

VIVIANE GUZZO DE CARLI

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICA
DE *Ipomoea pes-caprae* CULTIVADA EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FERRO

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título de
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

T

C282a Carli, Viviane Guzzo de, 1983-
2008 Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de
concentrações *Ipomoea pes-caprae* cultivada em diferentes
de ferro / Viviane Guzzo de Carli. – Viçosa, MG, 2008.
vi, 48f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marco Antonio Oliva Cano.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 43-48.

1. *Ipomea pes-caprae*. 2. Ferro. 3. Testes de toxicidade.
4. Fluorescência. 5. Histoquímica. 6. Fotossíntese.
7. Enzimas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.94

VIVIANE GUZZO DE CARLI

AVALIAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICA
DE *Ipomoea pes-caprae* CULTIVADA EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE FERRO

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

Aprovada: 11 de julho de 2008

Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Andréa Miyasaka de Almeida
(Co-orientadora)

Dr. Rogério Ferreira Ribas

Dr^a Kacilda Naomi Kuki

Marco Antonio Oliva Cano
(Orientador)

Aos grandes amores da
minha vida: meus pais
Walter e Vera, minha irmã
Tatiane e meu sobrinho
Filipe

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela presença constante. Obrigada meu Senhor por iluminar meus passos e me sustentar nos momentos difíceis;

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de aprendizado e realização do curso;

Ao programa de Pós-graduação em Botânica e ao professores pelos ensinamentos e contribuições a longo do curso;

Ao professor Marco Antonio Oliva pela preciosa orientação, paciência e atenção;

Às minhas co-orientadoras Luzimar Campos da Silva e Andréa Miyasaka de Almeida, pelas preciosas sugestões e colaboração dada para a realização deste trabalho;

Ao Rogério Mauro Gomide e João Bosco Soares de Freitas pela grande contribuição prestada na realização deste trabalho ao longo destes dois anos;

Aos meus queridos amigos da Unidade de Crescimento de Plantas-UCP Cláudio Meira, Kacilda Kuki, Rosiane, Carol Miller, Letícia Costa, Clenilson, Michelle, Claudinei, Diego, Simone, Rogério Ribas, em especial Eduardo e Letícia dos Anjos sem os quais não conseguiria concluir este trabalho;

Aos amigos Advânio e Letícia Nalon que me ajudaram com a anatomia, Elaine Cabrini que pacientemente me ajudou nas análises de atividade enzimática;

Aos estagiários Pitt, Eduardo Almeida, Sabrina e Gustavo pela ajuda e carinho;

Às amigas Joyce e Íria Karla, pelo carinho e apoio; que mesmo distantes sempre estiveram presentes em minha vida;

Aos demais amigos pela agradável convivência nestes dois anos, em especial, aos amigos Thiago Coser, Giselle Camargo, Carla Quinhones, Marina Delgado Neves, Cristina Marinho, Tatiane Araújo, Leonor, Elisa e Laíse;

Às meninas da república, Giselli, Yasmin, Fernanda e Larissa pelo carinho, apoio e paciência;

Aos meus pais Walter e Vera e minha irmã Tatiane, pelo amor, carinho, apoio e compreensão ao período distante;

Ao meu namorado Everton, pelo amor, paciência e pelos momentos de descontração que fizeram toda a diferença nesta etapa.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
Introdução	7
Materiais e Métodos.....	12
<i>Determinação de ferro na matéria seca</i>	12
<i>Detecção histoquímica do ferro</i>	13
<i>Fluorescência da clorofila a</i>	13
<i>Imagem da Fluorescência da clorofila a</i>	13
<i>Trocas gasosas</i>	14
<i>Teores de pigmentos: Cloroplastídicos</i>	14
<i>Concentração de Malonaldeído (MDA)</i>	14
<i>Atividade de enzimas antioxidativas</i>	15
<i>Teste estatístico</i>	16
Resultados	17
Discussão	34
Conclusões	42
Bibliografia	43

RESUMO

CARLI, Viviane Guzzo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de *Ipomoea pes-caprae* cultivada em diferentes concentrações de ferro.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Co-orientadoras: Luzimar Campos da Silva e Andréa Miyasaka de Almeida.

Plantas de *Ipomoea pes-caprae*, espécie da restinga, foram cultivadas com objetivo de avaliar os efeitos da absorção de ferro quando oferecido em excesso. Plantas com três pares de folhas foram submetidas a doses de 2, 3, 4 e 5mM de Fe-EDTA em solução de Hoanglad meia força. Após sete dias foram avaliados o acúmulo de ferro nos tecidos, as alterações no teor de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides, a fluorescência da clorofila *a*, as trocas gasosas e o estresse oxidativos. Ocorreram sintomas visuais na lamina foliar 48h após aplicação do tratamento. O ferro foi absorvido e acumulado nas raízes e folhas, alcançando valores fitotóxicos na primeira dose. O acúmulo de ferro foi localizado histoquimicamente em todos os tecidos das raízes e folhas. Ocorreram alterações significativas nos valores de fluorescência da clorofila *a*, na atividade enzimática da superóxido dismutase, peroxidases, e peroxidase do ascorbato e nas concentrações de malonaldeído, o que indica a ocorrência de estresse oxidativo. Foram verificadas reduções significativas de 67,3% da clorofila *a*, 64% da clorofila *b* e 48,9% dos carotenóides. As alterações do teor de clorofila e fluorescência da clorofila *a* tiveram início em doses superiores a 2mM. As trocas gasosas foram alteradas em todas as concentrações de ferro, a fotossíntese reduziu 87%, a condutância estomática 63% e a razão Ci/Ca obteve acréscimo de 22%. A redução da fotossíntese em 50% ocorreu com menor quantidade de ferro total nas folhas quando comparada a condutância estomática, teor de clorofila *a* e taxa de transporte de elétrons, que apresentaram redução com dose de ferro nas folhas superior a necessária para reduzir a fotossíntese. É possível inferir que, *Ipomoea pes-caprae* mostrou-se susceptível ao ferro nas doses superiores a 2 mM e a sensibilidade dos parâmetros avaliados podem ser potenciais biomarcadores de risco ambiental.

ABSTRACT

CARLI, Viviane Guzzo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Physiological, biochemical and histochemical evaluations of *Ipomoea pes-caprae* cultivated at different concentrations of iron.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Co advisors: Luzimar Campos da Silva and Andréa Miyasaka de Almeida.

The aim of this study was to evaluate the effects of excess iron over *Ipomoea pes-caprae*, a native species common to Restinga. Saplings presenting three pairs of leaves were grown under 2, 3, 4 and 5 mM Fe-EDTA concentrations in Hoagland solution at half strength. After seven days, it was evaluated the accumulation of iron in plant tissues, alterations in the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids, in fluorescence of chlorophyll *a* and gas exchanges parameters and the development of oxidative stress. After 48 hours there were visual symptoms on leaves. The iron was absorbed and accumulated in roots and leaves, reaching phytotoxic values under the lowest iron concentration. The accumulation sites of iron were identified histochemically in roots and leaves tissues. Significant alterations were observed for fluorescence parameters, for enzymatic activity of peroxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase and malondialdehyde concentration, indicating the development of oxidative stress. There were also significant reductions of 67.3% in the content of chlorophyll *a*, 64.0% in chlorophyll *b* and 48.9% in carotenoids. The alterations observed in chlorophyll content, as well as in fluorescence of chlorophyll *a* parameters, were obtained at concentrations above of 2 mM Fe-EDTA. On the other hand, gas exchanges parameters were affected under all iron concentrations. The assimilation of CO₂ decreased 87%, the stomatal conductance 63% and the ratio *Ci/Ca* decreased 22%. The 50% reduction of photosynthesis was reached at lower concentration, in comparison to stomatal conductance, chlorophyll content and electron transport rate, which presented reductions at higher concentrations. It can be concluded that *Ipomoea pes-caprae* showed to be sensitive to iron in concentrations above 2 mM and that the parameters evaluated in this studies may be potential tools as biomarkers of environmental hazards.

1-Introdução

A Restinga ocorre em solo arenoso e pobre em nutrientes, sua vegetação pode ser distribuída em mosaico, ocorrendo em áreas com grande diversidade ecológica, na qual estão presentes as Halófitas, Psamófila Reptante, Pós-Praia, Palmae, Mata de Myrtaceae, Mata Seca, Brejo Herbáceo, Floresta Periodicamente Inundada, Floresta Permanentemente Inundada, Restinga Aberta de Ericaceae e Formação Aberta de *Clusia* (Pereira, 1990).

Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br., da família Convolvulaceae, conhecida popularmente como salsa-da-praia, apresenta uma ampla distribuição ao longo das praias tropicais e subtropicais das Américas do Norte e Sul. No Brasil, ocorre frequentemente ao longo de todo litoral, desempenhando papel importante na fixação da duna arenosa (Cordazzo *et al.*, 2006).

No estado do Espírito Santo a vegetação de Restinga encontra-se reduzida a fragmentos, os quais estão constantemente ameaçados pela urbanização e avanços industriais (Silva & Azevedo, 2007). Em virtude da expansão do setor minerador de beneficiamento de minério de ferro junto a fragmentos de restinga, torna-se necessária a realização de estudos visando avaliar o impacto desta atividade na dinâmica e na composição florística deste ecossistema. O material particulado de ferro originado pela atividade do setor minerador pode afetar as plantas diretamente por meio de sua deposição sobre a lâmina foliar, ou indiretamente através da sua incorporação a níveis supra-ótimos na solução do solo. Os efeitos da deposição do material sólido particulado de ferro (MSP_{Fe}) podem ser agravados pela ocorrência de precipitações ácidas. O decréscimo de uma unidade do pH do solo promove a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} aumentando as concentrações de ferro solúvel em até 1000 vezes e tornando-o mais disponível para as plantas (Lindsay, 1972; Gallego *et al.*, 1996; Grantz *et al.*, 2003; Oliva *et al.*, 2005).

