriormente, foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, aos tratamentos com Fe nas concentrações de 0,045, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mM aplicado na forma de FeEDTA.

Para determinação do incremento nas variáveis de crescimento determinou-se no início, antes da aplicação dos tratamentos, o número de folhas, a altura das plantas e o comprimento da raiz primária e, amostras de plantas foram separadas para determinação da produção de matéria seca inicial das folhas, caules e raízes. Após 45 dias de tratamento, o experimento foi encerrado, as plantas foram colhidas e novamente determinadas as variáveis de crescimento (final). Após estas avaliações, o material vegetal foi secado em estufa convencional, a 70 °C até peso constante e, em seguida, determinada a produção de matéria seca final.

2.2. Efeito da combinação de diferentes concentrações de FeEDTA e tempos de exposição aos tratamentos sobre variáveis de crescimento de Eugenia uniflora

As plantas de *Eugenia uniflora*, após período de adaptação durante sete dias, conforme descrito anteriormente (item 2.1), foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, a três concentrações de FeEDTA (0,045, 1,0 e 2,0 mM), aplicadas durante três períodos de tempo de exposição (15, 30 e 45 dias).

Conforme descrito anteriormente (item 2.1.) as variáveis de crescimento foram avaliadas no início do experimento e após a aplicação dos tratamentos com FeEDTA. Neste caso, entretanto, ao final de cada período experimental, antes da avaliação da produção de matéria seca, as plantas foram colhidas, lavadas em água desmineralizada e divididas em raízes, caules e folhas. As raízes foram, adicionalmente, lavadas em solução de ditionito-citrato-bicarbonato (DCB) (citrato de sódio 0,03 M e bicarbonato de sódio 0,125 M com ditionito de sódio 0,06 M) por 3 h e enxaguadas em água desmineralizada, conforme metodologia descrita por Taylor e Crowder (1983), para remoção da placa de ferro. Após a lavagem, o material vegetal foi colocado para secar em estufa convencional, a 70 °C até peso constante e, em seguida, determinada a produção da matéria seca final.

2.2.1. Determinação dos teores de alguns nutrientes minerais

Amostras de matéria seca das diferentes partes das plantas foram pulverizadas em moinho tipo Wiley, equipado com peneira de malha de 1 mm e digeridas em mistura nitro-perclórica (3:1; v/v). Nos extratos foram determinados os teores de P por espectrofotometria do visível, segundo método de Lindeman (1958) e os teores de Fe, Zn, Cu e Mn por espectrofotometria de absorção atômica.

2.2.2. Determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos

Cinco discos foliares de 5 mm de diâmetro foram retirados de folhas completamente expandidas situadas no terceiro nó e incubados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio. Após 10 horas em banho-maria a 65 °C, as absorvâncias dos extratos foram determinadas nos comprimentos de onda de 480, 649,1 e 665,1 nm e os teores dos pigmentos estimados conforme metodologia descrita por Wellburn (1994) e os resultados expressos em mg g⁻¹ MF.

2.2.3. Determinação da cinética de absorção de ferro por plantas intactas de *Eugenia uniflora*

As plantas de *Eugenia uniflora*, após período de adaptação durante sete dias, conforme descrito anteriormente (item 2.1), foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, a três concentrações de FeEDTA (0,045, 1,0 e 2,0 mM), durante 45 dias. Após esse período, quatro plantas de cada tratamento foram lavadas e transplantadas para vasos de 500 mL contendo soluções nutritivas isentas de FeEDTA, onde permaneceram por 36 horas, sendo renovadas a cada 8 horas. As raízes foram, então, lavadas em água desmineralizada e as plantas transferidas para novos vasos contendo solução nutritiva suplementada com FeEDTA 0,045 mM. A partir daí, alíquotas de 1,8 mL do meio de cultivo foram periodicamente coletadas até o esgotamento do Fe na solução nutritiva, segundo metodologia descrita por Claassen e Barber (1974). A quantidade de Fe nas alíquotas

foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica e as constantes cinéticas foram estimadas por uma aproximação gráfico-matemática conforme sugerido por Ruiz (1985), utilizando-se o software CinéticaWin.

2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância para todas as variáveis. Quando se analisou o efeito de doses crescentes de FeEDTA os resultados foram submetidos a análise de regressão ao nível de 5% de probabilidade. Quando se analisou o efeito de diferentes concentrações de FeEDTA sobre o crescimento das plantas em função do tempo de exposição aos tratamentos e sobre as constantes cinéticas de absorção de Fe as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAEG/UFV.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito de doses crescentes de FeEDTA na solução nutritiva sobre algumas variáveis de crescimento

O Fe aplicado à solução nutritiva não teve qualquer efeito sobre o número de folhas e a altura da parte aérea das plantas em qualquer das concentrações de FeEDTA aplicadas (Figura 1). O comprimento da raiz primária, contudo, decresceu linearmente com o aumento da concentração de FeEDTA na solução nutritiva. Na concentração de 1,0 mM observou-se redução de cerca de 72% nessa variável em relação ao controle (0,045 mM).

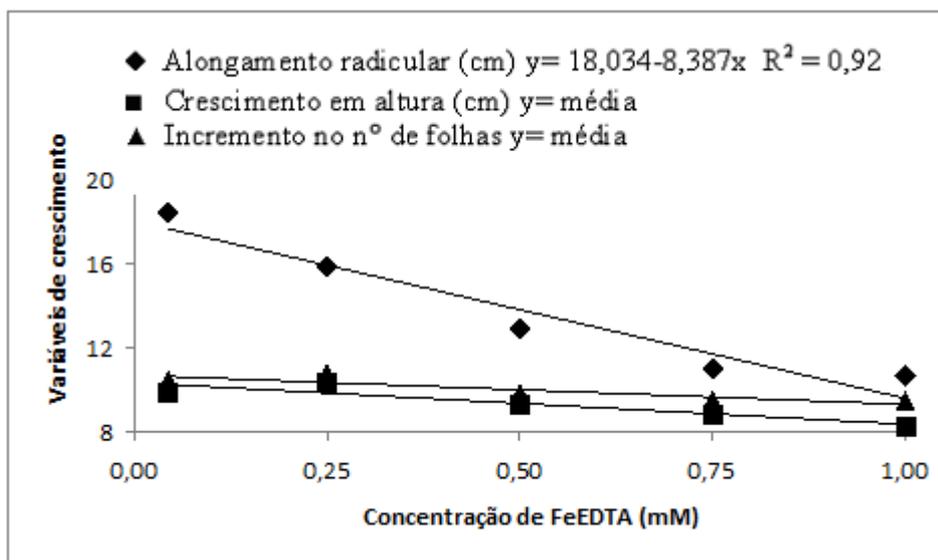


Figura 1 - Efeito da aplicação de doses crescentes de FeEDTA sobre o comprimento da raiz primária, a altura da parte aérea e o número de folhas em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, aos 45 dias após o início da aplicação do tratamento.

De modo semelhante ao observado com o comprimento da raiz primária, as produções de matéria seca de raízes, caules, folhas e matéria seca total reduziram significativamente com o aumento da concentração de Fe na solução (Figura 2). As reduções na produção da matéria seca na concentração de FeEDTA de 1,0 mM, quando comparado à dose controle, foram de 104% nas raízes, 66% no caule, 74% nas folhas e de 78% na produção da matéria seca total. Nas folhas as reduções ocorreram apenas nas concentrações mais elevadas de FeEDTA, enquanto nas demais partes das plantas o decréscimo foi linear com o aumento na concentração de FeEDTA.

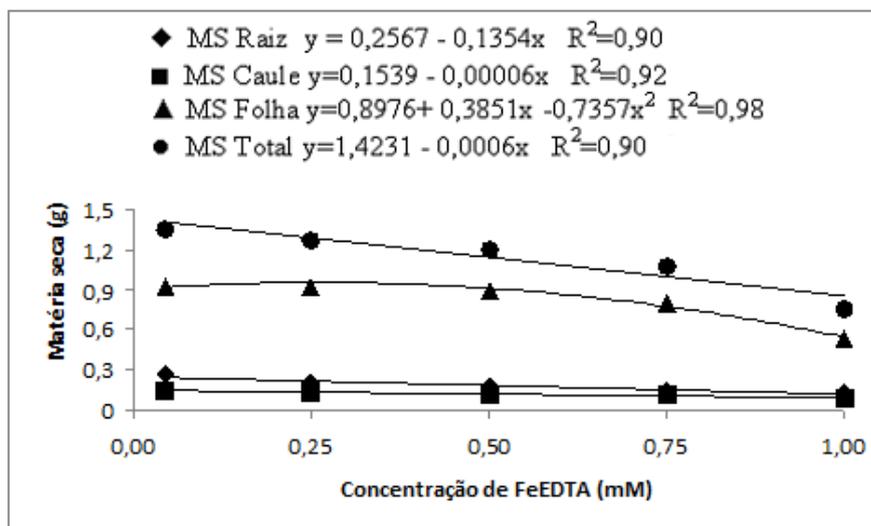


Figura 2 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a produção da matéria seca das raízes, caules, folhas e total em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, aos 45 dias após o início do tratamento.

O teor de Fe nas folhas na concentração mais elevada de FeEDTA, observado em experimentos preliminares, foi igual a $320,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (Jucoski et al., 2009) e, portanto, menor do que o nível crítico de toxicidade deste elemento de 500 mg kg^{-1} (Marschner, 1995). Como este nível crítico de toxicidade é dependente de vários fatores e não é conhecido para *Eugenia uniflora*, os demais experimentos foram realizados com um nível adicional de FeEDTA (2,0 mM).

3.2. Efeito de diferentes concentrações de FeEDTA sobre o crescimento das plantas em função do tempo de exposição aos tratamentos

As plantas de *Eugenia uniflora* submetidas ao excesso de Fe, tanto 1,0 mM quanto 2,0 mM, mostraram sintomas típicos de toxidez causada por esse elemento (Figura 3). Estes sintomas se caracterizaram por redução em tamanho, tanto da parte aérea quanto das raízes, quando as plantas foram tratadas com Fe em concentrações consideradas tóxicas, principalmente em 2,0 mM (Figura 3a e c). Nesta concentração, as folhas apresentaram manchas de cor amarelo/amarronzada, seguido do aparecimento de lesões necróticas, diminuição da área foliar e abscisão foliar (Figura 3b). Nas raízes, além da redução do crescimento do sistema radicular com a

elevação da concentração de Fe na solução nutritiva, observou-se o escurecimento e intensificação do escurecimento com o aumento da concentração do FeEDTA na solução (Figura 3c e d).



Figura 3 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre o crescimento e aspectos morfológicos de plantas jovens de *Eugenia uniflora*, 45 dias após a aplicação dos tratamentos. (a) Crescimento da parte aérea em função de diferentes concentrações de FeEDTA; (b) Sintomas de toxicidez de Fe nas folhas e pontos de abscisão de folhas mais velhas na parte inferior da planta; (c) Aspectos morfológicos do efeito de concentrações crescentes de FeEDTA na parte aérea e raízes; (d) Efeito de concentrações crescentes de FeEDTA sobre o comprimento e a coloração das raízes.

O teor de clorofila *a* diminuiu com o tempo de exposição aos tratamentos e aos 30 e 45 dias após aplicação do tratamento (DAT) foi, adicionalmente, influenciado negativamente pelo excesso de Fe (Figura 4a). As maiores reduções nos teores de clorofila *a* causadas pelas doses tóxicas de Fe, comparativamente ao controle, foram observadas aos 45 DAT, sendo seus valores de 32 e 65% nas doses de 1,0 e 2,0 mM FeEDTA, respectivamente.

O teor de clorofila *b*, por outro lado, não foi afetado pelas doses tóxicas de Fe aplicadas, mas observou-se redução nesses teores nas plantas-controle aos 30 e 45 DAT em relação aos 15 DAT (Figura 4b).

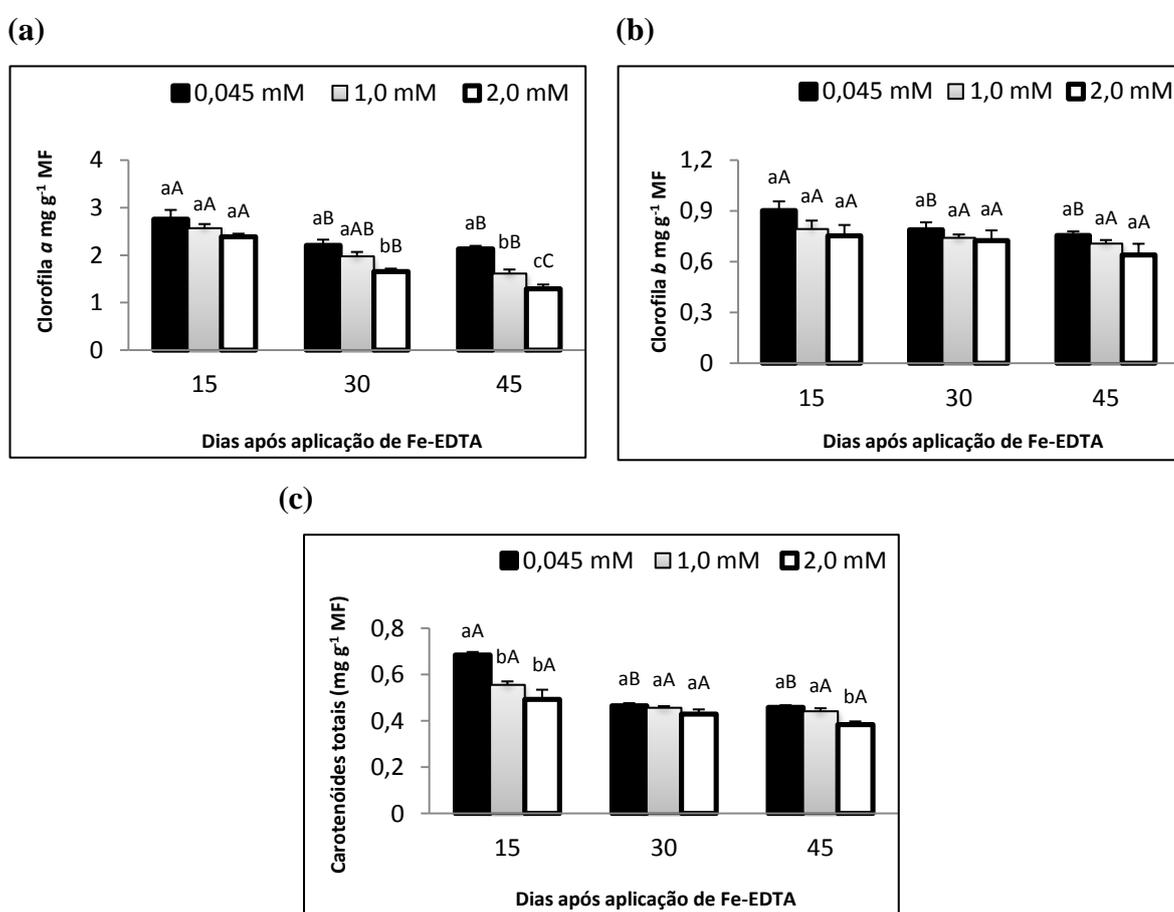


Figura 4 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) e carotenóides totais (c) em folhas de plantas jovens de *Eugenia uniflora*, aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

Os teores dos carotenóides totais reduziram tanto pelo incremento nas concentrações de FeEDTA quanto pelo aumento do tempo de exposição aos tratamentos (Figura 4c). A aplicação de FeEDTA na concentração de 2,0 mM resultou em decréscimos de 39% e de 19% aos 15 e 45 DAT, respectivamente, quando comparado aos seus respectivos controles.

O número de folhas aumentou ao longo do período experimental independente do tratamento (Figura 5a). Aos 15 DAT não foi observado efeito significativo do Fe sobre o número de folhas, mesmo na concentração mais elevada. A partir de 30 DAT reduções significativas nesta variável foram observadas nas doses tóxicas de Fe, reduções estas que se intensificaram com o aumento da dose desse elemento. Aos 45 DAT a redução no número de folhas foi de 31 e 69% nas plantas tratadas com 1,0 e 2,0 mM FeEDTA, respectivamente, em relação ao controle (0,045 mM).

O crescimento em altura da parte aérea e das raízes aumentaram com tempo de exposição aos tratamentos (Figura 5b e 5c). O tratamento com Fe causou redução significativa no crescimento das raízes já aos 15 DAT, mas apenas aos 30 DAT no crescimento da parte aérea, respectivamente. Os decréscimos no crescimento em altura da parte aérea nas plantas submetidas à dose de FeEDTA 2,0 mM de Fe, em relação às plantas-controle, foram de 61 e 72% aos 30 e 45 DAT, respectivamente. Nas raízes, sob as mesmas condições, as reduções em relação às plantas-controle foram de 62, 119 e 113% aos 15, 30 e 45 DAT, respectivamente.