Como micronutriente essencial às plantas, o ferro é requerido em baixas concentrações, sendo essencial em processos fundamentais no seu desenvolvimento, como fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio, síntese de DNA, formação de hormônios, síntese de clorofila e manutenção do cloroplasto (Briat & Lobréaux, 1997; Larcher 2000). A importância do ferro em vários mecanismos biológicos supracitados, pode ser explicada pelo fato deste elemento, em pH fisiológico existir sob dois estados redox (ferroso, Fe^{2+} , ou férrico, Fe^{3+}) que permite sua participação em numerosas reações que envolvem transferências de elétrons (Becana *et al.*, 1998).

As plantas apresentam duas estratégias para absorção do ferro sob condições diferentes do solo. A estratégia I, que envolve a exsudação de prótons, quelados orgânicos e de fenólicos das raízes para a rizosfera, levando à acidificação do solo e ao aumento da solubilidade do Fe^{3+} . O íon férrico associado a esses quelantes é reduzido à Fe^{2+} , pela enzima redutase férrica presente na membrana das células epidérmicas das raízes, e absorvido por um transportador específico Iron Regulated Transporter - IRT1. No córtex, após sua absorção, o ferro é translocado até o xilema via plasmodesmos. Outra forma de absorção do ferro é denominada estratégia II, que envolve a liberação de fitossideróferos que quelam o Fe^{3+} na rizosfera. O complexo fitossideróforo- Fe^{3+} é absorvido pelo transportador específico da família *Yellow Stripe Like* (YSLs) sem necessidade de redução extracelular (Curie *et al.*, 2001). Após a absorção, o ferro é liberado do complexo fitossideróforo e carregado via xilema até a parte aérea através do fluxo transpiratório. Quando liberado no xilema, o ferro apresenta-se oxidado, sendo transportado até a parte aérea na forma de complexos orgânicos especialmente o citrato, que é considerado o principal quelante de metais no xilema (Tiffin, 1966; Marschner *et al.*, 1986; Curie & Briat, 2003).

A absorção do ferro pelas células do mesofilo, também requer uma etapa de redução após a liberação do íon férrico pela molécula de citrato. (Curie & Briat, 2003). Sua solubilização e o transporte a longa distância entre os órgãos e os tecidos, assim como a sua compartimentalização, envolve várias etapas de quelação, oxidação/redução e associação com proteínas que o armazenam. Devido à alta reatividade do ferro com compostos orgânicos, as plantas apresentam concentrações citosólica estáveis deste mineral. Isto é alcançado através de um controle delicado entre a sua absorção, compartimentalização e o armazenamento (Briat *et al.*, 1995; Briat *et al.*, 2007). O ferro pode ser armazenado em uma proteína especializada denominada ferritina, capaz de acumular 4500 átomos de ferro em sua cavidade central, em uma forma biodisponível não tóxica. Nas plantas, 40% do ferro absorvido são armazenados nos tilacóides, mas pode ser acumulado no vacúolo, plastídios e mitocôndria. Os aparatos fotossintéticos contêm 21-22 átomos de ferro para o transporte de elétrons em vários grupos heme e [Fe-S], sendo crucial para atividade fotossintética (Briat *et al.*, 1995; Briat *et al.*, 2007). Contudo, condições ambientais adversas podem interferir em sua homeostase, tornando-se um elemento potencialmente prejudicial ao desenvolvimento e produtividade das plantas, levando a uma diversidade de sintomas morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.

O surgimento de manchas marrons nas folhas, muitas vezes formando necroses e o escurecimento da raiz são sintomas característicos de toxidez em diversas espécies expostas ao excesso deste elemento (Kim & Jung, 1993; Kampfenkel 1995; Suh *et al.*, 2002; Neves, 2004; Chattejee *et al.*, 2006). Em estudos recentes, a histoquímica tem sido empregada para caracterizar o tempo, direção da deposição e distribuição do ferro nos tecidos (Krishnan, 2003; Sivaprakash *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006).

Os estudos direcionados para a influência da poluição nas plantas, notadamente no que concerne ao processo fotossintético, referem-se à limitação da fotossíntese e fluorescência pela clorofila *a*. A fotossíntese é sensível a agentes poluentes e sua redução tem sido constatada em plantas ocorrentes ou introduzida em ambientes poluídos (Inoue & Reissmann, 1994).

As espécies de restinga *Sophora tomenstosa*, *Mimusopsis coreacea*, *Schinus terbenthifolius* e *Eugenia uniflora* presentes em áreas onde ocorre o incremento do ferro a partir de uma fonte externa, apresentaram alterações na assimilação de CO₂ em altas concentrações de ferro absorvida (Oliva *et al.*, 2005).

Dentre as alterações mais marcantes verificadas nas plantas expostas às altas concentrações de ferro, destacam-se as observadas na fotossíntese, na redução clorofila e na inibição do crescimento, capaz de afetar não só a sobrevivência de algumas espécies, mas também a biodiversidade do ecossistema (Briat & Lobreaux, 1997; Larcher, 2000; Suh *et al.*, 2002; Briat *et al.*, 2007).

A redução da taxa fotossintética pode ocorrer em detrimento às modificações de outros processos fisiológicos que são afetos pelo alto teor de ferro nos compartimentos celulares, como redução da clorofila *a*, movimento estomático e alterações na atividade da RUBISCO. A degradação da clorofila, por sua vez, pode ser consequência de estresse oxidativos produzidos pelo excesso de íons férrico livres após a absorção (Sinha *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998). Além disso, o estresse oxidativo produzido pelo Fe²⁺ pode reduzir a atividade da RUBISCO ou até mesmo degradá-la (Kim & Jung, 1993; Möller *et al.*, 2007), diminuindo assim a assimilação de CO₂. Esta limitação na fixação de carbono pode acarretar uma forte redução da cadeia transportadora de elétrons causada pelo decréscimo da regeneração de NADP⁺ (Edreva, 2005).

Vários estresses ambientais podem provocar alterações restritivas ao processo de absorção da energia pelas moléculas de clorofila. O uso de medidas de

fluorescência da clorofila *a* associada ao fotossistema II (PSII) é uma forma eficiente e não destrutiva para monitorar funcionamento do PS II que é um sinalizador muito sensível para indicar estresses ambientais em plantas (Lemos-Filho, 2000).

O inadequado fluxo de elétrons na presença de altas doses de ferro nas células pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio, levando a danos nas membranas dos cloroplastos. Além disso, como consequência do excesso de energia ocorre à dissipação através do calor ou em emissão de fluorescência (Sinha *et al.*, 1997; Estevez, *et al.*, 2001)

Os mecanismos pelo qual o excesso de ferro pode afetar os movimentos estomáticos não são conhecidos. Entretanto, sabe-se que o excesso de íons Fe^{2+} pode promover a inibição da H^{+} -ATPase das membranas celulares (Zocchi & Cocucci, 1990; Souza-Santos *et al.*, 2001). Com a inibição desta proteína das membranas estomáticas, não ocorreria o transporte de prótons para o meio externo das células guarda, nem abertura do canal de K^{+} , fenômeno responsável pela abertura estomática, o que causaria uma redução na taxa fotossintética, devido à limitação do influxo de CO_2 .

O ferro livre nos sistemas biológicos apresenta baixa solubilidade e pode reagir com o oxigênio originando espécies reativas de oxigênio (EROs) (Curie & Briat, 2003; Zancani *et al.*, 2004). O estresse oxidativo causado pelo seu excesso na solução do solo pode ocasionar perdas no nível de produtividade das plantas, especialmente em solos ácidos das regiões tropicais e subtropicais. Em níveis tóxicos esse elemento pode levar a um potencial estresse oxidativo, como consequência da sua alta capacidade oxido-redutora, gerando espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton, componente do ciclo de Haber-Weiss (Becana *et al.*, 1998; Kampfenkel *et al.*, 1995; Gallego *et al.*, 1996; Edreva, 2005). O Fe^{2+} promove a conversão do H_2O_2 em $\text{OH}^{\bullet}$. A atuação destes radicais livres juntamente com outros intermediários de oxigênio pode causar danos irreversíveis às membranas celulares, ocasionando peroxidação dos lipídios o que implica em alterações na estrutura das membranas, modificando atividades enzimáticas, perda da permeabilidade seletiva possibilitando assim, vazamento de eletrólitos e conseqüente colapso celular e deterioração do tecido, fenômeno denominado estresse oxidativo (Vansuy, 1997; Sinhá, 1997; Becana *et al.*, 1998; Souza-Santos *et al.*, 2001; Connolly & Guerinot, 2002).

A proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo ferro nas plantas pode ser feita por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Vansuyt *et al.*, 1997). Enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX) atuam na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Compostos orgânicos como a glutatona, carotenóides, α -tocoferóis, ácidos úrico, ácido lipóico e ubiquinol compõem o sistema não-enzimático para a neutralização de EROs (Sinha *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998).

Os dados existentes sobre efeitos da poluição em plantas tropicais são ainda escassos. Estudos visando compreender os mecanismos de absorção e locais de acúmulo de ferro na planta auxiliam a identificar parâmetros de biomarcação em espécies tropicais que poderão ser empregadas na avaliação de impacto ambiental causado por MPS_{Fe} . O presente trabalho foi desenvolvido utilizando-se espécie vegetal que ocorre na restinga do Espírito Santo, em cuja região está situada uma usina de grande porte de beneficiamento de minério de ferro, responsável pelo incremento deste metal no ambiente.

Estudos prévios (Kuki *et al.*, 2008) ratificaram que a espécie *I. pes-caprae* demonstrou-se resistente à tratamentos com ferro em solução nutritiva na dose máxima de 1mM. Sendo assim, este estudo propõe utilizar doses de ferro superiores a 1 mM, com o propósito de avaliar os efeitos deste metal em níveis tóxicos nos processos relacionados à fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, atividades de enzimas antioxidativas e o seu acúmulo nos diferentes tecidos de *Ipomoea pes-caprae*.

2. Material e Métodos

Plantas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae) foram obtidas por propagação vegetativa por meio de estaquia de mudas de um indivíduo, provenientes do Parque Estadual Paulo César Vinha, localizado no município de Guarapari, no Espírito Santo. Depois de enraizadas e apresentando três pares de folhas, as plantas foram transferidas para isopor contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Aron, 1938) a meia força iônica em pH 6,0. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

As plantas foram submetidas gradativamente a diferentes concentrações de Fe^{2+} na solução nutritiva constantemente aerada, permanecendo em casa concentração por um período sete dias. O FeSO_4 foi aplicado na forma Fe-EDTA (0, 2; 3; 4 e 5 mM). O controle constou da solução de Hoagland contendo 0,001 mM de Fe-EDTA. A solução foi substituída semanalmente. As avaliações foram realizadas em folhas fisiologicamente maduras entre o terceiro ou o quarto nó.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições e uma planta por vaso como unidade experimental. O experimento teve duração total de dois meses, de novembro a dezembro de 2007. Desde a produção das estaquias até as avaliações realizadas.

Determinação do teor ferro

Para determinação do teor de Fe, foi coletado raiz, caule e folha de *I. pes-caprae*, o material fresco foi colocado em estufa para secagem a 75°C até atingir peso constante e reduzido a partículas com dimensões menores que 1 mm. Quinhentos miligramas do material seco e moído foram digeridos em 10 ml de solução nítrico-perclórica (3:1) a uma temperatura de 200°C e o Fe no extrato mineral determinado por espectrofotometria de absorção atômica (GBC Avanta-CBC Scientific Equipment Ltd, Australia) (Kampfenkel *et al.*, 1995). As raízes foram lavadas com água corrente, água desionizada e solução de EDTA (50 mM) para garantia da total remoção do material particulado depositado externamente.

Detecção histoquímica do ferro

Para detecção histoquímica do ferro, foram coletadas amostras da raiz na zona de ramificação e do terço médio das folhas localizadas no terceiro ou quarto nó. As amostras foram fixadas em Karnovsky em tampão cacodilato pH 7,2 (Karnovsky, 1965). Cortes transversais feitos em micrótomo de foram submetidos a uma solução constituída de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico a 4% (Bancroft *et al.*, 1996). Após 48 horas, os cortes foram lavados em água destilada e montados em água glicerizada e fotografados em fotomicroscópio (OLYMPUS AX70) equipado com sistema U-photo. A reação foi considerada positiva nas regiões dos cortes que apresentaram coloração azul, característico do azul de Prússia. Um controle negativo, chamado de branco do teste, sem o reagente específico foi desenvolvido em paralelo.

Fluorescência da clorofila a

Nas folhas entre o terceiro e quarto nó foram realizadas medições nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, com o auxílio de um fluorômetro modulado (Mini-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH). Foram determinados a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos, rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F'_m$) obtida por um pulso saturante de luz azul ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção (q_N). As avaliações foram realizadas logo após as análises de trocas gasosas. A fluorescência da clorofila *a* foi determinada na região mediana em folhas maduras fisiologicamente de 8:00 às 10:00 h nas mesmas folhas que foram utilizadas para as análises de troca gasosa.

Fluorescência da clorofila a

Os dados de fluorescência da clorofila *a* foram adquiridos por meio de imagens de fluorescência, obtidas com fluorômetro de imagem modelo IMAGING-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Para uma máxima resolução espacial (640x480 pixels), as medidas foram realizadas com uma distância mínima entre a câmara (CCD) e a folha, o que corresponde uma imagem com área de 17 x 22 mm. Após período de adaptação ao escuro, as imagens de fluorescência mínima (F_0), obtida pela aplicação

de pulsos de luz de baixa intensidade (1 Hz) e de fluorescência máxima (Fm), obtida por um pulso saturante de luz azul (504 nm) de alta intensidade (10 Hz), foram determinadas e utilizadas para o cálculo do rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm). Em todos os casos as imagens e os valores dos parâmetros de fluorescência foram avaliados com a ajuda de uma escala de cores variando de 0.000 (preto) a 1.000 (rosa).

As porcentagens das áreas afetadas para cada parâmetro da imagem da fluorescência foram determinadas pelo programa Imaging Win v.2.25. As cores das imagens da clorofila *a*, foram definidas pela carta de Munsell programa Munsell Conversion 8.0.3.

Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados na região mediana em folhas maduras fisiologicamente entre o terceiro e quarto nó, período de 8:00 às 10:00 h. A fotossíntese (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*) e a razão *C_i/C_a* (concentração interna/atmosférica de CO₂) foram avaliados com auxílio de um analisador de gás no infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). A intensidade luminosa utilizada foi de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Teores de pigmentos: Cloroplastídicos

Os teores de pigmentos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram determinados com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Três discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes contendo 7 ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Após 48 horas, as absorbâncias do extrato foram lidas em uma espectrofotômetro (U – 2000 UV/Vis-Hitachi Ltd, Japan) e a concentração de pigmentos foram determinados segundo Wellburn (1994).

Concentração de Malonaldeído (MDA)

A concentração de malonaldeído (MDA) foi determinada em cerca de 200 mg de tecido vegetal, macerado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos, coletando-se o sobrenadante. 500 μl do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em

TCA 20% e a mistura foi incubada à 90°C. Após 25 minutos a reação foi interrompida transferindo-se os tubos para o gelo e a absorbância foi lida a 532 e 600 nm. A absorbância de 600 nm foi subtraída da absorbância medida de 532 nm e a concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968).

Atividade de enzimas antioxidativas

As atividades das enzimas peroxidase, superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato foram determinadas em aproximadamente 0,2 g de tecido fresco de folhas adultas de *I. pes-caprae*. O material foi macerado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) em almofariz de porcelana. Após a centrifugação a 15.000 xg durante 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e utilizado nos testes enzimáticos. Todas as etapas de extração foram mantidas a 4°C.

A atividade da superóxido dismutase (SOD EC1.15.1.1) foi determinada pela adição de 150 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 ml do meio de reação constituído de metionina 13 mM, azul de r-nitro tetrazólico (NBT), 75 mM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 mM, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (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 recoberta com papel alumínio. A reação foi iniciada acendendo-se a lâmpada fluorescente e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis & Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação da absorvância a 560 nm, após subtração do “branco” no qual a mistura de reação foi mantida no escuro pelo mesmo tempo. A absorbância máxima, em decorrência da fotorredução do NBT, foi medida em meio de reação idêntico ao anterior, porém sem a adição do extrato enzimático bruto e mantido sob mesma iluminação. A atividade enzimática foi expressa em unidade SOD, que representa a atividade enzimática capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

A atividade da peroxidase (POX EC1. 11. 1. 7) foi determinada pela adição de 15 mL do extrato enzimático bruto a 2,985 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 & Mishra, 1976). O aumento na absorbância a 420 nm foi medido durante o primeiro minuto de reação e utilizado no cálculo da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1}$.

A determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) foi determinada pela adição de 150 μL do extrato enzimático bruto a 2,85 ml do meio de reação constituído de ascorbato 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, e determinou-se a atividade enzimática pelo decréscimo na absorbância a 290 nm à 25°C (Nakano & Asada, 1981; Koshiba, 1993).

Teste estatístico

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para estas análises foi utilizado o programa SAEG e para as análises de regressão foi utilizado o programa SigmaPlot 10.

3. Resultados

Sintomatologia e teor de ferro

As plantas de *Ipomoea pes-caprae* tratadas com Fe-EDTA em sistema hidropônico apresentaram os primeiros sintomas visuais após 48h da aplicação do tratamento. Nas primeiras 48h, as manchas apresentaram-se como pontos marrons (Figura 3) que evoluíram diretamente a necrose (Figura 6) sem o aparecimento de clorose. Os sintomas foram mais evidentes nas plantas expostas a doses de 4 e 5 mM (Figura 4 e 5) que apresentaram necroses bem acentuadas na lâmina foliar. No início do tratamento, as bordas das necroses eram mais difusas e ao final do sétimo dia estas tornaram-se mais delimitas. Os danos apareceram primeiramente nas margens das folhas avançando, ao longo dos dias, em direção à lâmina foliar. As plantas de todos os tratamentos mostraram cloroses venais. Nas plantas do tratamento 2 mM não foram observadas necroses, no entanto, nestas ocorreu escurecimento intervenal na lâmina foliar (Figura 2).

Desde o primeiro dia da aplicação do ferro, foi observado o escurecimento do sistema radicular.

A raiz, o caule e as folhas apresentaram um acúmulo diferenciado de ferro nos seus tecidos com aumento de Fe-EDTA na solução nutritiva. A maior parte do ferro foi acumulada na raiz e nas folhas, tendo o caule apresentado menor acúmulo deste elemento (Figura 2). Nas plantas expostas a 2 mM de Fe-EDTA ocorreu aumento na concentração de ferro na raiz em 33 vezes e nas folhas em torno de 7 vezes. O aumento diferenciado só voltou a ocorrer nas plantas com 5 mM.