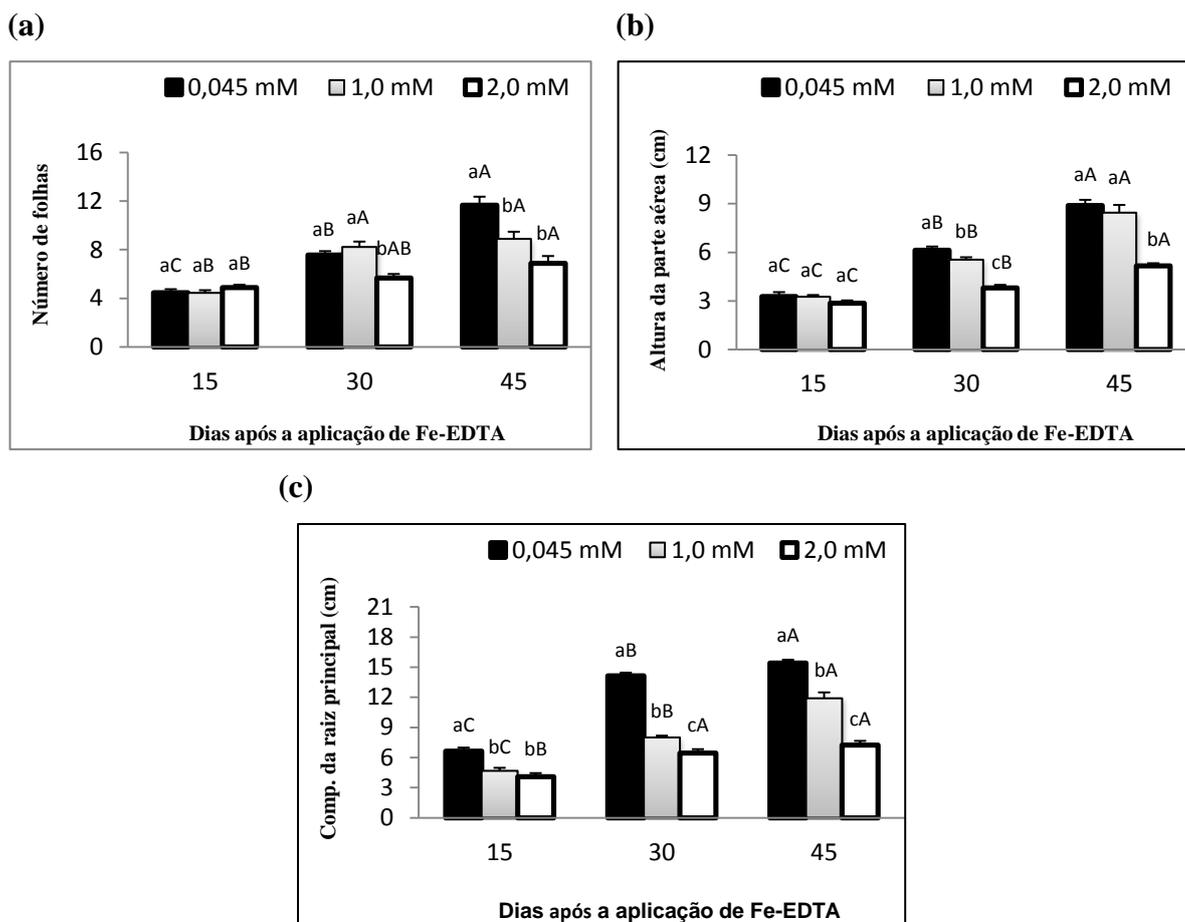


Figura 5 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre número de folhas (a), altura da parte aérea (b) e comprimento da raiz primária (c) em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

A produção da matéria seca total ou das partes da planta foi afetada de modo similar pelo tempo e pelo tratamento com FeEDTA (Figura 6). Em todos os casos a produção de matéria seca aumentou com o tempo de tratamento, mesmo na presença de níveis tóxicos desse elemento. Aos 15 DAT a produção de matéria seca das diferentes partes das plantas não foi influenciada pelos diferentes níveis de Fe. Com o prolongamento do tempo de tratamento, observaram-se reduções significativas não apenas na matéria seca total, mas também nas das diferentes partes avaliadas. O incremento na concentração de FeEDTA na solução de cultivo de 1,0 mM para 2,0 mM não resultou em redução adicional significativa na produção de matéria seca

total ou das partes. As reduções na matéria seca de folhas, caule, raízes e total aos 45 DAT foram, respectivamente, de 149, 127, 100 e 139% em relação ao controle na concentração de 2,0 mM de Fe.

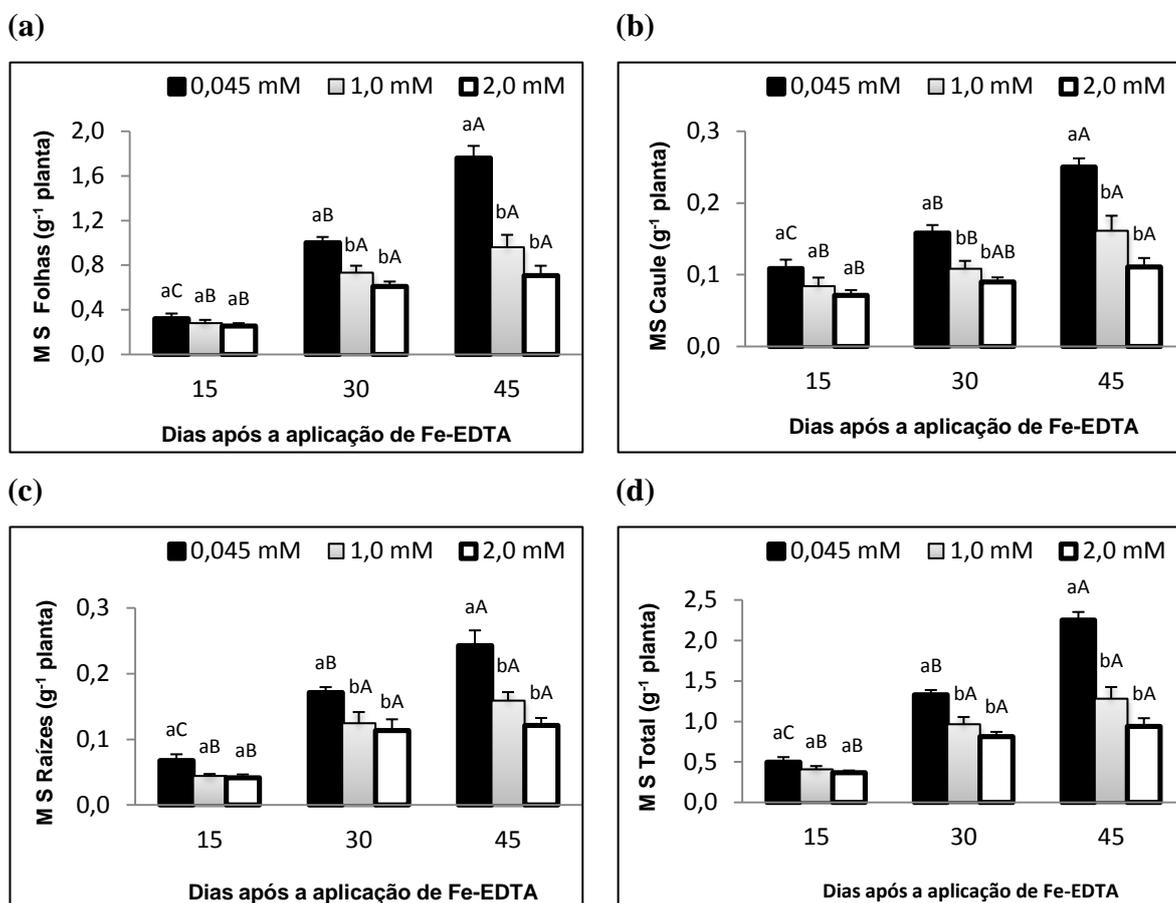


Figura 6 - Efeito da aplicação de Fe-EDTA na produção da matéria seca das folhas (a), do caule (b), das raízes (c) e total (d) em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, aos 15, 30 e 45 dias após o início do tratamento.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

A partição da biomassa entre as diferentes partes das plantas modificou-se com o tempo de exposição e com as doses de FeEDTA aplicadas (Figura 7). A biomassa das folhas foi sempre maior do que das outras partes. No início do experimento, as folhas constituíam cerca de 56% da biomassa total; aos 15 DAT ela passou a constituir, em média, cerca de 64% e aos 45 DAT chegou a 74%. Aos 15 DAT a contribuição da biomassa foliar ao total aumentou com a aplicação de doses

tóxicas de FeEDTA em relação ao controle, mas à medida que se prolongou o tempo de tratamento, sua contribuição relativa às demais partes diminuiu. Nos caules e raízes a contribuição da biomassa destas partes à biomassa total diminuiu com o tempo de tratamento. As suas contribuições iniciais que eram cerca de 19,3% e de 24,3%, em média, reduziram para 12,6 e 13,4% em caules e raízes aos 45 DAT, respectivamente.

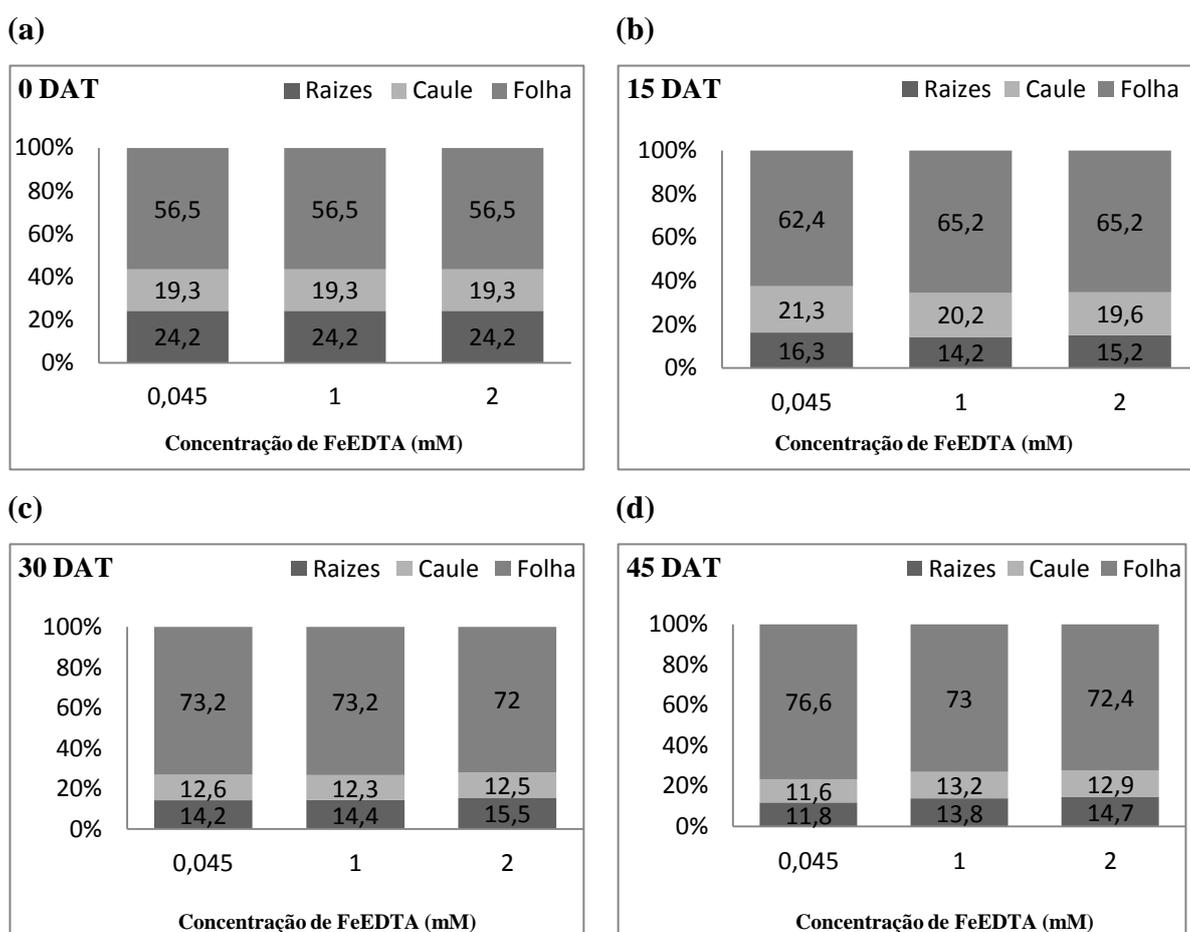


Figura 7 - Efeito da aplicação de FeEDTA na partição da biomassa aos 0 (a), 15 DAT (b), 30 DAT (c) e 45 DAT (d) em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, após o início do tratamento.

3.3. Efeito do ferro sobre os teores de alguns minerais em plantas jovens de Eugenia uniflora.

Os teores de fósforo foram semelhantes nas três partes analisadas (Tabela 1). Dentro de cada época de avaliação, de maneira geral, os teores deste elemento foram reduzidos significativamente com o tratamento com níveis tóxicos de Fe em todas as partes da planta. Contudo, o aumento do tempo de tratamento levou ao aumento da concentração de P aos 45 DAT em caule e raízes. A maior redução nos teores deste elemento foi observada nas raízes submetidas ao FeEDTA 2,0 mM aos 45 DAT.

Os teores de Fe nas folhas, caule e raízes aumentaram com o aumento da concentração de Fe e com o tempo de exposição aos tratamentos (Tabela 1). Aos 45 DAT, na concentração de FeEDTA 2,0 mM, foram encontrados os maiores teores deste elemento nas raízes ($1.316,7 \text{ mg kg}^{-1}$), folhas ($229,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e caules ($103,8 \text{ mg kg}^{-1}$), respectivamente, valores estes que foram, em média, 2,4 vezes maiores do que nas plantas-controle (FeEDTA 0,045 mM e 45 DAT).

Os teores de zinco, cobre e manganês, aumentaram com o tempo de tratamento, mas decresceram com o aumento dos níveis de FeEDTA na solução nutritiva e, de modo geral, a redução se intensificou com o aumento da concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM (Figura 1). As maiores reduções, de modo geral, foram observadas nas raízes. Nesta parte da planta, no nível mais elevado de FeEDTA aos 45 DAT foram constatadas reduções de 47, 87 e 60% nos teores de zinco, cobre e manganês, respectivamente.

Tabela 1 - Teores de alguns minerais em folhas, caule e raízes de plantas jovens de *Eugenia uniflora* submetidas a diferentes concentrações de FeEDTA (0,045, 1,0 e 2,0 mM) em diferentes tempos de exposição aos tratamentos (15, 30 e 45 DAT).

Nutrientes	DAT	FOLHAS			CAULE			RAÍZES		
		Concentração de FeEDTA (mM)								
		0,045	1,0	2,0	0,045	1,0	2,0	0,045	1,0	2,0
Fósforo (g kg ⁻¹ MS)	15	7,3±0,31 aA	6,6±0,19 bA	6,1±0,31 bA	6,9±0,51 aB	6,1±0,24 aB	5,2±0,15 bB	6,1±0,36 aB	5,3±0,22 bB	4,9±0,15 bB
	30	7,4±0,37 aA	6,8±0,29 aA	6,7±0,16 aA	7,3±0,13 aB	6,2±0,16 bB	6,0±0,20 bA	6,2±0,39 aB	6,0±0,16 aAB	5,7±0,28 aA
	45	8,0±0,38 aA	7,0±0,44 bA	6,7±0,23 bA	8,9±0,37 aA	7,1±0,28 bA	6,2±0,32 bA	8,1±0,31 aA	6,9±0,47 bA	6,1±0,22 bA
Ferro (mg kg ⁻¹ MS)	15	85,2±1,68 cC	113,2±1,69 bB	174,0±4,30 aB	22,0±0,52 cB	49,4±1,68 bC	66,4±0,55 aC	307,0±0,46 cC	632,3±1,17 bB	856,0±1,84 aC
	30	71,0±3,44 cB	120,8±3,91 bB	180,1±3,87 aB	26,9±2,54 cB	54,4±0,47 bB	77,1±1,60 aB	482,7±1,69 cB	673,7±1,28 bB	966,7±2,38 aB
	45	93,4±1,21 cA	153,4±1,94 bA	229,5±2,78 aA	40,3±2,12 cA	59,7±1,42 bA	103,8±2,98 aA	578,3±1,62 cA	782,3±1,83 bA	1316,7±3,14 aA
Zinco (mg kg ⁻¹ MS)	15	21,1±0,80 aB	19,6±0,58 aB	15,8±0,31 bB	12,4±0,35 aB	8,3±0,20 bC	7,1±0,22 cC	22,4±0,33 aB	20,5±0,44 bA	14,3±0,58 cC
	30	25,0±0,41 aA	22,7±0,23 bA	19,8±0,34 bA	18,6±0,71 aA	13,7±0,35 bA	9,1±0,43 cB	23,6±0,41 aB	20,1±0,31 bA	16,0±0,44 cB
	45	26,0±0,30 aA	21,0±0,86 bA	19,9±0,17 bA	19,5±0,38 aA	12,1±0,12 bA	11,2±0,37 cA	26,5±0,35 aA	20,5±0,44 bA	14,3±0,58 cC
Cobre (mg kg ⁻¹ MS)	15	9,3±0,15 aC	7,8±0,33 bB	7,8±0,28 bA	5,5±0,27 aC	4,5±0,13 bC	3,5±0,26 cB	21,3±0,71 aC	9,3±0,33 bC	6,7±0,12 cB
	30	12,2±0,30 aB	9,0±0,17 bA	8,5±0,64 bA	6,3±0,19 aB	5,5±0,15 bB	4,0±0,10 cB	30,6±0,58 aB	12,9±0,35 bB	8,5±0,19 cA
	45	13,7±0,44 aA	9,5±0,40 bA	8,7±0,26 bA	8,2±0,13 aA	6,8±0,32 bA	4,9±0,23 cA	57,1±0,19 aA	16,6±0,47 bA	7,5±0,43 cB
Manganês (mg kg ⁻¹ MS)	15	97,3±2,23 aB	72,5±0,80 bB	58,3±0,92 cC	43,4±0,23 aC	36,1±0,26 bC	28,5±0,46 cB	60,6±0,56 aC	39,9±0,66 bB	23,3±0,32 cB
	30	122,3±3,36 aA	92,6±3,06 bA	80,1±2,13 cB	46,2±0,61 aB	38,3±0,12 bB	30,3±0,54 cB	66,7±0,67 aB	48,5±1,73 bA	34,7±0,50 cA
	45	119,9±1,06 aA	97,9±3,19 bA	100,5±2,72 bA	53,5±0,52 aA	41,0±0,67 bA	32,5±0,86 cA	83,7±0,34 aA	47,7±0,42 bA	33,2±0,49 cA

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan (P<0,05). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de Fe-EDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento.