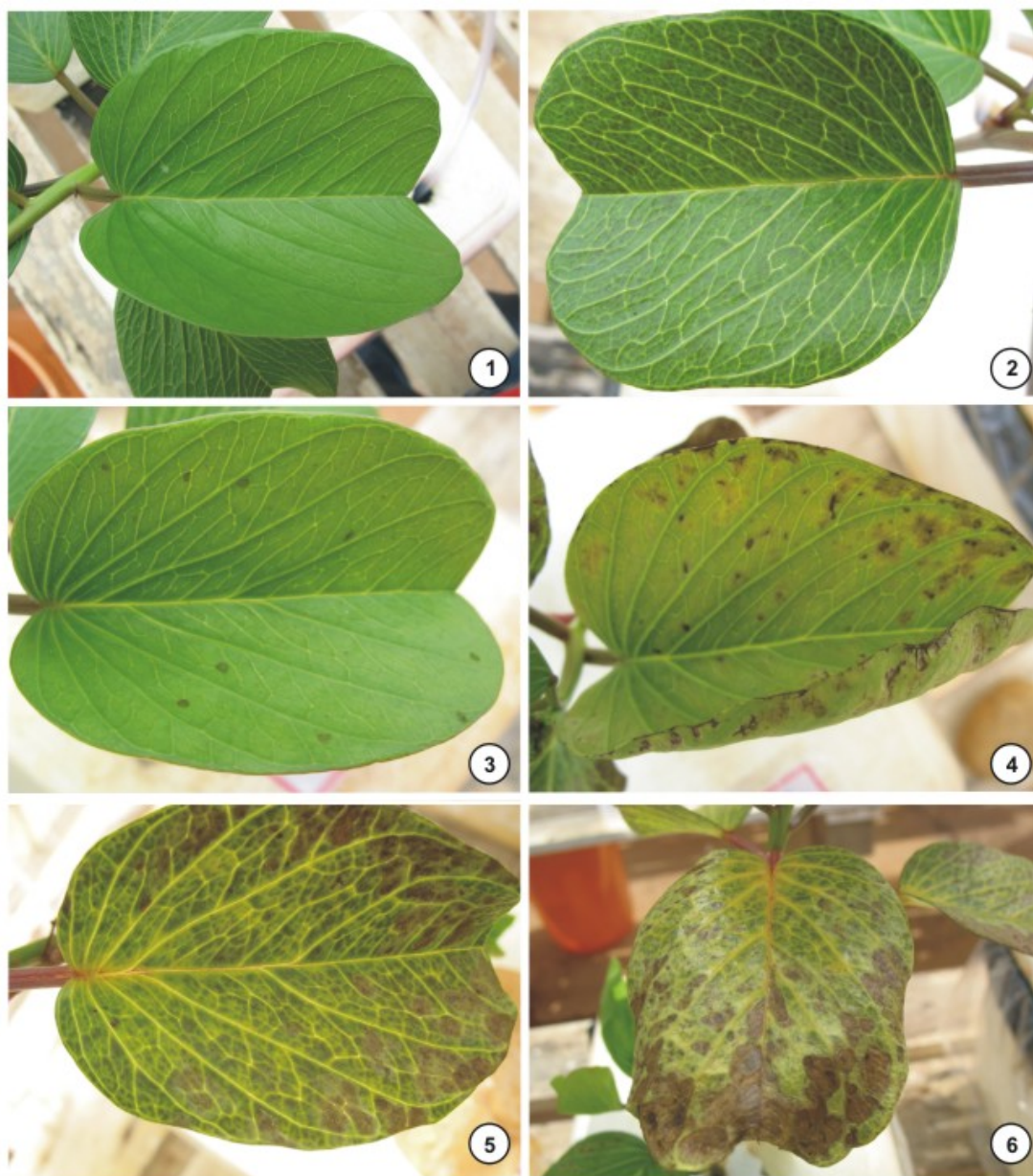


Figura 1-6. Plantas de *Ipomoea pes-caprae* cultivadas em sistema hidropônico com solução de Hoanglad. 1: Controle (0 mM) de Ferro; 2: dois dias após tratamento com 2 mM de Fe-EDTA; 3: dois dias após o tratamento com 5 mM de Fe-EDTA; 4: quatro dias após o tratamento com 4mM de Fe-EDTA; 5 e 6: quatro dias após tratamento com 5 mM de Fe-EDTA.

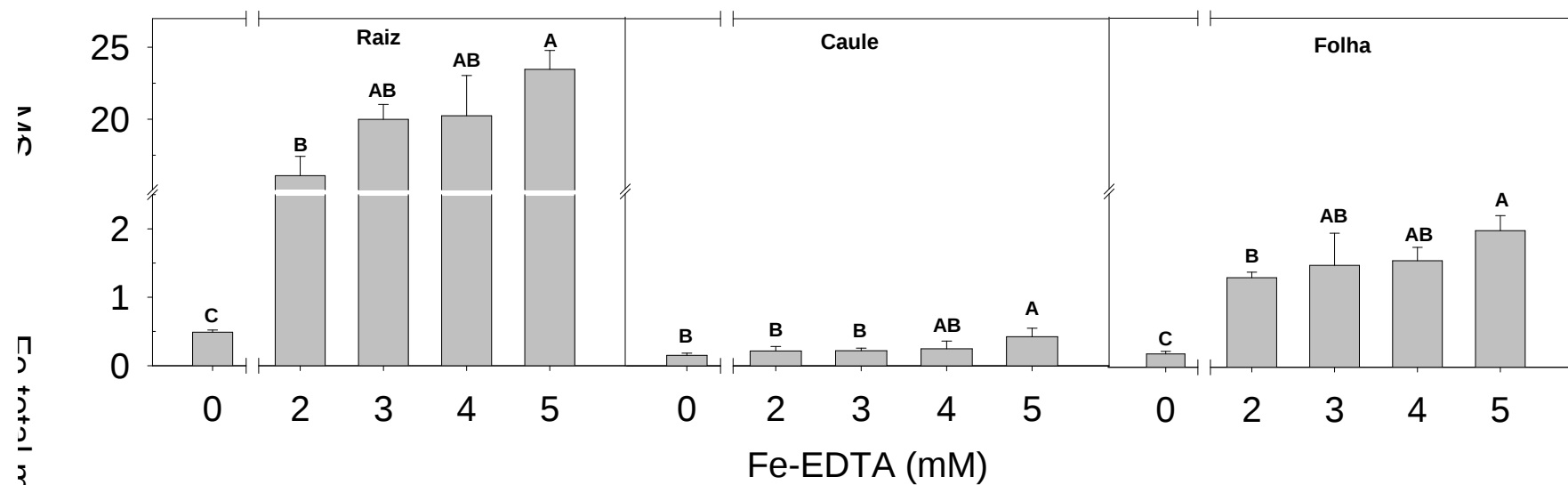
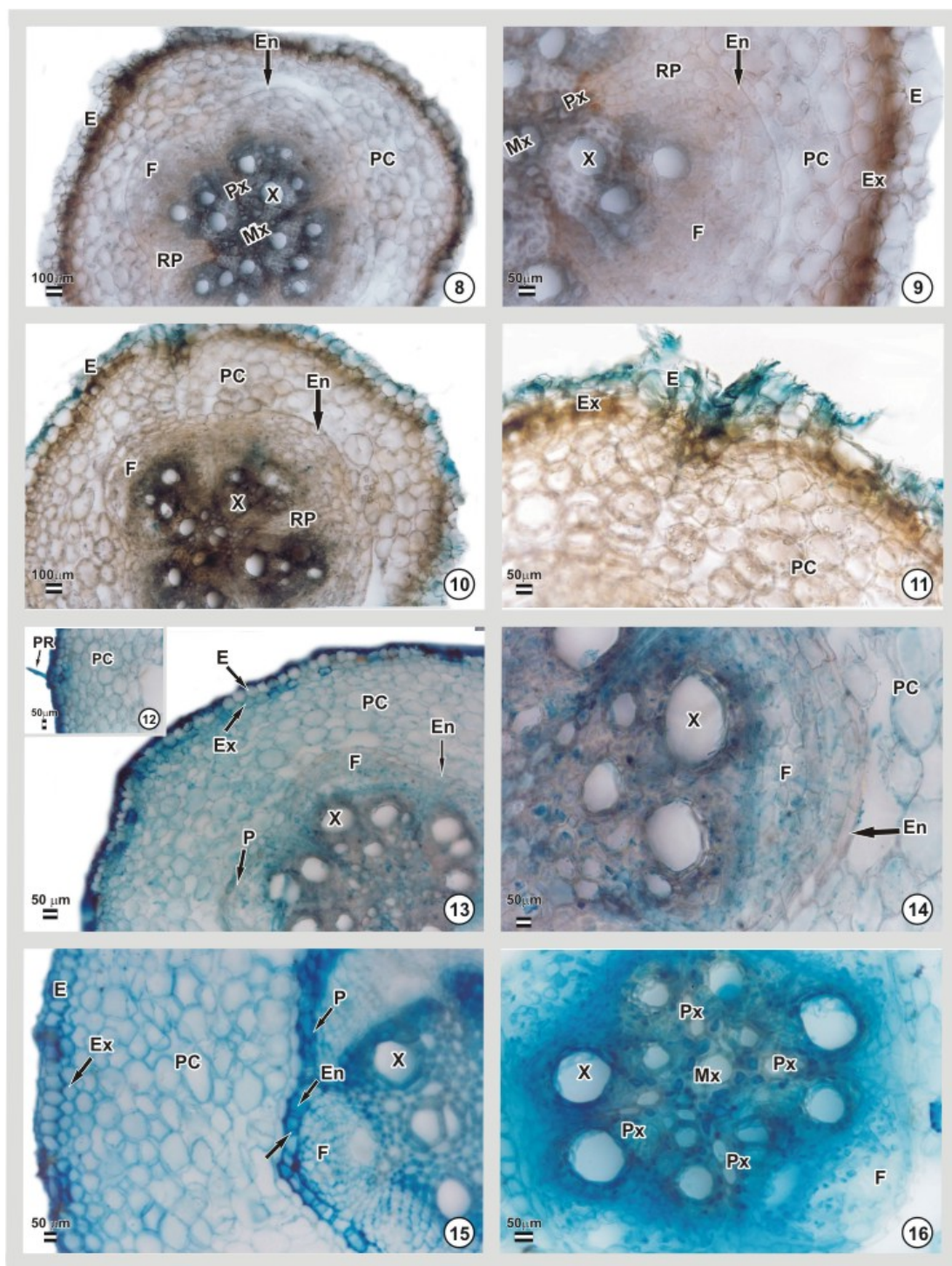


Figura 7- Teor de ferro total na raiz, caule e folha de *Ipomoea pes-caprae* após sete dias cultivadas em hidroponia nas concentrações de 0, 2, 3, 4 e 5 mM de Fe-EDTA. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade nas diferentes concentrações de ferro em cada órgão da planta.

Caracterização anatômica e detecção histoquímica de ferro na raiz

A raiz de *Ipomoea pes-caprae* possui uma epiderme uniestratificada (Figuras 8 e 9), com pêlos radiculares (Figura 12). O Córtex, que corresponde à região compreendida entre a epiderme e o cilindro vascular, é constituído pela exoderme abaixo da epiderme (Figura 9), 12 a 15 camadas de células parenquimáticas formando o parênquima cortical (Figura 8 e 9) e pela endoderme, com células compactas que apresentam estrias de Caspary (Figura 15). O cilindro vascular é formado pelo periciclo uniestratificado e apresenta início de crescimento secundário (Figura 8). São observados quatro pólos de protoxilema ladeados ao xilema secundário, com o câmbio vascular separando-o do floema (Figura 8).

Em todos os cortes da raiz das plantas expostas a 2 e 5 mM de Fe-EDTA pôde-se verificar depósito de ferro nos tecidos. As raízes das plantas expostas a 2 mM (Figuras 13 e 14) mostraram reação menos intensa que as expostas a 5 mM (Figuras 15 e 16). Observou-se reação positiva para o ferro na epiderme (Figuras 13 e 15), no pêlo radicular (Figura 12), nas células do parênquima cortical (Figuras 13-15), na exoderme (Figuras 13 e 14) no xilema (Figura 16) e no floema (Figura 15) em comparação às plantas do controle, que mostraram reação positiva apenas na epiderme (Figuras 10 e 11) quando comparadas aos cortes sem reação (controle negativo) (Figuras 8 e 9). A endoderme das plantas expostas a dose de 2 mM (Figura 14) não apresentaram reação bem evidenciada como a endoderme das plantas expostas a 5 mM ferro (Figura 15).



Figuras 8 a 16. Detecção de ferro (cortes transversais) de raízes de *Ipomoea pes-caprae* com azul de Prússia. Figuras 8-9- Controle negativo-Figuras 10-11- Plantas controle (0 mM). Figuras 12-14- Raízes cultivadas em 2 mM de Fe-EDTA. Figuras 15-16- Raízes cultivadas em 5 mM de Fe-EDTA. A reação foi positiva nas aéreas que apresentaram coloração azul de Prússia. E- epiderme; PC- parênquima cortical; En- endoderme; P- periciclo; F- Floema; RP- raios de parênquima; X- xilema secundário; Px- Protoxilema; Mx- Metaxilema; Ex- exoderme; PR- pêlo radicular; seta- estria de Caspary.

Caracterização anatômica e detecção histoquímica de ferro na folha

A nervura mediana de *I. pes-caprae* apresenta epiderme uniestratificada, colênquima angular sub-epidérmico voltado para as faces da epiderme abaxial e adaxial da folha. Os feixes vasculares são bicolaterais e ladeados pelo parênquima fundamental no meio do qual ocorrem laticíferos (Figuras 17, 18 e 23). A lâmina foliar é anfiestomática e apresenta tricomas glandulares ocorrendo em depressões da epiderme da face adaxial e abaxial da folha. A folha é isobilateral, composta por 3 a 4 camadas de parênquima paliçádico voltado para as duas faces da folha e 6 a 7 camadas de parênquima aquíífero (Figura 19).

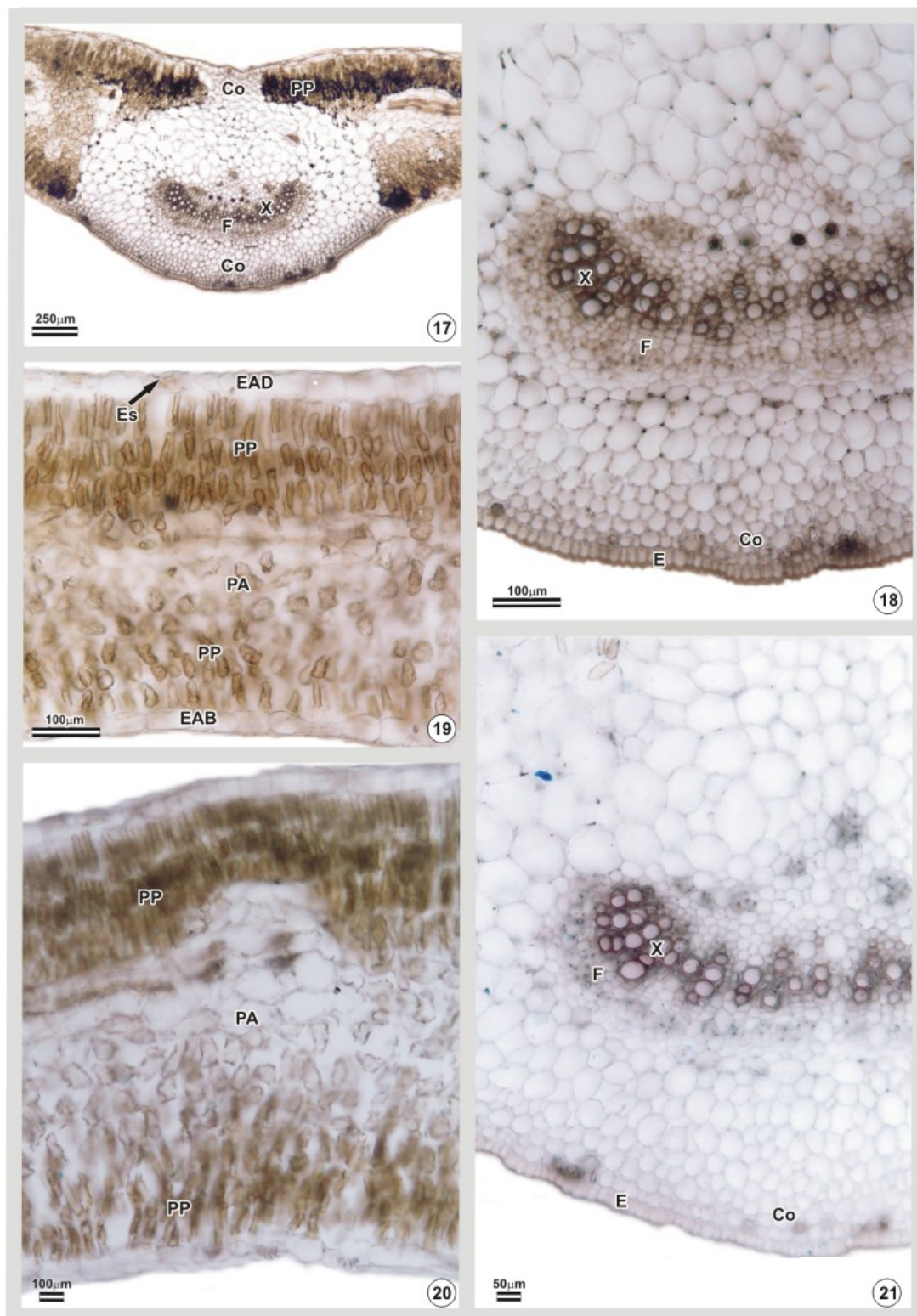
Verificou-se compartimentalização do ferro em todos os cortes da lâmina foliar de *I. pes-caprae* expostas às concentrações de 2 e 5 mM.

As folhas expostas a 2 mM (Figuras 22- 24) mostraram reação positiva menos intensa do que as expostas a 5 mM de Fe-EDTA (Figuras 25-28).

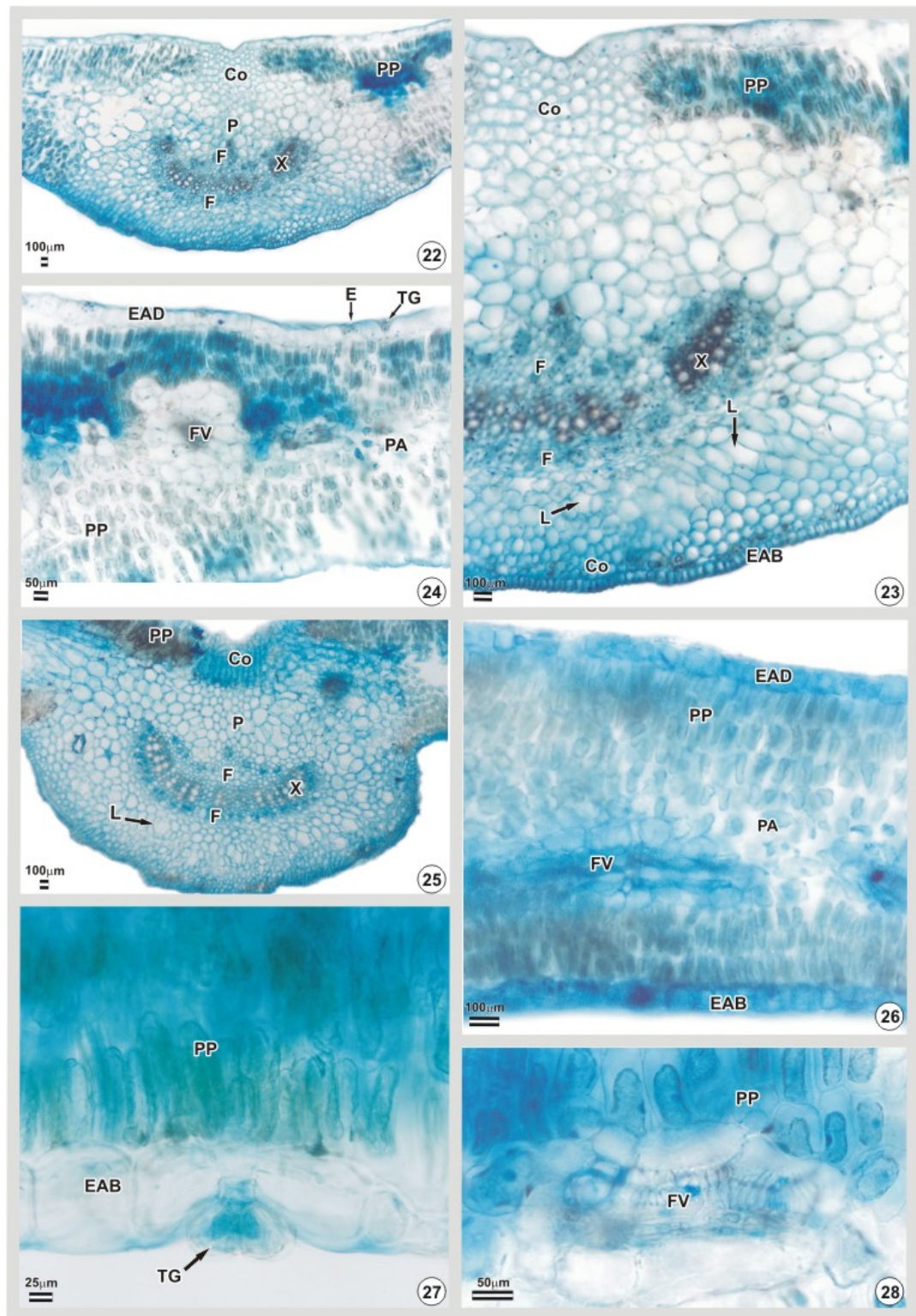
Na nervura mediana, a reação positiva para o ferro ocorreu na epiderme, em algumas células do xilema e floema, e no parênquima fundamental (Figuras 23 e 25) os cortes das plantas expostas às concentrações de 2 e 5 mM quando comparadas com os cortes das plantas do tratamento controle (Figuras 20-21) e do controle do teste (Figura 17-19). O colênquima apresentou reação positiva apenas na concentração de 5 mM (Figura 25).