3.4. Cinética de absorção de ferro.

As constantes cinéticas da absorção de Fe por plantas intactas de *Eugenia uniflora*, avaliadas pelo esgotamento de uma solução de absorção de FeEDTA 0,045 mM, após tratamento durante 45 dias com diferentes doses de FeEDTA, aumentaram nas plantas tratadas com FeEDTA 1,0 e 2,0 mM em relação às plantas-controle (tratadas com FeEDTA 0,045 mM) (Tabela 2). O aumento na concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM não intensificou os efeitos do Fe sobre as duas constantes cinéticas. Os aumentos em relação à concentração de FeEDTA 0,045 mM foram de cerca de 28% no V_{\max} e de 13% no K_m .

Tabela 2 - Efeito de concentrações crescentes de Fe sobre as constantes cinéticas de absorção de Fe por plantas jovens de *Eugenia uniflora* tratadas com FeEDTA nas concentrações de 0,045, 1,0 e 2,0 mM, durante 45 dias.

FeEDTA (mM)	V_{\max} ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
0,045	2,62 \pm 0,23 b	23,49 \pm 0,53 b
1,0	3,32 \pm 0,22 a	25,64 \pm 0,51 a
2,0	3,41 \pm 0,14 a	27,13 \pm 0,57 a

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de Fe-EDTA aos 45 DAT. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

As constantes cinéticas obtidas (Tabela 2) foram utilizadas para estimar isotermas de absorção de Fe, na faixa de concentração de 0 a 100 μM , das plantas de *Eugenia uniflora* tratadas com FeEDTA 0,045, 1,0 e 2,0 mM, durante 45 dias (Figura 8). As velocidades de absorção de Fe, com base nas isotermas de absorção, obtidas após tratamento das plantas com FeEDTA 1,0 e 2,0 mM, foram significativamente mais elevadas que naquelas que foram tratadas com FeEDTA 0,045 mM.

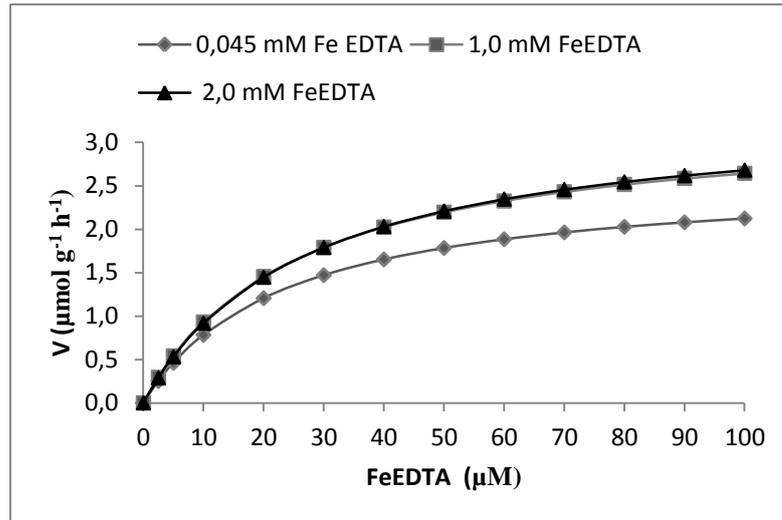


Figura 8 - Velocidade de absorção de Fe (v) por plantas jovens de *Eugenia uniflora* tratadas com FeEDTA nas concentrações de 0,045, 1,0 e 2,0 mM, durante 45 dias.

4. DISCUSSÃO

O ferro, embora, abundante na natureza, normalmente não atinge níveis tóxicos para a maioria das plantas, pois a maior parte desse nutriente nos solos encontra-se indisponível para elas, especialmente em solos neutros e, ou alcalinos (Guerinot e Yi, 1994). Em solos ácidos e, ou alagados, ou em áreas de mineração ou de industrialização de minérios pode ocorrer aumento da concentração de Fe disponível, resultando em absorção excessiva deste metal, muitas vezes atingindo níveis de toxicidade (Sahrawat, 2004).

Os efeitos negativos do excesso de Fe no crescimento das plantas, em termos de comprimento das raízes e altura da parte aérea ou de produção de matéria seca em todas as partes de plantas de *Eugenia uniflora*, foram significativos a partir da concentração de Fe de apenas 0,25 mM. Estes efeitos se acentuaram com o aumento das concentrações de FeEDTA (Figuras 1 e 2). Além dos efeitos do Fe sobre o crescimento e a produção de matéria seca foram observados sintomas típicos de toxidez em concentrações de Fe superiores a 1,0 mM, tanto nas raízes como nas folhas (Figura 3). Nas folhas foi observado o aparecimento de manchas de cor amarelo/amarronzada, seguido do aparecimento de lesões necróticas, diminuição da

área foliar e abscisão foliar resultado, provavelmente, da formação de agentes oxidantes nos espaços intercelulares que reagem com os componentes da parede celular e das membranas plasmáticas conforme sugere Pell et al. (1994). Resultados similares foram observados em folhas de *Ipomoea pés-caprae* (Carli, 2008), *Nicotiana plumbaginifoli* (Kampfenkel et al., 1995), *Clusia hilariana* e *Canavalia rósea* (Silva, 2009), *Solanum tuberosum* (Chattejee et al., 2006), ervilha (Suh et al., 2002) e *Eugenia uniflora* (Neves et al., 2009).

As raízes tornaram-se escurecidas (Figura 1), indicativo da deposição de óxido de Fe, conforme sugere Silva (2009). Além disso, foi observada menor formação de raízes ativas e as raízes tornaram-se curtas, finas, rígidas e quebradiças. Resultados semelhantes foram observados por Howeler, 1973; Liu et al., 2008 e Silva, 2009.

A clorose visível observada em algumas folhas foi comprovada pelo decréscimo no teor de clorofila *a* (Figura 4). A redução de pigmentos cloroplastídicos tem sido associada a danos oxidativos causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido por níveis tóxicos de Fe nos tecidos foliares (Becana et al., 1998; Sinhá et al., 1997; Vansuyt et al., 1997). Resultados similares foram encontrados em diferentes espécies expostas a níveis tóxicos de Fe (Carli, 2008; Chattejee et al., 2006; Gallego et al., 1996; Kuki et al., 2008; Silva, 2009).

O tratamento das plantas com concentrações tóxicas de Fe causou, também, decréscimo significativo no número de folhas (Figura 5a) resultado de abscisão foliar, uma vez que folhas novas continuaram a ser formadas na parte superior da planta (Figura 1). A altura da planta e o crescimento da raiz primária também foram negativamente afetados pelo acréscimo da concentração de Fe e com o tempo de tratamento (Figura 5b e c). Outros estudos têm demonstrado o efeito negativo do estresse por Fe no crescimento. Neves (2004), por exemplo, observou que plantas de *E. uniflora* expostas a elevadas concentrações de citrato férrico (300 μ M) e sob condições de chuva ácida apresentaram decréscimo significativo no número de ramos e de folhas, no comprimento do caule e das raízes e no volume radicular, quando comparado com as plantas controle. Pereira e colaboradores (2009) verificaram decréscimo na altura e no número de folhas de plantas de *Clusia hilariana* quando estas foram submetidas a aplicação de material sólido particulado

de Fe (MSPFe) nas folhas; porém, não observaram diferença nesses parâmetros quando o MSPFe foi aplicado diretamente ao solo.

A produção da matéria seca nas plantas jovens de *Eugenia uniflora* foi fortemente afetada pelos tratamentos com Fe (Figura 6). Após 45 dias de tratamento com FeEDTA observou-se uma redução de 139% na produção de matéria seca total, em relação ao controle. De modo semelhante Nguyen e colaboradores (2005), testando o efeito combinado de ferro e alumínio, em *Eucalyptus camaldulensis*, observaram decréscimo na produção de matéria seca de folhas, caule e raízes à medida que aumentaram a concentração de Fe na solução nutritiva. Diminuição na produção de biomassa também foi observada por Chatteree et al. (2006). Eles verificaram que, após 110 dias de exposição a 2,0 mM Fe, as plantas de *Solanum tuberosum* apresentaram queda de 70% na produção da matéria seca quando comparadas ao controle (Fe 0,1 mM). A diminuição na produção de biomassa em diferentes espécies expostas a doses tóxicas de Fe pode estar relacionada a distúrbios nos metabolismos de nitrogênio e de carboidratos, resultando na redução na quantidade de proteínas (Marschner, 1995). O efeito, entretanto, pode ser bem mais complexo do que sugere este autor, modificando o metabolismo oxidativo e estabelecendo uma condição de estresse. O estudo da partição de biomassa, também, demonstrou que a produção de caule e, principalmente, de raízes foi bastante prejudicada com o passar do tempo de exposição ao ferro uma vez que as plantas alocaram maior biomassa para as folhas e menos para aquelas duas partes da plantas (Figura 7).

Os teores de Fe nas raízes foram excepcionalmente elevados, chegando a mais de 1.300 mg g⁻¹ de matéria seca na concentração mais elevada de Fe. Apesar de o experimento ter sido realizado em sistema hidropônico, teve-se o cuidado de se fazer uma lavagem especial destas raízes com solução DCB visando a solubilização de uma possível precipitação do Fe na superfície e em espaços apoplásticos das raízes (Taylor et al, 1984) (Tabela 1). Nas folhas, o teor mais elevado encontrado foi aos 45 DAT na maior concentração de FeEDTA. O valor encontrado (229,5 mg kg⁻¹), entretanto, foi muito menor do que o nível crítico de toxicidade de ferro (300 a 500 mg kg⁻¹ MS) sugerido por Marschner et al. (1995). Neves et al. (2009), trabalhando com a mesma espécie utilizada no presente experimento, encontraram, nas folhas de plantas tratadas com FeEDTA 5,0 mM, teores acima do nível crítico de

toxicidade do Fe. As plantas utilizadas por estes autores eram mais velhas, a dose de Fe aplicada foi 2,5 vezes mais elevada e o pH e tempo de tratamento foram diferentes. Os resultados, portanto, indicam que o nível crítico de toxicidade varia de espécie para espécie e pode ser atingido por uma combinação de fatores do meio. Deve se ressaltar, ainda, que não existe na literatura nenhum trabalho definindo o nível crítico de toxicidade de ferro especificamente para *Eugenia uniflora*. Neste experimento, portanto, pode não ter sido atingido o nível de toxicidade de ferro, mas foram observados efeitos tóxicos do Fe bastante intensos sobre várias variáveis. A relativa baixa capacidade de translocação do Fe das raízes para a parte aérea (cerca de 14%) tem sido sugerido como mecanismo de defesa ao estresse causado por toxidez por Fe (Stein et al., 2008). Carli (2008), trabalhando com plantas de *Ipomea pes-caprae*, encontrou teores de Fe nas raízes excepcionalmente elevados em relação aos teores encontrados nas folhas, sugerindo ter havido limitação na translocação para as folhas. Carli (2008), entretanto, apenas lavou as raízes com água desionizada e solução de EDTA 50 mM o que pode não ter sido eficiente na remoção da placa de óxido de ferro comumente formada em torno das raízes. No presente estudo, foi tomado cuidado especial para eliminação da placa de Fe, mas mesmo assim, a relação entre o teor de Fe nas raízes/teor de Fe nas folhas (5,7) foi alta indicando forte retenção do Fe no sistema radicular.

O decréscimo na produção de matéria seca das raízes parece estar relacionado com deficiência de certos nutrientes induzida pela acumulação excessiva de Fe. De maneira geral, o excesso de Fe induz deficiência de P, K, Ca, Mg e Zn provocando desordens nutricionais múltiplas (Benckiser et al., 1984; Howeler, 1973). Este trabalho confirma os resultados desses autores e acrescenta dois minerais à lista de interferência do excesso de Fe que são o Cu e Mn. Apesar disto, embora o excesso de Fe tenha resultado em redução na concentração de Zn, Cu e Mg, considerando os níveis críticos de deficiência sugeridos por Furlani (2004): zinco (abaixo de 25 mg kg⁻¹), cobre (5 a 20 mg kg⁻¹) e manganês (20 a 500 mg kg⁻¹), verifica-se que apenas o zinco não atingiu níveis de suficiência nas folhas de *Eugenia uniflora*. Esta interferência do excesso de Fe pode estar associada à precipitação de óxidos de ferro na superfície radicular e a conseqüente formação de uma crosta de óxido férrico (placa de ferro). A capacidade das plantas de formar estas placas de ferro na superfície radicular é considerada parte do mecanismo utilizado pelas plantas para

tolerar altos níveis de Fe^{2+} (Becker e Asch, 2005). A formação da placa de ferro, entretanto, pode levar ao desbalanço nutricional devido à alta capacidade dos grupos funcionais dos hidróxidos de ferro em imobilizar nutrientes e metais por adsorção e/ou co-precipitação (Howeler, 1973) inibindo a absorção, transporte e/ou utilização de outros nutrientes como P, K e Zn (Fageria et al., 1990; Howeler, 1973). Resultados semelhantes aos aqui obtidos foram relatados para o P, Mn e Zn em arroz (Greipson, 1995; Silveira et al., 2007) e Mn, Zn e Cu em *Phragmita australis* (St-Cyr e Campbell, 1996; St-Cyr e Crowder, 1990).

A absorção de nutrientes pelas plantas pode ser descrita por parâmetros cinéticos intrínsecos à planta, tais como: V_{\max} , K_m e C_{\min} . As plantas desenvolveram um mecanismo de controle das concentrações dos solutos internos, de modo que as células podem ajustar a absorção de determinado nutriente em função de sua demanda, principalmente, modificando suas constantes cinéticas de absorção. Assim, a determinação dos valores de K_m e V_{\max} é importante para se entender em que nível molecular a célula está modulando este mecanismo regulatório (Taiz e Zeiger, 2009). Segundo Wang et al. (1993), sistemas de transporte de alta e de baixa afinidade possuem distintos valores de K_m . Como o K_m representa a concentração de substrato na qual o processo de transporte atinge a metade da velocidade máxima, a afinidade pelo substrato é o parâmetro mais relevante na descrição dos sistemas de transporte iônico envolvendo o processo de absorção de nutrientes pelas plantas (Wirén et al., 2000). Quanto menor for o K_m , maior é a afinidade do carregador pelo íon, pois esta constante cinética reflete a concentração que resulta na metade da velocidade máxima de absorção (Rosa et al., 2009). O V_{\max} , por outro lado, reflete o número de transportadores por superfície e, portanto, quanto maior o seu valor maior a velocidade de absorção em concentrações elevadas do nutriente na solução (Anghinoni et al., 1989). No presente estudo, verificou-se aumento no valor de K_m de 23,49 para 27,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$, após tratamentos com FeEDTA 2,0 mM, isto é, houve perda na afinidade do sistema de transporte pelo íon Fe^{3+} (Tabela 2). O resultado indica que o Fe em níveis tóxicos deve ter alterado a configuração do transportador alterando desfavoravelmente o sítio de ligação deste elemento. Embora, não tenha sido observado efeito estatisticamente significativo do aumento da concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM para o tempo de tratamento estudado, observou-se tendência de intensificação do efeito do Fe com o prolongamento do tempo de exposição e, ou

aumento da concentração de Fe. Com relação ao V_{\max} observou-se, também, aumento nesta constante cinética com a exposição das plantas aos níveis mais elevados de Fe. Como esta constante representa o número de transportadores que intermedia a absorção de Fe através da membrana é possível ter ocorrido indução à síntese de novas moléculas de transportadores ou a ativação da redutase do NADPH que catalisa a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} . A combinação dos efeitos do tratamento com concentrações tóxicas resultou em maior capacidade de absorção de Fe resultando nos efeitos prejudiciais manifestados sobre o crescimento das plantas relatados neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho permitem concluir que:

- 1) O crescimento de plantas jovens de *Eugenia uniflora* é fortemente reduzido por níveis elevados de Fe no meio nutritivo.
- 2) O Fe nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM é tóxico para *Eugenia uniflora*, com o aparecimento de sintomas visuais típicos.
- 3) O tratamento com Fe em níveis elevados aumenta absorção deste elemento causando redução nos teores de P, Zn, Mn e Cu.
- 4) As variáveis de crescimento avaliadas, principalmente comprimento da raiz primária e produção de matéria seca, são bons indicadores da toxidez de Fe em *Eugenia uniflora*.
- 5) O sistema de absorção de Fe foi afetado por níveis tóxicos de Fe, resultando em maior absorção deste elemento pelas raízes intactas de *Eugenia uniflora*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMILS, R.; De La FUENTE, V.; RODRÍGUEZ, N.; ZULUAGA, J.; MENÉNDEZ, N.; TORNERO, J. Composition, speciation and distribution of iron minerals in *Imperata cylindrica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 335-340, 2007.

ANDO, T.; YOSHIDA, S.; NISHIYAMA, I. Nature of oxidizing power of rice roots. **Plant and Soil**, 72: 57-71, 1983.

ANGHINONI, I.; VOLKART, C.R.; FATTORES, M.; ERNANI, P.R. Morfologia de raízes e cinética de absorção de nutrientes em diversas espécies e cultivares de plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 13: 335-361, 1989.

ARMSTRONG, W. Oxygen diffusion from the roots of some British bog plants. **Nature**, 204: 801-802, 1964.

ARMSTRONG, W. The oxidizing activity of roots in waterlogged soils. **Physiologia Plantarum**, 20: 540-543, 1967.

BATTY, L.C.; BAKER, A.J.M.; WHEELER, B.D.; CURTIS, C.D. The effect of pH and plaque of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. **Annals of Botany**, 86: 647-653, 2000.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ORMAETXE, I. I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, 201: 137-147, 1998.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice – conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, 168: 558-573, 2005.

BENCKISER, G.; SANTIAGO, S.; NEUE, H.U.; WATANABE, I.; OTTOW, J.C.G. Effect of iron fertilization on exudation activity, iron-reducing populations and Fe⁺⁺ formation in the rhizosphere rice (*Oryza sativa* L.) in relation to iron toxicity. **Plant and Soil**, 79: 305-316, 1984.

BRIAT, J.F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, 2: 187-193, 1997.

CARLI, V.G. **Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de *Ipomoea pes-caprae* cultivadas em diferentes concentrações de ferro**. Viçosa, MG:UFV, 2008. 46 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.

CHATTERJEE C.; GOPAL. R., DUBE, B.K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, 108:1-6, 2006.

CHEN, C.C.; DIXON, J.B.; TURNER, F.T. Iron coatings on roots: morphology and models of development. **Soil Science Society of America Journal**, 44: 1113-1119, 1980.

CLAASSEN, N.; BARBER, S.A. A Method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, 54: 564-568, 1974.

CONLIN, T.S.S.; CROWDER, A.A. Location of radial oxygen loss and zones of potential iron uptake in a grass and two non-grass emergent species. **Canadian Journal of Botany**, 67: 717-722, 1989.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. Iron nutrition of plants: an overview on the chemistry and physiology of its deficiency and toxicity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 25: 553-570, 1990.

FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal in excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, 121: 151-159, 1996.

GREIPSSON, S; CROWDER, A.A. Amelioration of cooper and nickel toxicity by iron plaque on roots of rice. **Canadian Journal of Botany**, 70: 824-830, 1992.

GREIPSSON, S. Effect of iron plaque on roots of rice on growth of plants in excess zinc and accumulation of phosphorus in plant in excess copper or nickel. **Journal of Plant Nutrition**, 18: 1659-1665, 1995.

GUERINOT, M.L.; YI, Y. Iron nutritious, noxious and not readily available. **Plant Physiology**, 104: 815-820, 1994.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The method for growing plants without soil: water-culture. Berkeley: Univ. of California, 32p. **Circular of the Agricultural Experimentation Station**, 347. 1938.

HOWELLER, R.H. Iron-induced orangng disease of rice in relation to physical-chemical changes in a flooded oxisol. **Soil Science Society of America Proceedings**, 37: 898-903, 1973.

JUCOSKI, G.O.; CAMBRAIA, J.; FONSECA-JÚNIOR, E.M.; SOUZA, L.T.; CARDOSO, F.B.; RIBEIRO, C.; PAULA, S.O.; OLIVA, M.A. **Efeito de doses crescentes de ferro sobre o crescimento de *Eugenia Uniflora* L. em solução nutritiva.** Resumo CBFV, Fortaleza, Ceará, 2009.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbagnifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. **Plant Physiology**, 107: 725-735, 1995.

KOCHIAN, L. E. Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants.** Maryland: American Society of Plant Physiologists, p. 1204-1247, 2000.

KUKI, K.N.; OLIVA, M.A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of the Total Environment**, 403: 207-214, 2008.

LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in Chlorella at the transition from dark to light. **United Nations International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy**, 2: 8-15, 1958.

LIU, W.J.; ZHU, Y.G.; SMITH, F.A.; SMITH, S.E. Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? **New Phytologist**, 162: 481-488, 2004a.

LIU, W.J.; ZHU, Y.G.; SMITH, F.A.; SMITH, S.E. Do iron plaque and genotypes affect arsenate uptake and translocation by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture? **Journal of Experimental Botany**, 55: 1707-1713, 2004b.

LIU, H.; ZHANG, J.; CHRISTIE, P.; ZHANG, F. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. **Science of the Total Environment**, 394: 361-368, 2008.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2 ed. London. Ed. Academic Press, 1995. 890p.

NEVES, N. R. **Respostas fisiológicas e antioxidativas em plantas de *Eugenia uniflora* L. submetidas ao excesso de ferro e chuva ácida.** Viçosa, MG:UFV, 2004. 37 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

NEVES, N. R.; OLIVA, M.A.; CENTENO, D.C.; COSTA, A.C.; RIBAS, R.F.; PEREIRA, E.G. Photosynthesis and oxidative stress in the resting plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, 407: 3740-3745, 2009.

NGUYEN, N. T.; HIEP, N. D.; FUJITA, K. Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant and Soil**, 277: 139-152, 2005.

OLALEYE, A.O.; TABI, F.O.; OGUNKULE, A.O. SINGH, B.N. SAHRAWAT, K.L. Effect of toxic iron concentration on the growth of lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, 24: 441-457, 2001.

OTTE, M.L.; ROZENA, J.; KOSTER, L.; HAARSMA, M.S. Iron plaque on roots of *Aster tripolium* L., interaction with zinc uptake. **New Phytologist**, 111: 309-317, 1989.

PELL, E.J.; ECKART, N.A.; GLICK, R.E.. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthesis potential. **Photosynthesis Research**, 39: 453-462, 1994.

PEREIRA, E.G; OLIVA, M.A.; KUKI, K.N., CAMBRAIA, J. Photosynthetic changes caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees**, 23: 277-285, 2009.

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, 24: 29-76, 1972.

ROSA, C.M.; CASTILHOS, R.M.V. VAHL, L.C.; CASTILHOS, D.D.; PINTO, L.F.S.; OLIVEIRA, E.S.; LEAL, O.A. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33: 959-967, 2009.

RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos Km e Vmax por uma aproximação gráfico-matemático. **Revista Ceres**, 32: 79-84, 1985.

SAHRAWAT, K.L. Elemental composition of rice plants as affected by iron toxicity under field conditions. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, 31: 2819-2827, 2000.

SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**, 27: 1471-1504, 2004.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **Trends in Plant Science**, 8: 188-193, 2003.

SILVA, A.I.S. **Morfoanatomia e composição mineral de raízes de duas espécies de restinga submetidas ao excesso de ferro**. Viçosa, MG:UFV, 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SILVEIRA, V.C.; OLIVEIRA, A.P.; SPRELOTTO, R.A.; ESPINDOLA, L.S.; AMARAL, L.; DIAS, J.F.; CUNHA, J.B.; FETT, J.P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 12: 127-139, 2007.

SINHÁ, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 38: 286-291, 1997.

ST-CYR, L.; CAMPBELL, P.G.C. Metals (Fe, Mn, Zn) in the root plaque of submerged aquatic plants collected *in situ*: Relations with metal concentrations in the adjacent sediments and in the root tissue. **Biogeochemistry**, 33: 45-76, 1996.

ST-CYR, L.; CROWER, A.A. Mn e Cu in the root plaque of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steudel. **Soil Science**, 1990.

STEIN, R.R.J.; DUARTE, G.L.; SPOHR, M.G.; LOPES, S.I.G.; FETT, J.P. Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**. 154: 269-277, 2008.

SUH, H.; KIM, C.S.; LEE, J.; JUNG, J. Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology**, 75: 513-518, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 4 ed. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2009. 848p.

TAYLOR, G.T.; CROWDER, A.A. Uptake and accumulation of copper, nickel and iron by *Thypha latifolia* grown in solution culture. **Canadian Journal of Botany**, 61: 1825-1830, 1983.

TAYLOR, G.T.; CROWDER, A.A., RODDEN, R. Formation and morphology of iron plaque on the roots of *Thypha latifolia* L. grown in solution culture. **American Journal of Botany**, 71: 666-675, 1984.

VANSUYT, G.; LOPES, F.; INZÉ, D.; BRIAT, J. F.; FOURCROY, P. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letters**, 410: 195-200, 1997.

WANG, M. Y. et. al. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalema. **Plant Physiology**, 103: 1259-1267, 1993.

WELLBURN, AR The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various, using various solvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144 : 307-313, 1994.

WIRÉN, N. et al. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opinion in Plant Biology**, 3: 254-261, 2000.

YAMUCHI ,M. Rice bronzing in Nigeria caused by nutrient imbalances and its control by potassium sulfate application. **Plant and Soil**, 117: 275-286, 1989.

YE, Z.H.; BAKER, A.J.M.; WONG, M.H.; WILLIS, A.J. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. **New Phytologist**, 136: 469-480, 1997.

YE, Z.H.; BAKER, A.J.M.; WONG, M.H.; WILLIS, A.J. Copper uptake in *Typha latifolia* as affected by iron and manganese on the root surface. **Canadian Journal of Botany**, 79: 314-320, 2001.

ZHANG, X.K.; ZHANG, F.S.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. **Plant and Soil**, 209: 187-192, 1999.

CAPÍTULO II

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EM PLANTAS JOVENS DE *Eugenia uniflora* L., SUBMETIDAS A NÍVEIS TÓXICOS DE FERRO

RESUMO

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas. Quando em excesso, porém, pode induzir a produção e acúmulo de espécies ativas de oxigênio, causando estresse oxidativo. O objetivo do trabalho, portanto, foi avaliar o efeito de doses tóxicas de Fe sobre o metabolismo antioxidativo em plantas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Plantas de quarenta e cinco dias, selecionadas quanto a tamanho e forma foram submetidas, em solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica, a três concentrações de Fe (0,045, 1,0 e 2,0 mM), aplicado na forma de FeEDTA e a três tempos de tratamento (15, 30 e 45 dias após início da aplicação do tratamento). Para cada tempo de tratamento, as plantas foram coletadas e separadas em raízes e folhas, e o material vegetal congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra-freezer a – 80 °C, até o momento das análises. Determinou-se, então, os teores de MDA, as atividades das enzimas SOD, CAT, POX, APX, GPX e GR e os teores de AA, DHA, GSH, GSSG e as razões AA/DHA, GSH/GSSG. O aumento da concentração de ferro na solução nutritiva resultou em aumento da intensidade de peroxidação de lipídios, principalmente nas folhas. As atividades das enzimas antioxidativas SOD e GR aumentaram com os níveis de Fe na solução e com o período experimental. As enzimas CAT, POX e APX aumentaram suas atividades com o acréscimo da concentração de Fe, mas decresceram com o tempo de exposição aos tratamentos. A atividade da GPX diminuiu com o aumento da concentração de Fe e com o tempo de exposição. Os teores de AA e de GSH e as

relações AA/DHA e GSH/GSSG, de modo geral, aumentaram com a concentração de Fe e com o tempo de tratamento. Os resultados indicam que plantas de *E. uniflora* sob níveis tóxicos de Fe, sofrem estresse oxidativo, que é atenuado tanto por mudanças nas atividades de enzimas antioxidativas quanto por mudanças nos teores de alguns metabólitos antioxidativos como AA e GSH.

Palavras-chave: estresse oxidativo, toxidez, ferro.

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, envolvido em vários processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (Becana et al., 1998; Briat e Lobréaux, 1997; Schmidt, 2003).

O ferro, quando em excesso na sua forma livre, em função de suas propriedades físico-químicas, pode deslocar o balanço redox celular para um estado pró-oxidante, levando as plantas a uma diversidade de sintomas morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (Briat e Lebrun, 1999; Hell e Stephan, 2003), gerando estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1984). Como consequência, ocorre a peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos, destruição de pigmentos, resultando em danos celulares e, eventualmente, a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1984; Møller et al., 2007).

A intensificação do estresse oxidativo, por sua vez, elicita a ativação de sistemas de defesa antioxidantes (Briat e Lebrun, 1999) de natureza enzimática e não-enzimática (Becana et al., 1998; Vansuyt et al., 1997) que se manifestam em diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, entre outros). O sistema de defesa não-enzimático consiste de metabólitos de baixo peso molecular como ascorbato (AA), glutatona (GSH), carotenóides, α -tocoferol, ubiquinol, ácido úrico e ácido lipóico, que agem diretamente sobre os radicais livres, eliminando-os do metabolismo celular (Becana et al., 1998; Mittler, 2002; Noctor e Foyer, 1998). O sistema enzimático é constituído de enzimas como a dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidases (POX,

E.C. 1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11), peroxidase da glutathiona (GPX, E.C. 1.11.1.9) e redutase da glutathiona (GR, E.C. 1.6.4.2) que atuam isoladamente ou em conjuntos denominados “ciclos” (da glutathiona ou do ascorbato-glutathiona) na eliminação de ROS (Becana et al., 1998; Fang et al., 2001).

As usinas de pelotização de minério de ferro são responsáveis pelo aumento dos níveis atmosféricos de muitos poluentes, especialmente óxido férrico e gases tóxicos, como óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, monóxido e dióxido de carbono. O ferro emitido na forma de material sólido particulado (MSPFe) quando absorvido pelos vegetais eleva os teores tissulares deste elemento resultando em reduções significativas nas taxas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e induzindo estresse oxidativo nas plantas (Neves et al., 2009; Pereira et al., 2009).

Estudos preliminares mostram que algumas espécies nativas, como *Eugenia uniflora* L., localizadas em área remanescente de restinga, em Guarapari, ES, estão sendo afetadas pelas emissões de uma usina de pelotização de minério de ferro naquela região (Lopes et al., 2000). Neves e colaboradores (2009), estudando o efeito da deposição particulada de ferro e da chuva ácida nessa espécie encontrou nas folhas teores totais de até 1,66 mg g⁻¹ de MS desse elemento quando as plantas foram expostas a uma concentração de 175,8 mg cm⁻¹ de MSPFe. A autora também salienta que o aumento no teor foliar de ferro das plantas de *E. uniflora* foi acompanhado pelo aparecimento de sintomas visíveis de toxidez, como bronzeamento das folhas e enegrecimento das raízes.

Essa espécie é de ampla distribuição na região e o estudo da absorção, acúmulo e efeitos da toxicidade de ferro poderá contribuir para avaliação de sua sobrevivência neste microambiente submetido ao impacto ambiental causado por essas emissões. Além disso, poucas são as informações na literatura sobre os efeitos de excesso de ferro em espécies vegetais tropicais.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos de Fe em plantas jovens de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pela avaliação da sua capacidade em eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) através de seus mecanismos de tolerância enzimáticos e não-enzimáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas de uma única matriz, crescida em solo não contaminado com excesso de Fe, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 3% durante 15 min. Posteriormente, foram tratadas com solução fungicida à base de Benlate a 0,2% (p/v) e colocadas para germinar em rolos de papel “germitest” parcialmente mergulhados em solução de CaCl₂ 0,5 mM, sob aeração contínua e temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

Quarenta e cinco dias após a semeadura, as plantas de *E. uniflora*, foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, número de folhas e estado fitossanitário e, então, transferidas para vasos de polietileno, pintados externamente de preto, contendo 1,6 L de solução nutritiva de Hoagland, pH 5,0 com metade da força iônica suprida com Fe na concentração de 0,045 mM, aplicado na forma de FeEDTA (Hoagland e Arnon, 1938).