No limbo foliar, todos os tecidos do mesofilo ficaram corados de azul nas plantas tratadas com ferrocianeto de potássio (Figuras 24, 26 e 28). As células epidérmicas, da face adaxial e abaxial da folha, incluindo o estômato, o feixe vascular, o parênquima paliçádico e parênquima lacunoso reagiram positivamente com a formação do azul de Prússia (Figuras 26) quando comparado com o controle. Na face abaxial e adaxial, observou-se acúmulo de ferro no tricoma glandular dos cortes das plantas expostas a 2 e 5 mM (Figura 24 e 27).

Em comparação ao controle negativo (branco do teste), as plantas do tratamento controle não apresentaram reação positiva nos tecidos da nervura mediana e do mesofilo (Figuras 20 e 21).



Figuras 17 a 21. Detecção de ferro (cortes transversais) da lâmina foliar de folhas de *Ipomoea pes-caprae* com azul de Prússia. Figuras 17-19 Controle negativo. Figuras 20-21- Cortes das folhas controle (0 mM). Os cortes das folhas controle não apresentaram reação positiva. P- parênquima, PP- parênquima paliádico, PA- parênquima aquífero Co- colênquima, Es- estômato, X- xilema, F- floema, EBA- epiderme abaxial.



Figuras 22 a 28. Detecção de ferro (cortes transversais) em folhas de *Ipomoea pes-caprae* submetidas ao azul de Prússia. Figuras 22-24- Cortes realizados em folhas cultivadas em 2 mM de Fe-EDTA. Figuras 25-28- Cortes realizados em folhas cultivadas em 5 mM de Fe-EDTA. A reação foi positiva nas aéreas que apresentaram coloração azul. P- parênquima, PA- parênquima aquífero, Co- colênquima, Es- estômato, TG- tricoma glandular, X- xilema, F- floema, L- laticífero- EAD- epiderme da face adaxial da folha, EBA- epiderme da face abaxial da folha, FV- feixe vascular.

Imagem de Fluorescência da clorofila a

Os valores da fluorescência inicial (F0) das plantas submetidas ao Fe-EDTA aumentou 15% na maior dose de ferro. Os valores de F0 das plantas expostas as doses de 4 e 5 mM foram significativamente maiores que o tratamento controle e a dose de 2mM (Tabela 1). As áreas afetadas para o parâmetro F0 não diferiram estatisticamente como o aumento das doses de ferro. A cor laranja (3,34YR 6,45/14,4) do controle (0 mM) indica o menor valor de F0, e a medida em que este valor aumenta, ocorre uma sutil alteração da cor laranja. Nas maiores doses de ferro, o aparecimento da cor preta indica que o tecido nesta região apresenta-se comprometido com menores valores de F0. Observou-se redução na fluorescência máxima (Fm) em todas as plantas submetidas as doses crescentes de Fe-EDTA. A maior dose de ferro reduziu 33% os valores de Fm, diferindo estatisticamente do controle e das doses de 2 e 3mM (Tabela 1). As plantas tratadas com 2 mM de ferro apresentaram para o parâmetro Fm, 50% da área da imagem afetada, aumentando para 92% na dose de 5 mM de ferro (Figura 29). As áreas afetadas nas doses de 2, 3 e 4 mM não foram diferentes estatisticamente, porém o controle (0 mM) e a dose de 5 mM diferiram significativamente das demais doses. As áreas verdes (9,82GY 8,44/18,32) do controle (0 mM) referem-se aos maiores valores de Fm, com o aumento das doses de ferro é possível visualizar alterações nesta cor, apresentando regiões com cores laranjas (3,34YR 6,45/14,4) , amarelas (0,98 GY 9,35/12,49) e pretas, o que indica a redução deste parâmetro.

A eficiência quântica máxima do fotossistema (Fv/Fm) reduziu com os aumentos de ferro em aproximadamente 15%. Entretanto, apenas a dose de 5 mM mostrou diferença significativa de todos os tratamentos. As áreas de Fv/Fm afetadas aumentaram na ordem de 23%, 42%, 74% e 86% com o aumento das doses de ferro. Entre as doses de 2 e 3mM não houve diferença significativa, assim como entre as doses de 4 e 5 mM. No entanto, as doses 2 e 3 mM foram estatisticamente diferentes das doses de 4 e 5 mM. O controle diferiu de todas as doses. A cor azul (6,57 B 78/20,83) presente no tratamento controle (0 mM) é referente ao maior valor de Fv/Fm 0,830, com a redução do valor, esta cor diminui continuamente até o aparecimento de regiões azul claro (5,84 B 6,81/9,24), verde (9,82 GY 8,44/18,32) e amarela (0,98 GY 9,35/12,49). É possível constatar no centro destas regiões a cor preta, indicando que esta área apresenta o menor valor de Fv/Fm.

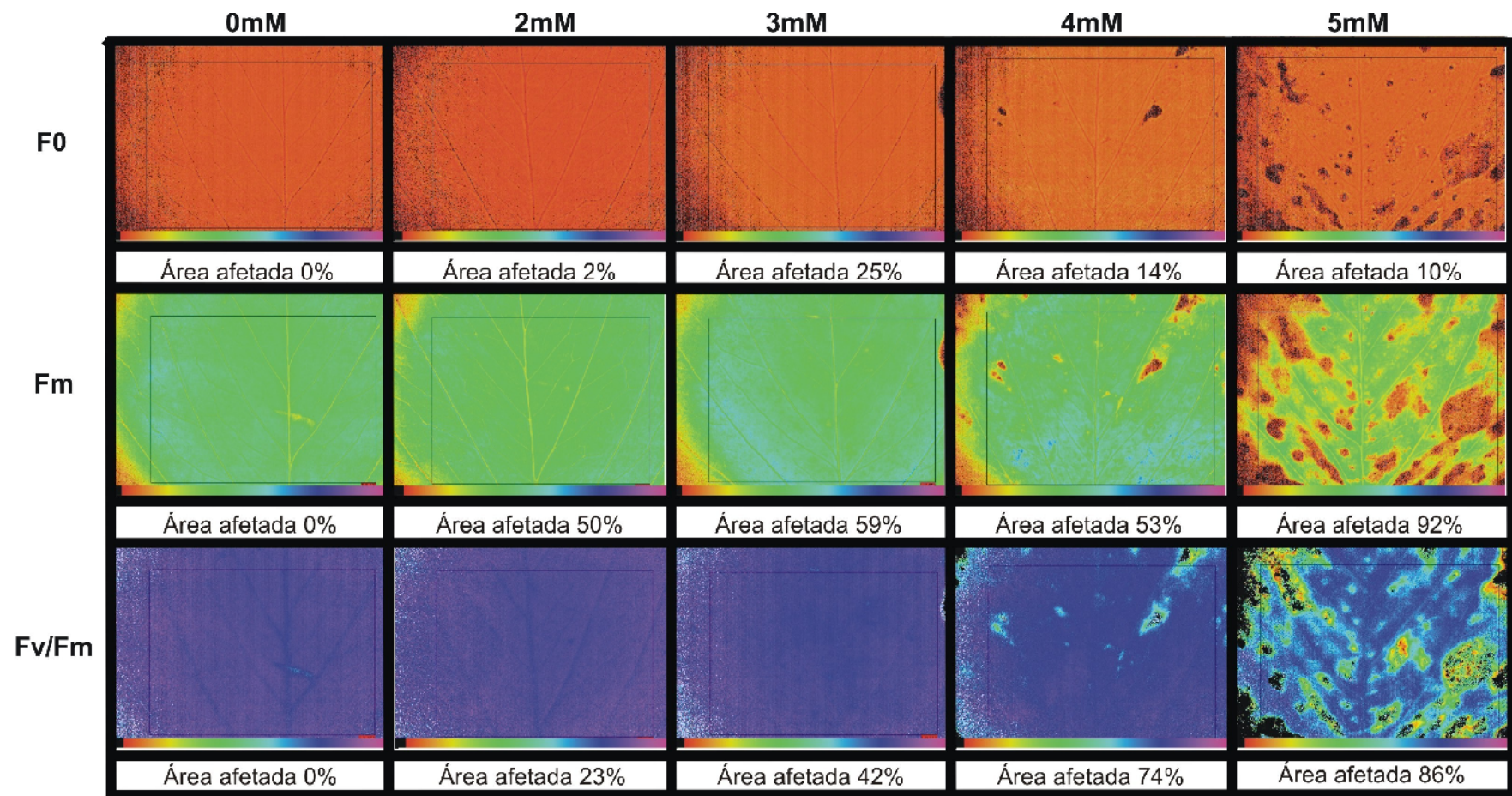


Figura 29. Imagem de fluorescência da clorofila *a* de F0, Fm e Fv/Fm, depois das folhas serem adaptadas ao escuro . As barras na base das imagens apresentam uma escala de 0.000 (preto) a 1.000 (rosa). O retângulo indica a área de interesse. Os valores das porcentagens são referentes às áreas afetadas em toda a imagem de cada parâmetro.