Após período de adaptação de sete dias sob as condições da sala de crescimento, as plantas foram submetidas aos tratamentos que consistiram na combinação fatorial entre três níveis de Fe (0,045 (controle), 1,0 e 2,0 mM), aplicado na forma de FeEDTA e três tempos de avaliação (15, 30 e 45 dias após início da aplicação do tratamento).

O cultivo das plantas foi realizado em sala de crescimento com temperatura controlada para 25 ± 1 °C, sob irradiância de 230 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. O valor de pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 5,0 pela adição de HCl ou NaOH e a solução nutritiva renovada a cada sete dias.

Encerrado o experimento, as plantas foram coletadas, lavadas em água corrente e desmineralizada, separadas em raízes e folhas e o material vegetal foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultra-freezer a – 80 °C, até o momento da análise.

2.1. Determinação da intensidade de peroxidação de lipídios em plantas jovens de Eugenia uniflora, submetidas a níveis tóxicos de Fe

Avaliação de danos celulares foi feita pela determinação do grau de peroxidação de lipídios, conforme metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991). Para isso, amostras de 300 mg de raízes e folhas (previamente armazenadas em ultra-freezer a -80 °C), depois de fragmentadas em nitrogênio líquido, foram maceradas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Os homogeneizados resultantes foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 $\times g$ durante 15 min, coletando-se o sobrenadante. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL do extrato bruto foram adicionadas a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) preparado em TCA 20% (p/v); como controle negativo, outros 0,5 mL do extrato bruto foram adicionados a 1,5 mL da solução TCA 20% sem TBA (-TBA). As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C. Após 30 min, a reação foi paralisada em banho de gelo, os tubos foram centrifugados a 10.000 $\times g$, por 10 min e as absorvâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 532 e 600 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA produzido foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expressa em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$ (Heath e Packer, 1968).

2.2. Determinação das atividades de enzimas antioxidativas

2.2.1. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades das enzimas catalase, peroxidase, dismutase do superóxido e ascorbato peroxidase foram obtidos a partir da trituração de amostras de 300 mg de raízes e folhas em N_2 líquido. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM, triton-X 0,1% e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% (p/v) e o material vegetal foi homogeneizado (Peixoto et al., 1999).

Para a determinação das atividades da peroxidase da glutatona e da redutase da glutatona 300 mg de raízes e folhas foram triturados em N_2 líquido, seguido de homogeneização em 2,0 mL do seguinte sistema tampão: a) Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5,

EDTA 1,0 mM e $MgCl_2$ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001) para GPX e; b) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM, DTT 2,0 mM, PMSF 1,0 mM e PVPP 4% (Carlberg e Mannervik, 1985) para GR.

Os homogeneizados, após filtração através de quatro camadas de gaze, foram centrifugados a 12.000 xg por 15 minutos, a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e utilizadas como extrato enzimático bruto.

2.2.2. *Determinação das atividades de enzimas antioxidativas*

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 40 μ L do extrato enzimático bruto a 1,96 mL do meio de reação constituído de metionina 13 mM, azul de ρ -nitro tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2,0 μ M, em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 conforme metodologia descrita por Del Longo et al. (1993). A reação foi conduzida a 25 °C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa revestida com papel alumínio. O início da reação se deu pelo acendimento da lâmpada e o final, após 5 min, com o desligamento da mesma (Giannopolitis e Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pelo incremento na absorvância a 560 nm após subtração do branco, no qual a mistura da reação foi mantida no escuro pelo mesmo tempo. A absorvância máxima, proveniente da fotorredução do NBT, foi medida em meio de reação idêntico ao anterior, contudo, sem a adição do extrato enzimático bruto e mantido sob a mesma iluminação. A atividade enzimática foi expressa em unidade SOD, que representa a atividade enzimática capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT, conforme sugerido por Beauchamp e Fridovich (1971).

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático bruto a 1,9 mL do meio de reação, constituído de H_2O_2 12,5 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 25 °C. Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 36 $M^{-1} cm^{-1}$ (Anderson, 1985) e o resultado foi expresso em μ mol $min^{-1} mg^{-1}$ proteína.

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de alíquotas de 40 μ L do extrato enzimático bruto de raiz e de 40 μ L do extrato foliar diluído em 50% (1:2)

a 1,96 mL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM, a 25 °C (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo acréscimo na absorvância a 420 nm, no primeiro minuto de reação, à 25 °C. Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e o resultado foi expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Para a determinação da atividade da peroxidase do ascorbato foram adicionados 100 μL do extrato enzimático bruto a 1,9 mL da mistura de reação constituída de ascorbato 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e H₂O₂ 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981), sendo o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da peroxidase da glutatona foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL da mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, a 30 °C, foi medido durante o primeiro minuto da reação, sendo a atividade enzimática calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado foi expresso em nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da redutase da glutatona foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL da mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM (preparado em tampão Tris-HCl, 0,5 mM, pH 7,5), conforme metodologia descrita por Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, a 30 °C, foi medido durante o primeiro minuto da reação e a atividade enzimática calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado foi expresso em nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.2.3. Determinação dos teores de proteína

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão.

2.3.Determinação da concentração de metabólitos do sistema antioxidante

2.3.1. Determinação dos teores de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA)

Amostras de 400 mg de raízes e de folhas foram pulverizadas em N₂ líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de TCA 6% (p/v), seguindo-se filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 15.000 *xg*, por 5 min (Kampfenkel et al., 1995). Alíquotas de 100 µL do extrato bruto de raiz e de 50 µL do extrato bruto de folhas foram utilizadas nas avaliações dos teores destes dois metabólitos. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C.

O teor do ascorbato total (AA + DHA) foi determinado após redução do DHA pelo ditioneitol (DTT). Para isso, aos extratos brutos foram adicionados 200 µL de DTT 10 mM (preparado em tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4) e 400 µL de tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4. A mistura foi, então, incubada a 42 °C, por 15 min e, posteriormente, foram acrescentados 200 µL de N-etilmaleimida 0,5% (p/v), 1,0 mL de TCA 10% (p/v), 800 µL de H₃PO₄ 42% (v/v), 800 µL de 2,2'-dipiridil 4% (p/v) (dissolvido em etanol 70%, v/v) e 400 µL de FeCl₃ 3% (p/v), completando-se o volume para 4,0 mL. Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada a 42 °C, por 40 min, seguida da paralisação da reação em banho de gelo. A absorvância da mistura foi, em seguida, determinada a 525 nm.

O teor de ascorbato reduzido (AA) foi determinado como descrito anteriormente, tendo o DTT e o N-etilmaleimida sido omitidos e substituídos por 600 µL de tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4.

Os teores de ascorbato total e AA foram determinados por meio de curva de calibração utilizando-se padrões autênticos de ácido ascórbico, sendo os resultados expressos em nmol g⁻¹ MF.

O teor de desidroascorbato (DHA) foi calculado pela diferença entre o ascorbato total e o reduzido.

2.3.2. Determinação dos teores de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Amostras de 300 mg de massa fresca de raízes e folhas foram trituradas em N₂ líquido, seguido da adição de 2,0 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1 M contendo EDTA 1 mM. Após o material ter sido filtrado através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, por 10 min a 4 °C. Em seguida, foram separadas duas alíquotas de 150 µL cada, sendo que uma foi utilizada para determinação dos teores da glutathiona total e a outra para determinação dos teores da glutathiona oxidada. Neste caso, a alíquota a ser derivatizada foi pré-tratada com 7,5 µL de 2-vinilpiridina e incubada em banho-maria a 30 °C durante uma hora.

Em seguida foram adicionadas alíquotas de 100 µL de amostra a 200 µL de tampão de fosfato de sódio 125 mM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 µL de NADPH 0,3 mM, 100 µL de HCl 0,1 M contendo EDTA 1 mM e 100 µL de DTNB 6 mM (Griffith, 1980). A mistura foi incubada a 30 °C, por 5 min. Posteriormente, foi acrescentado à mistura 10 µL de redutase da glutathiona (50 U mL⁻¹) e o aumento na absorvância foi monitorado durante o primeiro minuto de reação a 412 nm. A concentração da glutathiona reduzida foi calculada pela diferença entre os teores da glutathiona total (GSH + GSSG) e a glutathiona oxidada (GSSG). As concentrações de GSH total, GSH e GSSG foram determinadas por meio de curva de calibração utilizando-se padrões autênticos de glutathiona reduzida e oxidada, sendo o resultado expresso em nmol g⁻¹ de matéria fresca.

2.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAEG/UFV.

3. RESULTADOS

Nas folhas, a peroxidação de lipídios, medida pelos níveis de MDA-TBA, foram maiores que aqueles encontrados nas raízes e aumentou com a concentração de FeEDTA e com o tempo de exposição aos tratamentos (Figura 1a). A maior intensidade de peroxidação ocorreu aos 45 DAT na dose de 2,0 mM FeEDTA em que se observou acréscimo de 51% na concentração de MDA-TBA em relação ao controle. Nas raízes, a intensidade de peroxidação, também, aumentou com o tempo de exposição aos tratamentos, independente da concentração de Fe (Figura 1b). O tratamento com Fe, entretanto, na concentração de 2,0 mM resultou em diminuição dos níveis de MDA-TBA em 8 e 32% aos 30 e 45 DAT, comparativamente aos controles de cada DAT. Na concentração de 1,0 mM a diminuição na peroxidação de lipídios somente ocorreu aos 45 DAT.

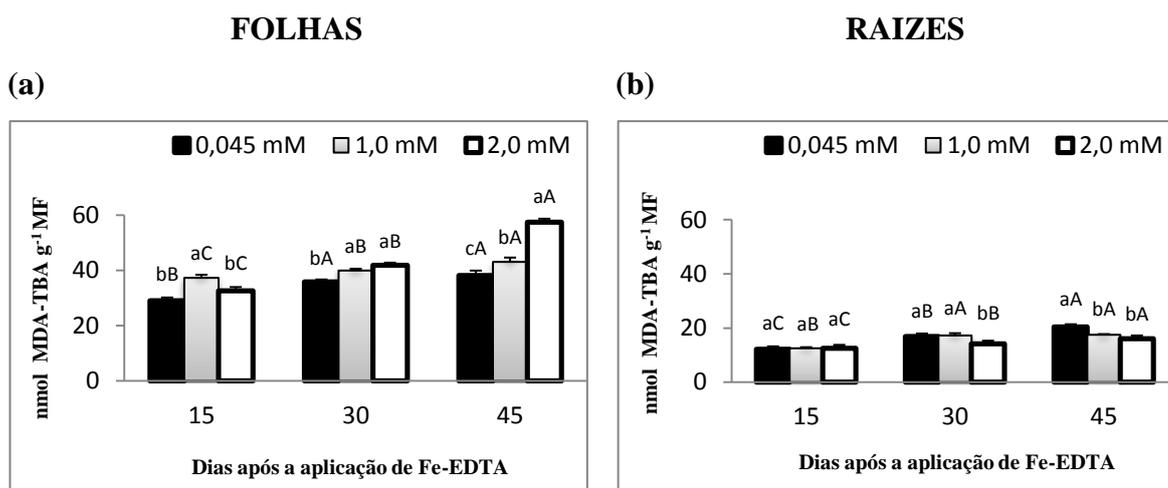


Figura 1 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a peroxidação dos lipídios nas folhas (a) e raízes (b) em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

O aumento da concentração de Fe e do tempo de exposição não resultou em alteração significativa na atividade da SOD nas folhas de *E. uniflora*, exceto aos 45 DAT (Figura 2a) onde se observou acréscimo na atividade em torno de 30% em

relação à dose controle. Nas raízes, por outro lado, o estresse por Fe resultou em aumento na atividade da SOD já a partir de 15 dias de tratamento (Figura 2b) e se intensificou com o tempo e aumento da concentração de Fe na solução nutritiva. Aos 45 DAT a atividade dessa enzima aumentou, em relação ao controle, em aproximadamente 80 e 93% nas plantas tratadas com 1,0 e 2,0 mM FeEDTA, respectivamente, mas não houve mudança na atividade da enzima ao se aumentar a concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM.

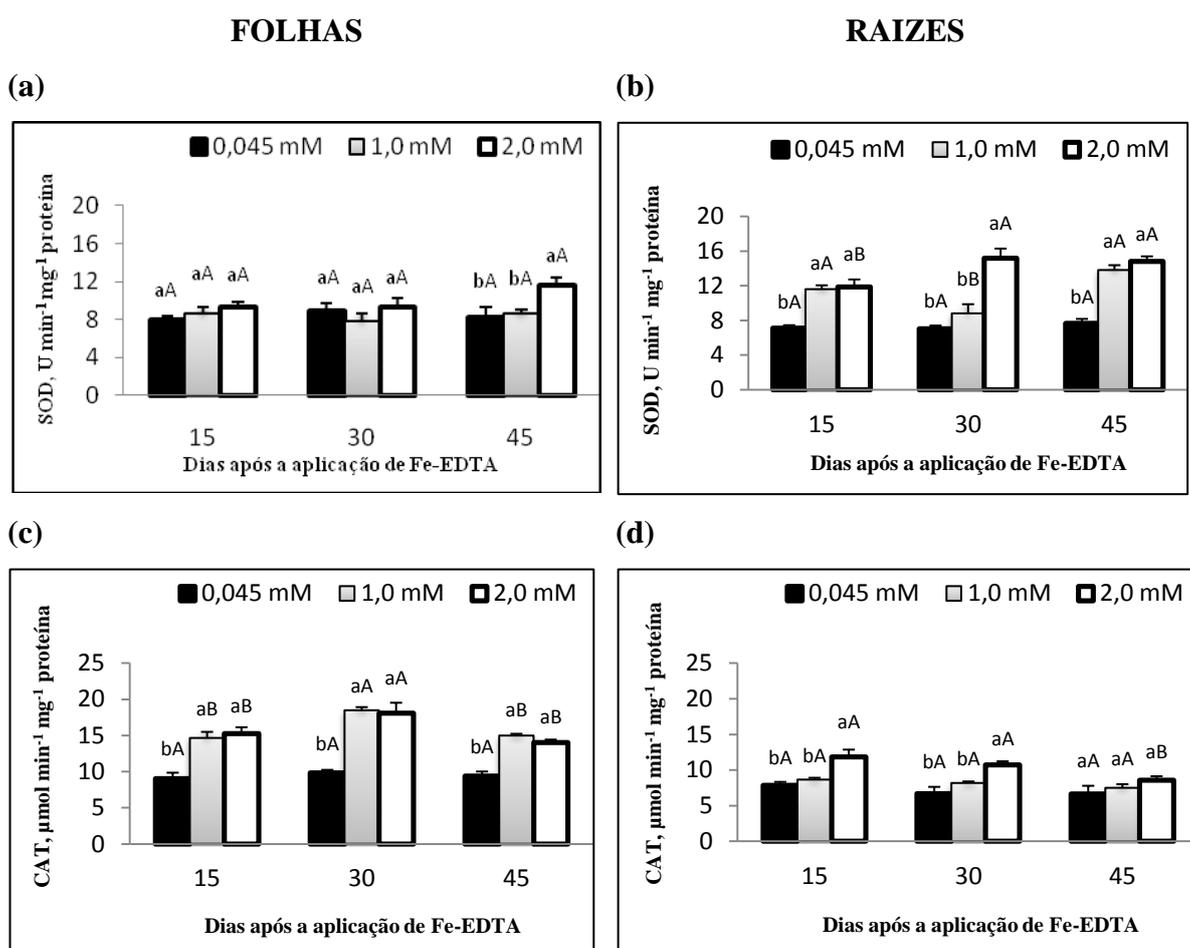


Figura 2 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre as atividades da SOD e CAT nas folhas (a, c) e raízes (b, d) em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

A atividade da CAT nas plantas-controle (Fe 0,045 mM) foi semelhante em folhas e raízes (Figura 2cd). Na presença de Fe 1,0 e 2,0 mM a atividade desta enzima foi maior nas folhas, independente do tempo estudado (Figura 2ac). Nas folhas das plantas tratadas com Fe 1,0 e 2,0 mM a atividade da CAT foi sempre maior do que no controle, mas não se observou efeito adicional ao aumentar a concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM, independente do tempo de tratamento. Aos 30 DAT foram observados os maiores valores de atividade da CAT nas folhas tratadas com Fe 1,0 e 2,0 mM. Nas raízes, o tratamento das plantas resultou em aumento na atividade da CAT aos 15 e 30 DAT na concentração de Fe de 2,0 mM. O aumento observado na atividade desta enzima foi de aproximadamente 51 e 60% aos 15 e 30 DAT, respectivamente. Não foram observadas variações nos valores da atividade da CAT ao longo do período tratamento das plantas com FeEDTA, exceto aos 45 DAT em que se observou uma diminuição na atividade desta enzima na dose mais elevada de Fe aplicada a solução (Figura 2d).

De maneira geral, a atividade da POX foi mais elevada nas raízes que nas folhas (Figura 3ab). A atividade da POX nas folhas foi maior aos 15 DAT, decresceu aos 30 DAT e voltou a crescer aos 45 DAT (Figura 3a). Nesse órgão, observou-se forte aumento na atividade da POX com o aumento da concentração de Fe. O tratamento com 2,0 mM FeEDTA na solução resultou no maior aumento de atividade desta enzima que chegou a 112% em relação àqueles encontrados nas plantas controle. Nas raízes a atividade enzimática decresceu com o tempo de exposição ao tratamento, exceto na presença de Fe 2,0 mM que permaneceu essencialmente constante. Nas raízes, a atividade da POX foi maior na concentração de Fe de 2,0 mM, comparativamente às demais doses. Aos 45 DAT a atividade da POX nas plantas tratadas com FeEDTA 2,0 mM foi aproximadamente 115% mais elevada que nas plantas controle.

A atividade da APX aumentou com o acréscimo da concentração de FeEDTA na solução tanto nas folhas quanto nas raízes em todas as épocas avaliadas (Figura 3cd). Nas folhas, a atividade da APX nas concentrações mais elevadas de Fe foi sempre maior do que no controle (0,045 mM) e a maior atividade enzimática foi encontrada aos 30 DAT, na concentração de Fe de 2,0 mM (Figura 3c). Em todos os períodos de tempo analisados, foram observados aumentos significativos na atividade enzimática ao se aumentar a concentração de Fe de 1,0 para 2,0 mM. A

atividade enzimática na dose de 2,0 mM FeEDTA, foi cerca de 3,7, 5,9 e 1,9 vezes maior do que nos controles aos 15, 30 e 45 DAT, respectivamente. Nas raízes foram observados aumentos significativos na atividade da APX pelo incremento da concentração de Fe na solução nutritiva ao longo do tempo de tratamento, exceto aos 15 DAT. A atividade da APX nesta parte da planta foi mais elevada do que nas folhas (Figura 3c,d), mas os aumentos causados pela aplicação de FeEDTA em relação ao controle foram menores aos 15 e 30 DAT. Neste caso, o acréscimo da atividade enzimática na dose de 2,0 mM FeEDTA foi de aproximadamente 1,7, 2,7 e 2,3 vezes mais elevada do que nos controles aos 15, 30 e 45 DAT, respectivamente.

A atividade de GPX nas folhas foi sempre menor do que nas raízes (Figura 3ef). Nas folhas observou-se decréscimo na atividade dessa enzima com o aumento da concentração de FeEDTA e com o tempo de exposição. Aos 45 DAT a diminuição na atividade enzimática foi cerca de 4,3 vezes na dose de 2,0 mM FeEDTA. Nas raízes a atividade da GPX foi, em média, cerca de 6 vezes maior do que nas folhas. A atividade enzimática sofreu redução significativa na presença de Fe 2,0 mM em todos os tempos analisados. Na concentração de Fe 1,0 mM a redução somente foi significativa aos 15 DAT, quando comparada ao controle.

A atividade da GR, de modo geral, aumentou com o tempo de tratamento e com as concentrações de Fe na solução, tanto nas folhas quanto nas raízes de plantas de *E. uniflora* (Figura 4 ab). Nas folhas, não foi observado efeito significativo do Fe na concentração de 1,0 mM em relação ao controle em nenhum dos tempos de tratamento estudados (Figura 4a). Nesta parte da planta, a maior atividade enzimática foi encontrada na dose de 2,0 mM de FeEDTA aos 30 DAT. A atividade da GR nas raízes foi cerca de 2 vezes maior que aquelas encontradas nas folhas (Figura 4b). A atividade da GR nas raízes aumentou com aumento da concentração de Fe e com o tempo de tratamento. Aos 45 DAT foram observados acréscimos nessa atividade em 116% e 143% em relação ao controle, nas doses de 1,0 e 2,0 mM FeEDTA, respectivamente.

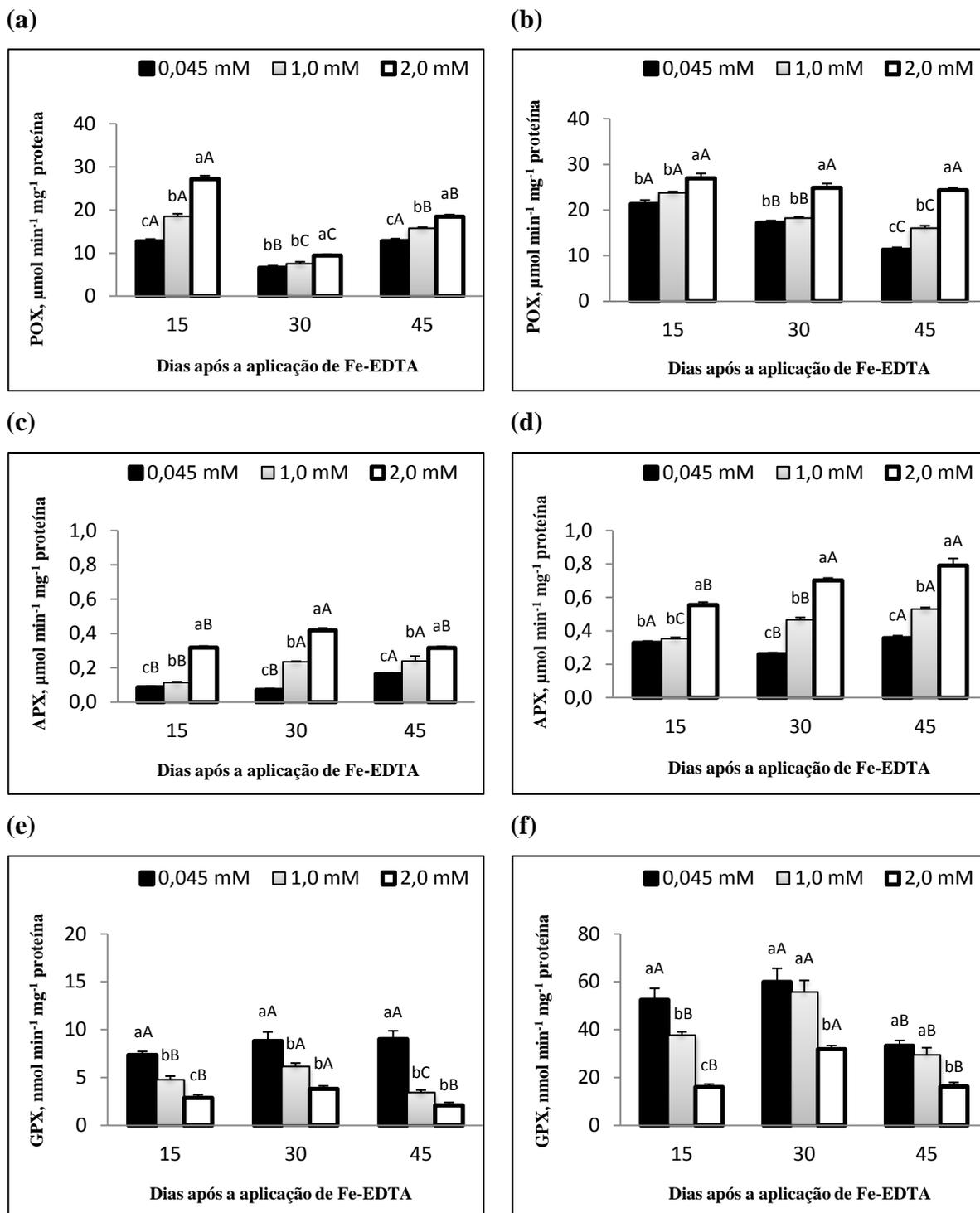


Figura 3 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a atividade POX (a, b), APX (c, d) e GPX (d, e) nas folhas e raízes em plantas jovens de *Eugenia uniflora*, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

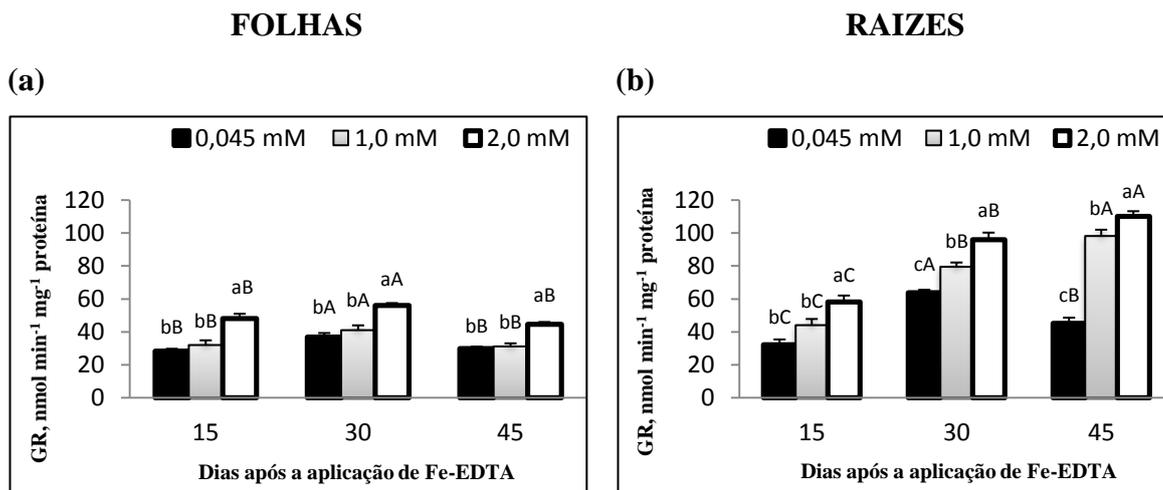


Figura 4 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre a atividade da GR nas folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de em função do tempo de aplicação do tratamento.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

O teor de AA nas folhas foi cerca de duas vezes maior que nas raízes (Figura 5ab). Aos 15 e 30 DAT verificaram-se acréscimos significativos nos teores de AA nas folhas de plantas expostas à dose de 1,0 mM de Fe, efeito este que desapareceu aos 45 DAT. O Fe na concentração de 2,0 mM, apenas aos 45 DAT, provocou aumento no teor de AA de 68% em relação ao controle. Nas raízes, o teor de AA aumentou nas plantas somente aos 15 dias de tratamento. Aos 30 DAT observou-se redução nos teores de AA nas concentrações mais elevadas de FeEDTA, enquanto aos 45 DAT as diferenças entre os tratamentos desapareceram.

Os teores de DHA nas folhas foram, de modo geral, mais elevados aos 30 DAT, mas decresceram aos 45 DAT (Figura 5c). O tratamento com Fe resultou em aumento no teor de DHA apenas aos 15 DAT. Tratamentos mais prolongados com este elemento resultaram, em geral, em diminuição nos teores de DHA. O tratamento das plantas com FeEDTA 2,0 mM causou redução significativa nos teores de DHA de 22% e 44% aos 30 e 45 DAT, respectivamente. Nas raízes, de modo geral, observou-se decréscimo dos teores de DHA, o qual se intensificou com o aumento da concentração de Fe e com o tempo de tratamento (Figura 5d). O decréscimo, que era de 177% aos 30 DAT nas doses de 2,0 mM, alcançou 240% em relação aos teores encontrados nas plantas controle.

FOLHAS

RAIZES

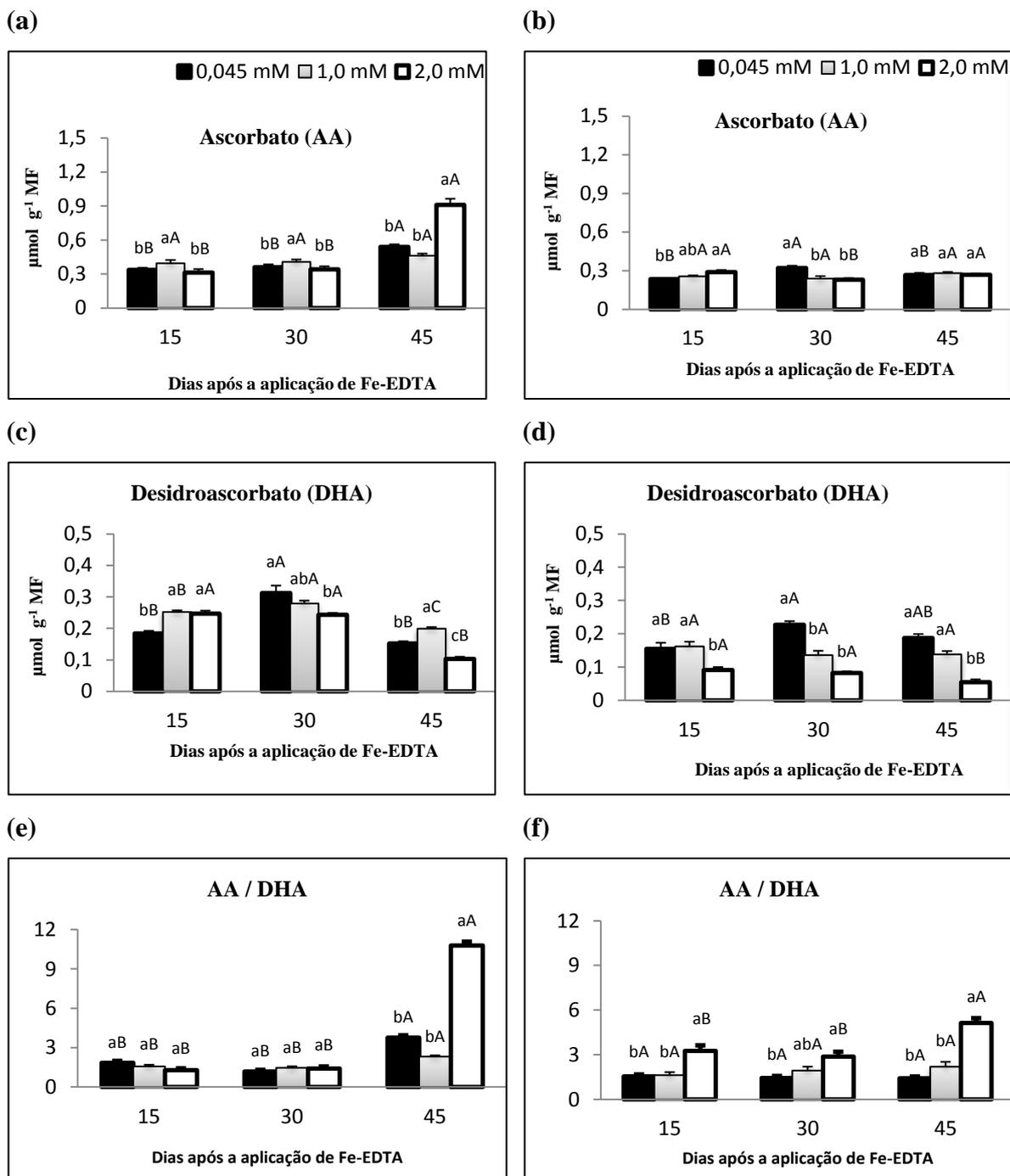


Figura 5 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de ascorbato reduzido (AA), desidroascorbato (DHA) e a razão AA/DHA em folhas e raízes de plantas jovens de *Eugenia uniflora*, em função do tempo de aplicação dos tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

Nas folhas, a relação AA/DHA não se modificou com o tempo de exposição e com a concentração de FeEDTA, exceto aos 45 DAT em que se observou aumento de cerca de 2,8 vezes no tratamento com FeEDTA 2,0 mM (Figura 5e). Nas raízes, a relação AA/DHA aumentou com o tempo de tratamento e com o aumento na concentração de FeEDTA (Figura 5f). Após 45 DAT, a relação AA/DHA em plantas tratadas com FeEDTA 2,0 mM foi cerca de 3,6 vezes maior do que nas plantas controles.

Os teores de GSH nas plantas submetidas a níveis elevados de Fe foram sempre maiores nas folhas do que nas raízes (Figura 6). Nas folhas, o tratamento com FeEDTA resultou sempre em elevação nos teores de GSH em relação ao controle. Aos 15 DAT os teores de GSH aumentaram, em média, cerca de 46 % nas doses de 1,0 e 2,0 mM de Fe. Com o prolongamento do tempo de exposição observou-se tendência de decréscimo nesses valores. Nas raízes observou-se, também, aumento nos teores de GSH com o aumento na concentração de FeEDTA. Nas plantas-controle o teor de GSH reduziu com o tempo de tratamento, de tal modo que aos 45 DAT foi 97% menor do que nas plantas tratadas com Fe 2,0 mM.

Os teores de GSSG em plantas tratadas com FeEDTA 1,0 mM foram sempre maiores em todas as épocas de avaliação, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 6). O tratamento com FeEDTA 2,0 mM resultou sempre em redução nos teores de GSSG em relação ao tratamento com FeEDTA 1,0 mM e, na maioria das vezes, em relação às plantas-controle também.

A razão GSH/GSSG, de modo geral, aumentou nas doses mais elevadas de Fe, especialmente na concentração de 2,0 mM. Aos 45 DAT, a relação GSH/GSSG aumentou em relação ao controle 103% e 137% nas folhas e raízes, respectivamente.