Tabela 1- Fluorescência da clorofila de *Ipomoea pes-caprae* expostas a doses crescentes de Fe-EDTA. Parâmetros: Fluorescência inicial (F0), Fluorescência máxima (Fm) e Rendimento quântico potencial do PSII Fv/Fm, depois das folhas serem adaptadas ao escuro. Os valores correspondem à área de interesse da imagem da fluorescência da clorofila *a*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

Tratamentos	F0	Fm	Fv/Fm
0 mM	0,077 ± 0,002 b	0,461 ± 0,022 a	0,830 ± 0,007 a
2 mM	0,076 ± 0,003 b	0,428 ± 0,020 a	0,826 ± 0,005 a
3 mM	0,085 ± 0,004 ab	0,434 ± 0,033 a	0,788 ± 0,038 a
4 mM	0,090 ± 0,006 a	0,411 ± 0,050 ab	0,790 ± 0,020 a
5 mM	0,089 ± 0,011 a	0,316 ± 0,069 b	0,709 ± 0,062 b

Fluorescência da clorofila *a*

Os valores de fluorescência da clorofila *a*, apresentou uma tendência de redução em *I. pes-caprae* quando submetida a doses crescente de ferro. Verificou-se redução do rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) e do rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m$) com o aumento do teor de ferro na solução nutritiva. O início da redução deu-se em doses superiores a 2 mM (Figura 30-A e C). O $\Delta F/F_m$ estima diretamente eficiência do uso da luz no transporte de elétrons no PSII para a regenerar NADP^+ a NADPH, e sua redução é coerente com taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) do fotossistema II para o fotossistema I, que também mostrou uma tendência a reduzir com o aumento de ferro na solução nutritiva. Os menores valores de Fv/Fm, $\Delta F/F_m$ e ETR foram encontrados na dose de 5mM, os quais reduziram na ordem de 20%, 49% e 50% respectivamente. O valor de qN aumentou em 22% porém esse aumento não foi significativo (Figura 30-B).

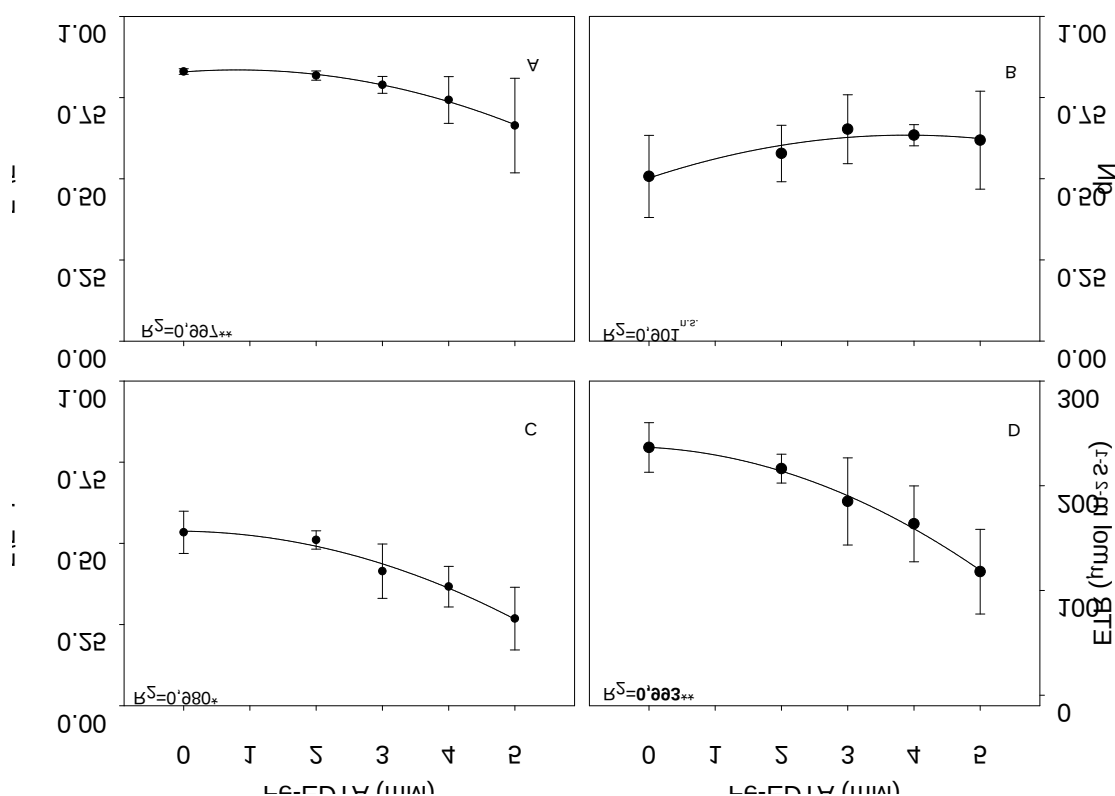


Figura 30. Fluorescência da clorofila *a* de *I. pes-caprae* cultivas em 0, 2, 3, 4 e 5 mM de Fe-EDTA. A: Rendimento quântico potencial do PS II (Fv/Fm); B: Quenching não-fotoquímico (qN); C: Rendimento quântico efetivo do PS II ($\Delta F/F_m'$); D: Taxa de transporte de elétrons (ETR). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns : não significativo).

Trocas gasosas

Sete dias após a aplicação dos tratamentos com as diferentes doses de Fe-EDTA as plantas apresentaram tendência de decréscimos nas trocas gasosas (Figura 31). A fotossíntese apresentou redução em todas as concentrações de ferro (Figura 31-A). Ao contrário da fotossíntese, a condutância estomática (g_s) (Figura 31-B), C_i/C_a (Figura 31-C) e a transpiração (E) (Figura 31-D) apresentaram decréscimos em concentrações superiores a 2 mM. A taxa fotossintética (A) e a condutância estomática (g_s) diminuíram 87,1% e 63,3%, respectivamente, com a maior dose de ferro, o oposto ocorreu com razão C_i/C_a que apresentou um acréscimo de 22%. A redução de g_s não refletiu em uma redução significativa na transpiração (E) (Figura 31-D).

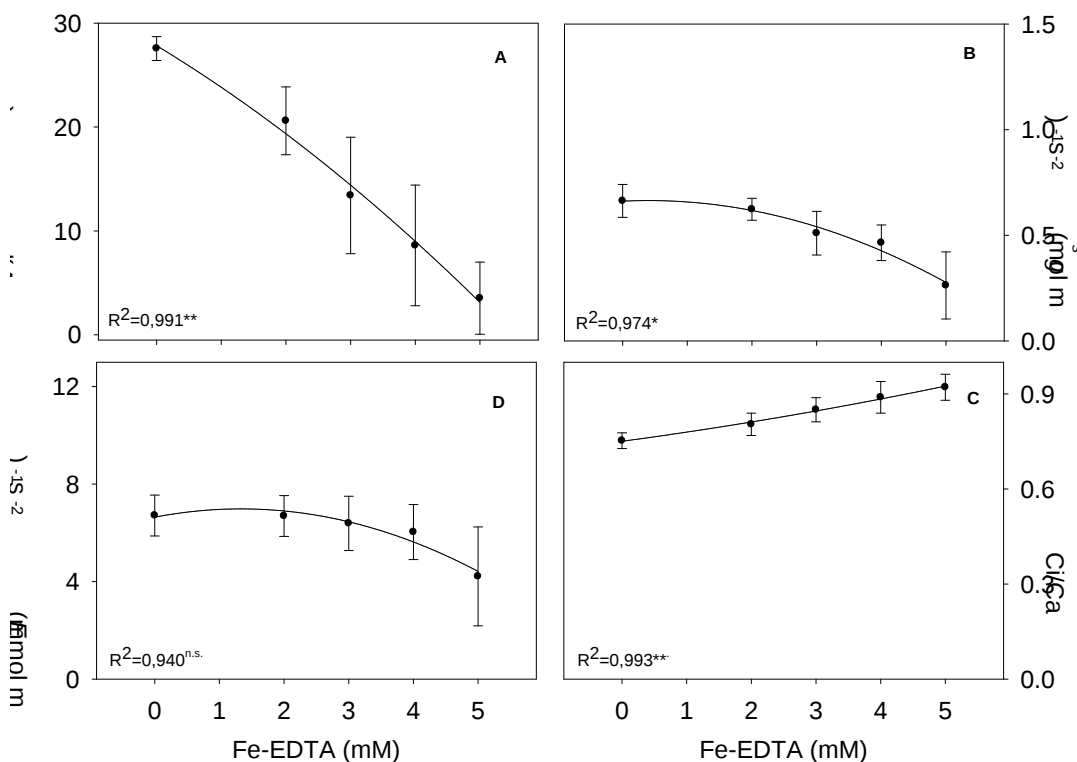


Figura 31. Trocas gasosas de *I. pes-caprae* cultivas em 0, 2, 3, 4 e 5 mM de Fe-EDTA. A: Fotossíntese líquida (A); B: Condutância estomática- (g_s); C: Razão CO_2 interno/ CO_2 externo (C_i/C_a); D: Transpiração (E). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns : não significativo).

Efeitos do ferro sobre os teores de pigmentos

Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides diminuíram gradativamente quando as plantas foram expostas a doses crescentes de ferro no período de sete dias (Figura 32- A, B e C). A razão clorofila *a/b* não apresentou alterações significativas (Figura 32-D). Em doses superiores a 2 mM na solução nutritiva foram observadas mudanças significativas no teor de clorofila *a* e *b*, já os carotenóides apresentaram redução em doses superiores a 3mM. As plantas cultivadas em 5 mM de ferro apresentaram redução de 67,3%, 64,4% e 48,9% de clorofila *a*, *b* e carotenóides, respectivamente.