FOLHAS

RAIZES

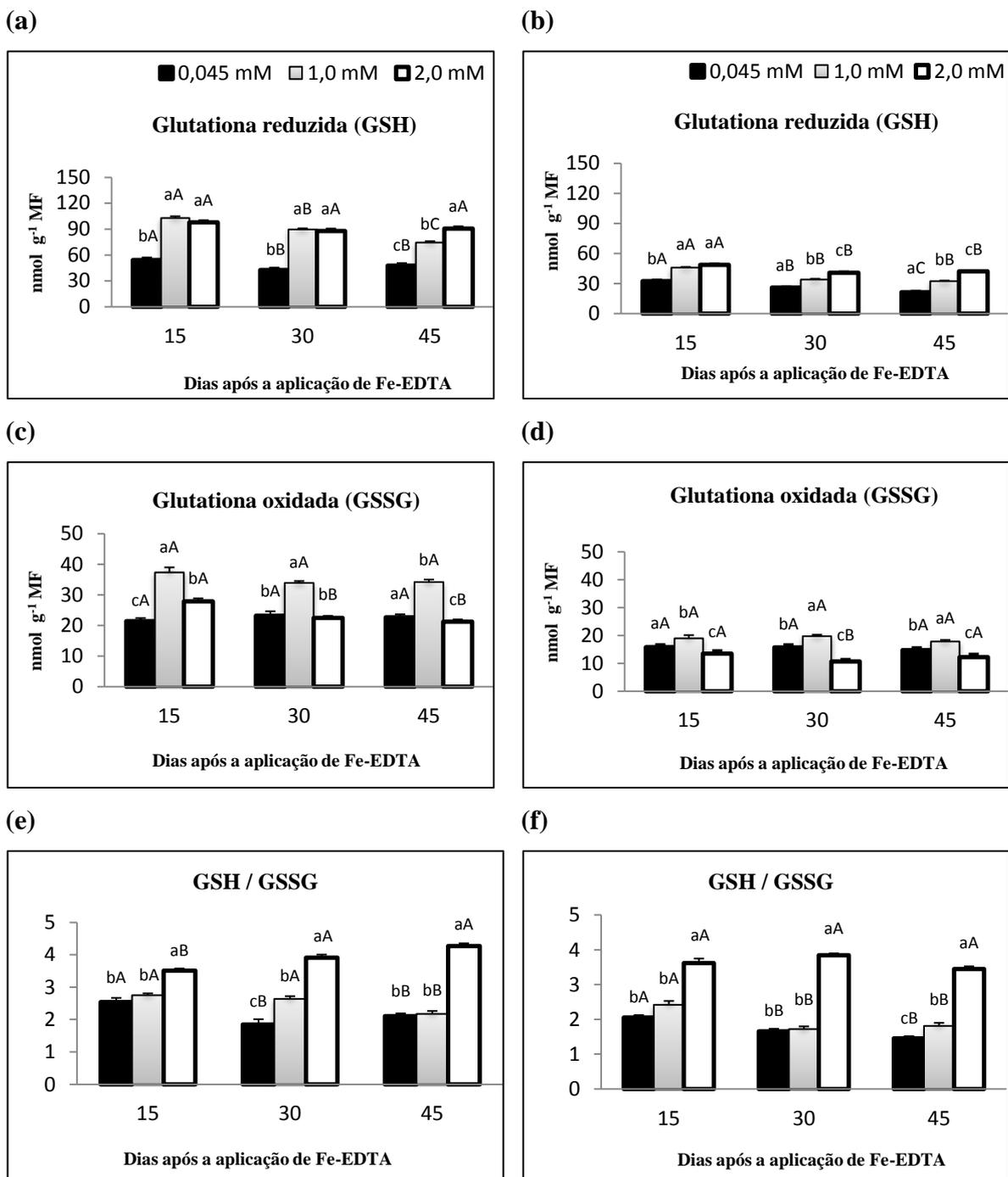


Figura 6 - Efeito da aplicação de FeEDTA sobre os teores de glutaciona reduzida (GSH), glutaciona oxidada (GSSG) e a razão GSH/GSSG em folhas e raízes de plantas jovens de *Eugenia uniflora*, em função do tempo de aplicação dos tratamentos

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam as diferentes doses de FeEDTA dentro de cada época de avaliação e, letras maiúsculas, as diferentes épocas de exposição dentro de cada tratamento. Os valores representam a média de três repetições \pm erro padrão (EP).

4. DISCUSSÃO

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, envolvido em vários processos fundamentais. Este elemento, quando em excesso, entretanto, aumenta a produção de radicais livres que, devido às suas propriedades físico-químicas, pode deslocar o balanço redox celular para um estado pró-oxidante, levando a uma diversidade de sintomas morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (Briat e Lebrun, 1999; Hell e Stephan, 2003), gerando estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1984). Nesse trabalho, avaliaram-se os efeitos de doses tóxicas de Fe sobre a resposta do metabolismo antioxidativo em plantas jovens de *Eugenia uniflora*.

Um dos mais importantes indicadores da ocorrência de danos oxidativos nas células é o aumento na peroxidação de lipídios, estimada com base na produção do malondialdeído (MDA) (Azevedo Neto et al., 2006). No presente estudo, os níveis de MDA encontrados nas folhas aumentaram com a concentração de Fe e com o tempo de tratamento (Figura 1). Tal resultado indica acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células foliares, desencadeando o processo de peroxidação de lipídios de suas membranas. O acréscimo da peroxidação de lipídios sob condições de toxidez por Fe foi relatada para diferentes espécies (Carli, 2008; Kuki et al., 2008; Kumar et al., 2008; Sinhá et al., 1997; Sinhá e Saxena, 2006; Souza-Santos et al., 2001; Stein et al., 2008; Xing et al., 2010) e indica a ocorrência de estresse oxidativo provocado pela toxidez desse elemento. A intensidade dos danos oxidativos, porém, difere entre espécies ou genótipos e a resposta depende tanto da duração quanto da intensidade do estresse (Sgherri et al., 2000). A concentração de Fe nas raízes atingiram valores muito mais elevados que nas folhas (Capítulo I, Tabela 1) resultando em maiores atividades das enzimas SOD e POX que eliminaram maior quantidade de ROS.

O aumento da concentração de Fe na solução e, conseqüentemente, maior absorção/acúmulo deste metal nos tecidos vegetais, produz estresse oxidativo aumentando as concentrações de ROS tais como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} , produzido pela reação de Fenton (Becana et al., 1998). Em resposta ao acúmulo de ROS nos tecidos vegetais mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos podem ser ativados pelas plantas visando atenuar possíveis danos celulares provocados por estas espécies reativas (Reddy et al., 2005; Singh et al., 2006). A capacidade de ativação desses

mecanismos pode ser elemento chave no processo de tolerância das plantas ao estresse oxidativo (Giannakoula et al., 2010).

A dismutase do superóxido (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido (Scandalios, 1993), sendo essa a primeira e uma das mais importantes enzimas na defesa celular contra o estresse oxidativo (Alscher et al., 2002; Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2000). Nesse trabalho, observou-se aumento da atividade da SOD com o aumento da concentração de Fe e com o tempo de exposição aos tratamentos, especialmente nas raízes das plantas de *Eugenia uniflora* (Figura 2a e b). Aumentos na atividade dessa enzima sob condições de toxidez por Fe foram encontrados por outros autores em *Nicotiana plumbaginifolia* (Kampfenkel et al., 1995); milho (Kumar et al., 2008); *Clusia hilariana* (Pereira et al., 2009); *Hydrilla verticillata* (Sinhá et al., 1997) e arroz (Stein et al., 2008). Já Neves e colaboradores (2009) observaram decréscimo na atividade dessa enzima nas folhas de *Eugenia uniflora* submetidas à deposição de material sólido particulado de Fe associado a chuva ácida. A elevação da atividade da SOD pode indicar não apenas aumento na produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, conseqüentemente, o estabelecimento de estresse oxidativo, mas também o envolvimento imediato dessa enzima no processo de desintoxicação deste tipo de ROS. A ação da SOD, por outro lado, resulta na formação de H_2O_2 o qual é, posteriormente, degradado por outras enzimas antioxidativas como catalases e peroxidases (Azevedo et al., 1998; Scandalios, 1993). A ação conjunta dessas enzimas, portanto, é fundamental para a manutenção da homeostase de redox, fundamental para a estabilidade do sistema de membranas nas células expostas a radicais livres (Ding et al., 2007).

O aumento da atividade da CAT, observado em cada época de avaliação, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM de FeEDTA tanto nas folhas quanto nas raízes de *E. uniflora* (Figura c, d) pode estar associado a um aumento na produção de H_2O_2 proveniente, principalmente, da ação da SOD (Ghanati et al., 2005), especialmente nos peroxissomos sendo sua ação indispensável para a desintoxicação de níveis elevados de ROS durante o estresse nessa organela (Gupta et al., 2009). Outros estudos têm demonstrado a elevação na atividade dessa enzima sob condições de estresse por Fe (Kampfenkel et al., 1995; Kuki et al., 2008; Kumar et al., 2008; Stein et al., 2008; Xing et al., 2010). Mesmo que atividade da CAT tenha aumentado com a concentração de Fe na solução, aos 45 DAT foi observado um declínio na atividade

desta enzima, provavelmente associado a uma inativação ou degradação da CAT que parece estar associado com o aumento do tempo de tratamento com o agente estressante (Shang e Feierabeng, 1999). Chatterjee e colaboradores (2006) sugerem, adicionalmente, que o decréscimo na atividade da CAT poderia estar associado a uma queda no fornecimento de substratos oxidantes (O_2 : H_2O_2). Isto, contudo, parece não estar ocorrendo no presente trabalho uma vez que a atividade da SOD aumentou neste tratamento indicando ter sido produzido H_2O_2 , sub-produto da ação desta enzima.

A atividade da POX, de maneira geral, aumentou com a dose de Fe, mas nas raízes diminuiu com o tempo de exposição, exceto na concentração de FeEDTA 2,0 mM (Figura 3 ab). Assim como a POX, a atividade da APX também aumentou com o incremento da concentração de Fe, porém, diferente daquela, a atividade desta enzima aumentou com o tempo de exposição aos tratamentos. Aumento na atividade enzimática da POX em resposta a doses crescentes de Fe foram observados em *Ipomea pes-caprae* (Carli, 2008); *Solanum tuberosum* (Chatterjee et al., 2006); *Schinus terebinthifolius* (Kuki et al., 2008); milho (Kumar et al., 2008; arroz (Fang e Kao, 2000; Stein et al., 2008); *Spirodela polyrrhiza* (Xing et al., 2010) e para APX em milho (Kumar et al., 2008) e, principalmente nas raízes, pode ter sido a explicação para a redução na peroxidação de lipídios nesta parte da planta.

A peroxidase da glutathione (GPX), também, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, participando do sistema de defesa contra ROS utilizando a glutathione reduzida como substrato (Chaoui, et al., 1997). Nesse trabalho, essa enzima teve sua atividade diminuída com o aumento da concentração de Fe e com o período experimental (Figura 3ef). Sua atividade, entretanto, foi bastante baixa, na faixa de $nmol\ min^{-1}mg^{-1}$ de proteína, indicativo de pequena ou insignificante participação no combate as ROS. Segundo Caregnato et al. (2008) a atividade dessa enzima em resposta ao estresse induzido por metais seria dependente do metal, da espécie, do tecido afetado e de outras defesas antioxidantes que estariam envolvidos conjuntamente no mecanismo de desintoxicação.

Assim como as catalases, as peroxidases são bastante efetivas na via de captura do H_2O_2 dos tecidos vegetais produzido pela SOD (Asada, 1992) e a sua indução parece estar associada com a acumulação de peróxido de hidrogênio, em função do estresse oxidativo causado por agentes estressantes, como, por exemplo,

excesso de ferro. Essas enzimas, de modo geral, estão sendo associadas a mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas submetidas a diferentes tipos de estresse (Gaspar et al., 1986). El-Beltagi e colaboradores (2008) sugerem que as variações na atividade da POX poderiam ser utilizadas como bioindicador da intensidade do estresse uma vez que elas estariam envolvidas na resposta de plantas submetidas a uma variável gama de condições de estresse biótico e abiótico, incluindo a deficiência ou toxidez causada por diferentes metais (Passardi et al., 2004). Esta possibilidade parece ser viável no que concerne à toxidez de Fe uma vez que a atividade desta enzima é facilmente determinável, sua atividade é elevada e correlaciona-se bem com os níveis de Fe aplicados.

A redutase da glutathione (GR) é uma das enzimas-chave do ciclo ascorbato-glutathione, sendo sua participação nesse ciclo imprescindível para a manutenção da homeostase celular durante o estresse causado por ROS (Noctor e Foyer, 1998). A elevação da disponibilidade de Fe para as plantas resultou em aumento da atividade da GR, especialmente na concentração mais alta (Figura 4). Aumentos na atividade dessa enzima também foram encontrados por outros autores trabalhando com estresse por Fe em arroz (Majerus et al., 2007; Stein et al., 2008); níquel (Gomes-Júnior et al., 2006). Segundo Rover et al., (2001) a GR não age diretamente na remoção de ROS, porém, atua na regeneração de GSH, impedindo a paralisação do ciclo metabólico da glutathione. Dessa forma, o aumento observado na atividade desta enzima no presente experimento pode estar associado à manutenção da forma reduzida da glutathione (GSH) utilizada como substrato para sua incorporação em fitoquelatinas e/ou ser utilizada no ciclo ascorbato-glutathione para remoção de H_2O_2 ou na reciclagem da glutathione durante o estabelecimento de estresse oxidativo (Asada, 1999; Willekens et al., 1994).

Plantas expostas a condições de estresse oxidativo geralmente respondem com produção de metabólitos e aumento nas atividades de enzimas antioxidativas (Foyer et al., 1994). Segundo Pastori e Trippi (1992) a atividade da APX, na maioria das vezes, aumenta juntamente com a atividade de outras enzimas antioxidativas como a CAT, SOD e GR em resposta a vários fatores de estresses ambientais, sugerindo que os componentes de sistemas dissipadores de ROS são co-regulados. No presente estudo, o aumento na atividade SOD, nas plantas submetidas aos níveis tóxicos de Fe na solução nutritiva, foi acompanhado, de maneira geral, pelo aumento

nas atividades de CAT, POX, APX e GR, enzimas importantes envolvidas no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo provocado por esse metal. As respostas das várias enzimas antioxidativas obtidas no presente experimento são sugestivas da existência de uma participação conjunta delas no sentido de degradar as ROS produzidas durante o estresse a que as plantas foram submetidas com os tratamentos com concentrações elevadas de Fe. O papel destas enzimas na manutenção dos níveis de ROS dentro da normalidade em células é defendido por Valko et al. (2006). Grande parte da capacidade das plantas de *E. uniflora* tolerarem as elevadas concentrações de Fe, pelo menos durante o período experimental aplicado, portanto, pode ser atribuído à ativação das enzimas anteriormente mencionadas. Ao final do período experimental, contudo, foi constatado aumento significativo da peroxidação lipídica. Este aumento deve ter sido o resultado não apenas do aumento na atividade da SOD, mas, também, da redução nas atividades das enzimas CAT e POX, e especialmente da GPX. De modo geral, estas enzimas tiveram suas atividades diminuídas principalmente aos 45 DAT, mas no caso da GPX a redução na atividade ocorreu desde os 15 DAT e com intensidade crescente com as doses aplicada de Fe, indicando ter alta sensibilidade a níveis elevados deste elemento. Os resultados, portanto, indicam que o estresse causado pelo excesso de Fe na solução alterou o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as reações de defesa, favorecendo a produção de ROS, especialmente aos 45 DAT.

Além das atividades de enzimas antioxidativas, as plantas podem utilizar vários metabólitos antioxidativos, como por exemplo, ascorbato e glutathiona para a proteção das células contra os danos gerados durante o estresse oxidativo (Dipierro et al., 2005; Millar et al., 2003; Wang e Kao, 2007).

O ascorbato na sua forma reduzida (AA) é um dos mais importantes antioxidantes utilizado pelas plantas para a eliminação de ROS, apresentando importante papel na tolerância a estresses oxidativos (Dipierro et al., 2005; Horemans et al., 2000; Iqbal et al., 1996; Noctor e Foyer, 1998). O AA pode ser utilizado para eliminação de H₂O₂ por reação direta ou servindo de substrato para a APX (Chen e Gallie, 2004), resultando na oxidação do AA a DHA e, conseqüentemente, na redução do teor de AA nas células vegetais (Singh et al., 2006). As células, portanto, necessitam de um efetivo sistema de regeneração do ascorbato, fundamental na prevenção de danos oxidativos provocados por metais

(Sinhá e Saxena, 2006). No presente estudo, foi observado aumento dos teores de AA nas folhas nas doses de FeEDTA 1,0 e 2,0 mM, dependendo da época estudada (Figura 5a). Já nas raízes, tal aumento só ocorreu aos 15 DAT na dose de FeEDTA 2,0 mM. Nas demais épocas houve decréscimo ou manutenção desses teores com o aumento da concentração de Fe (Figura 5b). Aumento nos teores de AA tem sido sugerido como importante componente do mecanismo de tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo ferro em arroz (Majerus et al 2007), *Bacopa monnieri* (Sinhá e Saxena, 2006) e *Spartia densiflora* (Dominguez et al., 2009). Horemans e colaboradores (2000) mostraram que a concentração de AA aumenta em resposta à produção de ROS em plantas submetidas a condições de estresse e que este fato pode explicar muitas vezes a tolerância de diferentes espécies a diferentes tipos de estresse (Kampfenkel et al., 1995). Segundo Levitt (1980), o teor de ascorbato aumenta em situações de seca, excesso de sal e situações de estresse mecânico. Igualmente, age como um sistema antioxidante removendo oxi-radicais livres citotóxicos em vegetais expostos a poluentes gasosos e, desta maneira, confere estabilidade das membranas celulares à ação peroxidativa dos ROS (Iqbal et al., 1996; Pandey e Agrawal, 1994).

Os teores de AA encontradas nas folhas e raízes de *Eugenia uniflora*, de modo geral, aumentaram com a intensificação do tratamento com FeEDTA, indicando o estabelecimento de estresse oxidativo. Paralelamente, observou-se aumento na atividade da APX, enzima consumidora de AA. O aumento dos teores de AA, portanto, pode ser o resultado de maior aumento nas atividades das enzimas redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR) comparativamente ao aumento da atividade da APX, conforme sugerem Apel e Hirt (2004). Nie et al. (2007) trabalhando com plantas expostas a níveis elevados de molibdênio também observaram aumento no teor de AA apesar de ocorrido aumento na atividade da APX. Estes autores admitiram também ter ocorrido acréscimos nas atividades das enzimas MDHAR e DHAR. Estas duas enzimas atuam na regeneração do ascorbato reduzido (AA), partir dos subprodutos da utilização do AA, ou seja, MDHA e DHA (Drazkiewicz et al., 2003). As atividades destas enzimas, entretanto, não foram avaliadas neste trabalho.

Em plantas, o acúmulo de DHA pode ser resultado da maior oxidação do AA e/ou redução na atividade da enzima DHAR (Noctor e Foyer, 1998; Drazkiewicz et al., 2003). Portanto, para impedir o acúmulo de DHA no interior das células, as

plantas podem utilizar estratégias, como aumentar a atividade da enzima MDHAR, ou então promover conversão mais eficiente de DHA a ascorbato pela enzima DHAR (Aravind e Prasad, 2005). Nas folhas de *Eugenia uniflora*, o aumento na concentração de FeEDTA levou ao acréscimo no teor de DHA aos 15 DAT, seguido da diminuição aos 30 e 45 DAT (Figura 5c). Já nas raízes, esses teores diminuíram independente do tempo analisado. Esta redução no acúmulo de DHA nas folhas e raízes, provavelmente, é resultado do aumento na atividade da enzima MDHAR que impede a formação de DHA e, ou da enzima DHAR que consome o DHA como substrato direto em sua reação (Noctor e Foyer, 1998; Mittova et al., 2004).

A redução no teor de DHA e o aumento no teor de AA aos 45 DAT nas folhas e durante todo o período experimental nas raízes, principalmente após exposição a concentração de FeEDTA 2,0 mM contribuíram para aumentar a razão AA/DHA (Figura 5 e f). A relação AA/DHA é considerada importante indicador do estado redox das células e pode funcionar como um sistema tampão através do fornecimento de moléculas antioxidantes quando ocorrer estresse oxidativo, permitindo que níveis elevados de AA estejam disponíveis, protegendo assim, moléculas contra o ataque de ROS (Potters et al., 2002).

O tripeptídeo GSH, ao lado do ascorbato, é outro importante metabólito antioxidante solúvel em plantas (Alscher, 1989), podendo reagir quimicamente com ROS, principalmente o peróxido de hidrogênio ou servir como substrato da GPX, ou, ainda, participar da regeneração do ascorbato, no chamado ciclo ascorbato-glutationa (Eshdat et al., 1997; Noctor et al., 1998). Plantas, em geral, expostas a metais pesados sintetizam rapidamente o GSH para fazer frente ao estresse oxidativo (Schneider e Bermann, 1995). Nesse estudo, os teores de GSH nos tratamento com Fe foram sempre mais elevados que no controle (Figura 6a e b), indicando uma resposta adaptativa dessas plantas ao estresse oxidativo causado por Fe. Com o prolongamento do tempo de exposição das plantas ao Fe, especialmente na concentração de 1,0 mM, observou-se decréscimo gradativo nos teores de GSH. Alguns autores sugerem que esse decréscimo poderia ser devido ao uso deste metabólito na produção de fitoquelatinas ou na regeneração do ascorbato ou ainda na síntese de parede celular (Dixit et al., 2001; Beck et al., 2003; Mendoza-Cózatl e Moreno-Sanchez, 2006). Aumento nos teores de GSH parece estar envolvido na

tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo chumbo (El-Beltagi et al., 2010), ferro (Majerus et al., 2007) e níquel (Freeman, et al., 2004).

Em situações normais, a forma oxidada GSSG representa apenas pequena fração da glutathiona total (menos de 10%) (Anderson, 1985; Meister, 1988). Nesse estudo, os teores de GSSG foram mais elevados nas plantas tratadas com FeEDTA 1,0 mM, mas decresceram na dose de 2,0 mM, em relação ao controle (Figura c e d). Os incrementos nos teores de GSSG, entretanto, foram sempre menores do que os de GSH, resultando em aumento da relação GSH/GSSG, para todos os tempos de exposição estudados. Esta relação tem sido sugerida como um sensor redox em diferentes processos de transdução de sinais, atuando na eliminação do excesso de ROS produzido durante o estresse oxidativo (Foyer e Noctor, 2003; Mittler, 2002). O aumento nessa relação, conforme observado na dose de FeEDTA 2,0 mM tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 6e e f) resulta em um balanço positivo entre as atividades das enzimas GR (Apel e Hirt, 2004), γ -GCS e GSH-S (Ishikawa et al., 2006) em relação à atividade de enzimas consumidoras como a GPX, indicando que esse metabólito estaria diretamente envolvido no mecanismo de defesa das plantas como *Eugenia uniflora* submetidas ao estresse causado por Fe.

5. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho permitem concluir que:

- 1) O aumento da concentração de ferro na solução nutritiva produziu estresse oxidativo em *E. uniflora*, levando a um aumento da peroxidação de lipídios, principalmente nas folhas.
- 2) O estresse oxidativo em *E. uniflora* sob níveis tóxicos de Fe é atenuado tanto por mudanças nas atividades de enzimas antioxidativas quanto por mudanças nos teores de alguns metabólitos antioxidativos como AA e GSH.

- 3) As enzimas SOD, CAT, POX, APX e GR aumentaram suas atividades com o incremento nos níveis de Fe e, portanto, foram os mais importantes componentes do sistema enzimático de combate ao estresse oxidativo em *E. uniflora*.
- 4) Tanto os teores de AA e, ou DHA como os de GSH e, ou GSSG foram importantes na manutenção do estado de redox e no suprimento de substrato para enzimas antioxidativas em plantas *E. uniflora* sob toxidez de Fe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1331-1341, 2002.

ALSCHER, R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiologia Plantarum**, 77:457-464, 1989.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, 113:548-555, 1985.

ANDERSON, J.V., DAVIS, D.G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, 120: 421-433, 2004.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, 55: 373-399, 2004.

ARAVIND, P., PRASAD, M.N.V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:107-116, 2005.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85: 235-241, 1992.

ASADA, K. The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology**, 50: 601-639, 1999.

- AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C.E.B.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, 56: 87-94, 2006.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, 104: 280-292, 1998.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ORMAETXE, I. I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, 201: 137-147, 1998.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44: 276-287, 1971.
- BECK, A.; LENDZIAN, K.; OVEN, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Phytochelation synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. **Phytochemistry**, 62: 423-431, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.
- BRIAT, J.F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, 2: 187-193, 1997.
- BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. C.R. **Académie des Sciences**, Paris, 322 :43-54, 1999.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glicine max*). **Physiologia Plantarum**, 83: 463-468, 1991.
- CAREGNATO, F.F.; KOLLER, C.E.; MacFARLANE, G.R.; MOREIRA, J.C.F. The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Pollution Bulletin**, 56: 1119–1127, 2008.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, 113: 484-495, 1985.

- CARLI, V. G. **Avaliações fisiológicas, Bioquímicas e Histoquímica de *Ipomoea pès-caprae* cultivada em diferentes concentrações de ferro.** Dissertação de Mestrado (Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 47p., 2008.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in Enzymology**, 2: 764-775, 1955.
- CHAOU, A., MAZHOUDI, S., GHORBAL, M.H., EL FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, 127:139-147, 1997.
- CHATTERJEE, C.; GOPAL, R.; DUBE, B.K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, 108: 1-6, 2006.
- CHEN, Z., GALLIE, D.R. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. **Plant Physiology**, 142: 775-787, 2006.
- DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, 34: 1023-1028, 1993.
- DING, B.; SHI, G.; XU, Y.; HU, J.; XU, Q. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart) Griseb leaves to cadmium stress. **Environmental Pollution**, 147: 800-803, 2007.
- DIPIERRO, N.; MONDELLI, D.; PACIOLLA, C.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. **Journal of Plant Physiology**, 162: 529-536, 2005.
- DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea. **Journal of Experimental Botany**, 52: 1101-1109, 2001.
- DOMÍNGUEZ, D.M.; , SANTIAGO, R.T.; GARCÍA, F.C. Modulation of the antioxidative response of *Spartina densiflora* against iron exposure. **Physiologia Plantarum**, 136: 169-179, 2009.
- DRAZKIEWICZ, M.; SKORZNSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). **Plant Sci.** 164:195-202, 2003.

EL-BELTAGI, H.S.; MOHAMED, A.A. Changes in non protein thiols, some antioxidant enzymes activity and ultrastructural alteration in radish plant (*Raphanus sativus* L.) grown under lead toxicity. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, 38: 76-85, 2010.

EL-BELTAGI, H.S.; SALAMA, Z.A.; EL-HARIRI, D.M. Some biochemical markers for evaluation of flax cultivars under salt stress conditions. **Journal of Natural Fibers**, 5: 316-330, 2008.

ESHDAT, Y., HOLLAND, D., FALTIN, Z., BEM-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, 100:234-240, 1997.

FANG, W.C.; WANG, J.W.; LIN C.C.; KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in Rice leaves. **Plant Growth Regulation**, 35: 75-80, 2001.

FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess of iron, copper and zinc. **Plant Science**, 158: 71-76, 2000.

FOYER, C.H., HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**. 133:21-25, 1976.

FOYER, C.H., LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, 92: 696-717, 1994.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, 146: 359-388, 2000.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, 119: 355-364. 2003.

GHANATI, F.; MORITA, A.; YOKOTA, H. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. **Plant and Soil**, 276:133-141, 2005.

GIANNAKOULA, A., MOUSTAKAS, M., SYROS, T., YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, 67: 487-494, 2010.

GIANNOPOLTIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59: 309-314, 1977.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44: 420-429, 2006.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, 106: 207-212, 1980.

GUPTA, D.K.; NICOLOCO, F.T.; SCHETINGER, M.R.C.; ROSSATO, L.V.; PEREIRA, L.B.; CASTRO, G.Y.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of Hazardous Materials**, 172: 479-484. 2009.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, 219: 1-14, 1984.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125: 189-198, 1968.

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, 216: 541-551, 2003.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The method for growing plants without soil: water-culture. Berkeley: Univ. of California, 32p. **Circular of the Agricultural Experimentation Station**, 347. 1938.

HOREMANS, N.; FOYER, C.F.; POTTERS, G.; ASARD, H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38: 531-540, 2000.

IQBAL, M.; ABDIN, M.Z.; YUNUS, M.E AGRAWAL M.. Resistance mechanisms in plants against air pollution. IN: **Plant response to air pollution**. (M. Yunus; M. Iqbal., eds.). John Wiley e Sons. 1996.

ISHIKAWA, T., DOWDLE, J., SMIRNOFF, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiologia Plantarum**, 126:343-355, 2006.

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225: 165-167, 1995.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57: 315-319, 1976.

KUKI, K.N.; OLIVA, M.A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of the Total Environment**, 403: 207-214, 2008.

KUMAR, P; TEWARI, R.K.; SHARMA, P.N. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants. **Plant Cell Reports**, 27: 399-409, 2008.

LEVITT, J., **Responses of plants to environmental stresses: - water, radiation, salt and other stresses**. 2nd edition, vol.II. London: Academic Press. 1980.

LOPES, S.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A. Impacto das imissões de dióxido de enxofre e deposição de material particulado de ferro em espécies vegetais de restinga: avaliação ecofisiológica. In: Espíndola E.; Paschoal, C.; Rocha, O.; Bohrer, M.; Oliveira Neto, A. (eds.): **Ecotoxicologia**. RiMa Artes e Textos, São Carlos, pp. 53-71. 2000.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; SWENDEN, V.; FORTEMPS, A.; LOBREAUX, S.; LUTTS, S. Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. **Biologia Plantarum**, 51:303-312, 2007.

MENDOZA-CÓZATL, D.G., MORENO-SÁNCHEZ, R. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of Theoretical Biology*, 238: 919–936, 2006.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, 263:17205-17208, 1988.

MERIGA, B.; REDDY, B.K.; RAO, K.R.; REDDY, L.A.; KISHOR, P.B.K. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, 161: 63-68, 2004.

- MILLAR, A.H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J.L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. **Plant Physiology**, 133: 443-447, 2003.
- MITTOVA, V., GUY, M., TAL, M., VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Journal of Experimental Botany**, 55:1105-1113, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7: 405-408, 2002.
- MÖLLER, M.I.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 58: 459-481, 2007.
- NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, 22:867-880, 1981.
- NAGALAKSHMI, N., PRASAD, M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, 160:291-299, 2001.
- NEVES, N. R. **Respostas fisiológicas e antioxidativas em plantas de *Eugenia uniflora* L. submetidas ao excesso de ferro e chuva ácida.** Dissertação de mestrado, Viçosa: UFV, 37 p., 2004.
- NIE, Z.J., HU, C.X., SUN, X.C., TAN, Q.L., LIU, H.E. Effects of molybdenum on ascorbate-glutathione cycle metabolism in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). **Plant and Soil**, 295:13-21, 2007.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49: 249-79, 1998.
- NOCTOR, G., ARISI, A.C.M., JOUANIN, L., KUNERT, K.J., RENNENBERG, H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, 49:623-647, 1998.
- PANDEY, J.; AGRAWAL, M. Evaluation of air pollution phytotoxicity in a seasonally dry tropical urban environment using three woody perennials. **New Phytologist**. 126: 53-61. 1994.
- PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUMAND, C.; The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry**, 64: 1879-1893, 2004.

PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J., SANTANNA, R., MOSQUIM, P.R., MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11: 137-143, 1999.

PEREIRA, E.G; OLIVA, M.A.; KUKI, K.N., CAMBRAIA, J. Photosynthetic changes caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees- Structure and Functions**, 23: 2009.

POTTERS, G., DE GARA, L., ASARD, H., HOREMANS, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiology and Biochemistry**, 40:537-548, 2002.

REDDY, A.M.; KUMAR, S.G.; JYOTHSNAKUMARI, G.; THIMMANAIK, S.; SUDHAKAR, C. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and belgalgram (*Cicer arietinum* L.) **Chemosphere**, 60: 97-104, 2005

ROVER, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Química Nova**, 24: 112-119. 2001.

SANTOS, P. S.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; ALVES, P. C. C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica Biophysica Acta**, 1512: 357-366, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 101: 7-12, 1993.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **TRENDS in Plant Science**, 8: 188-193, 2003.

SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.273-279, 2000.

SINGH, S.; EAPEN, S.; D`SOUZA, S.F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, 62: 233-246, 2006.

SINHÁ, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 38: 286-291, 1997.

SINHÁ, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, 62: 1340-1350, 2006.

SOUZA-SANTOS, P.; RAMOS, R.S.; FERREIRA, S.T.; CARVALHO-ALVES, P.C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1512: 357-36, 2001.

STEIN, RR.J.; DUARTE, G.L.; SPOHR, M.G.; LOPES, S.I.G.; FETT, J.P. Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**. 154: 269-277, 2008.

VANSUYT, G.; LOPES, F.; INZÉ, D.; BRIAT, J. F.; FOURCROY, P. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. **FEBS Letters**, 410: 195-200, 1997.

XING, W; LI, D; LIU, G. Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48: 873-878, 2010.

WANG, J.W., KAO, C.H. Protective effect of ascorbic acid and glutathione on AlCl₃-inhibited growth of rice roots. **Biologia Plantarum**. 51:493-500, 2007.

WILLEKENS, H.; CHAMMONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; CAMP, W.V. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. **EMBO Journal**, 16: 4806-4816, 1997.