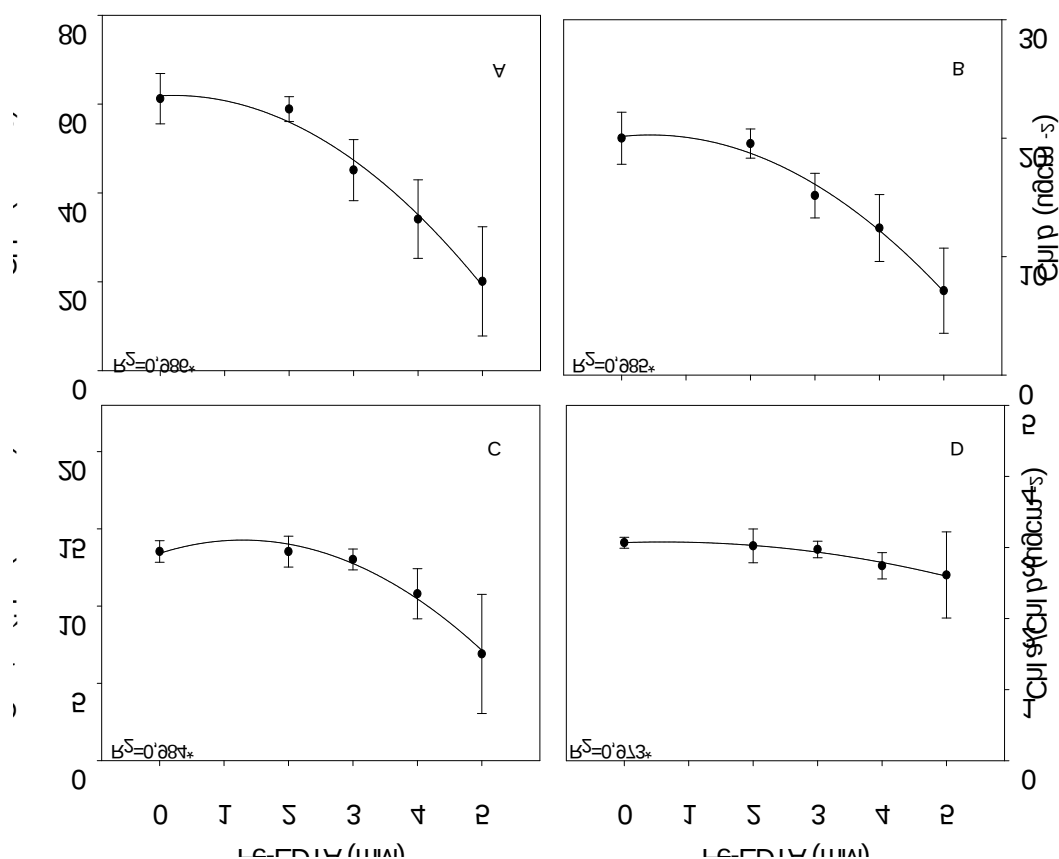


Figura 32. Teores de pigmentos de *I. pes-caprae* cultivadas em 0, 2, 3, 4 e 5 mM de Fe-EDTA. A: Clorofila *a*; B: Clorofila *b*; C: Carotenóides; D: Clorofila *a/b*. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: não significativo).

Concentração crítica de ferro

As análises de regressão da concentração crítica de ferro indicam que ocorreu uma redução significativa de 50% na fotossíntese, na taxa de transporte de elétrons (ETR), no conteúdo de clorofila *a* (Chl*a*) e na condutância estomática (*g_s*) com o acúmulo diferenciado de ferro total nas folhas de *I. pes-caprae* (Figura 33).

A redução de 50% da taxa fotossintética (Figura 33- A) foi atingida quando a concentração de ferro nas plantas alcançou 1,4 mg g⁻¹ MS. Nesta concentração a fotossíntese reduziu de 27,5 μmol m⁻² s⁻¹ para 14,6 μmol m⁻² s⁻¹. A taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 33- B) obteve uma redução de 50% com o acúmulo de 1,92 mg g⁻¹ MS de ferro nas folhas, reduzindo de 263,6 μmol m⁻² s⁻¹ para 131,8 μmol m⁻² s⁻¹. Do mesmo modo, o teor de clorofila *a* (Figura 33- D) nas folhas de *I. pes-caprae* reduziu 50% quando as plantas acumularam 1,74 mg g⁻¹ MS de ferro. Após acumular 1,86 mg g⁻¹ MS observou-se um decréscimo de 50% na condutância estomática, atingindo o valor de 0.370 mol m⁻² s⁻¹.

As regressões indicam que foi necessário menor acúmulo de ferro nas folhas para a redução da taxa fotossintética em 50% quando comparada a chl*a*, *g_s* e ETR, que obtiveram redução em 50% com acúmulo de ferro superior ao necessário para reduzir a fotossíntese.

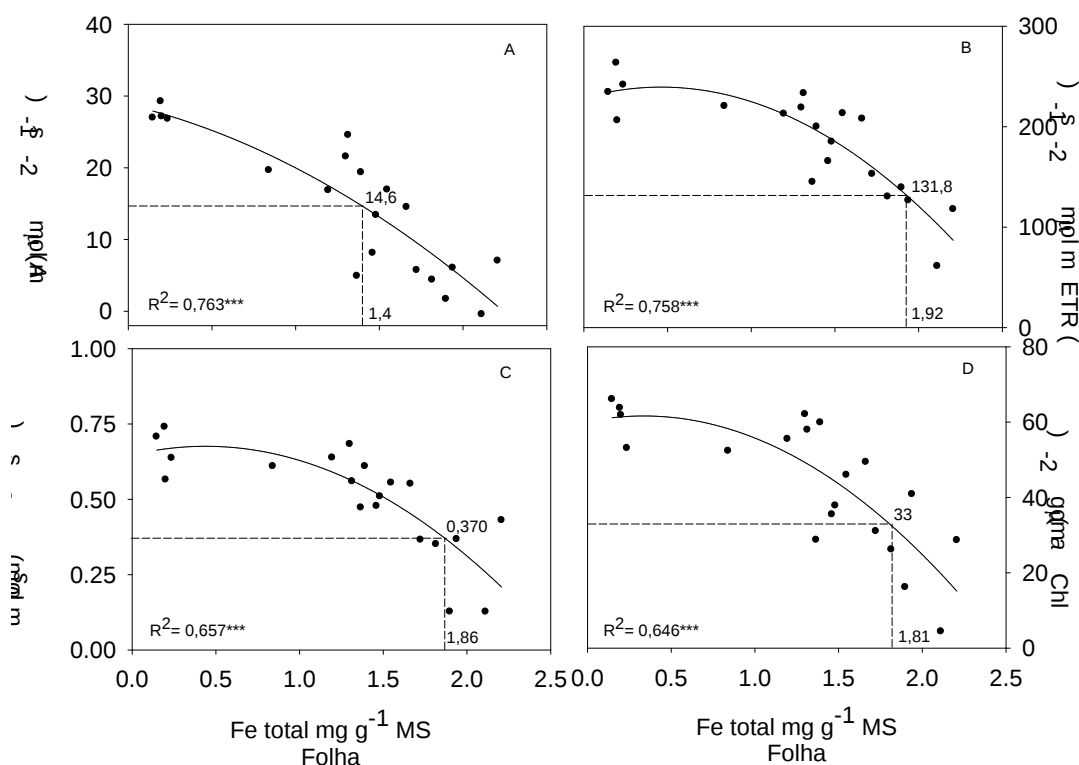


Figura 33: Concentração crítica de ferro para reduzir em 50% os parâmetros: A: Fotossíntese líquida - (A), B: Taxa de transporte de elétrons - (ETR), C: Condutância estomática - (g_s) e D: clorofila *a*- (Chla). O eixo X corresponde às doses de ferro total encontrado nas folhas de *I. pes-caprae* após sete dias cultiva em solução com Fe-EDTA nas doses 0, 2, 3, 4 e 5mM . As linhas tracejadas no eixo Y correspondem à redução de 50% dos parâmetros avaliados, já as linhas tracejadas do eixo X corresponde o valor de ferro total nas folhas capaz de reduzir em 50% os parâmetros avaliados.

Atividade de enzimas antioxidativas e concentração de malonaldeído

A atividade das enzimas peroxidases (POX), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de *I. pes-caprae* submetidas a doses crescentes de Fe-EDTA apresentaram alterações diferenciadas (Figura 34).

Ocorreram decréscimos na atividade da SOD nas doses crescentes de ferro. Sua maior atividade foi no tratamento controle (0 mM), diferindo significativamente das doses de 2, 3, 4 e 5 mM de Fe-EDTA. Na dose de 5 mM houve redução de 76, 8% na atividade da SOD em relação a sua atividade nas plantas controle (Figura 34-A).

Ocorreu um aumento significativo na atividade da POX de aproximadamente 9 vezes nas plantas expostas a 5mM de ferro. Sua atividade nas plantas expostas a 2 e 3mM não apresentou diferença significativa, assim como a das plantas expostas a 4mM e 5mM. As plantas controle apresentaram a menor atividade da POX, diferindo significativamente de todos os tratamentos (Figura 34-B).

Com relação à atividade da peroxidase do ascorbato (APX), houve uma tendência de aumento e uma posterior redução com o aumento das doses de Fe-EDTA. Não foi observada sua atividade nas plantas tratamento controle e nas expostas a 2 mM de ferro. Entretanto, da dose de 3 mM para a de 4 mM, a enzima apresentou um aumento de 30% em sua atividade, porém, na maior dose de ferro, diminui em 25%, quando comparada com a sua atividade na dose de 3 mM de ferro (Figura 34-C).

A peroxidação lipídica foi significativamente alterada com o aumento das doses de ferro. A maior concentração foi observada nas plantas expostas a 5 mM, que obteve um aumento significativo de aproximadamente de 6 vezes comparado ao controle (Figura 34-D).

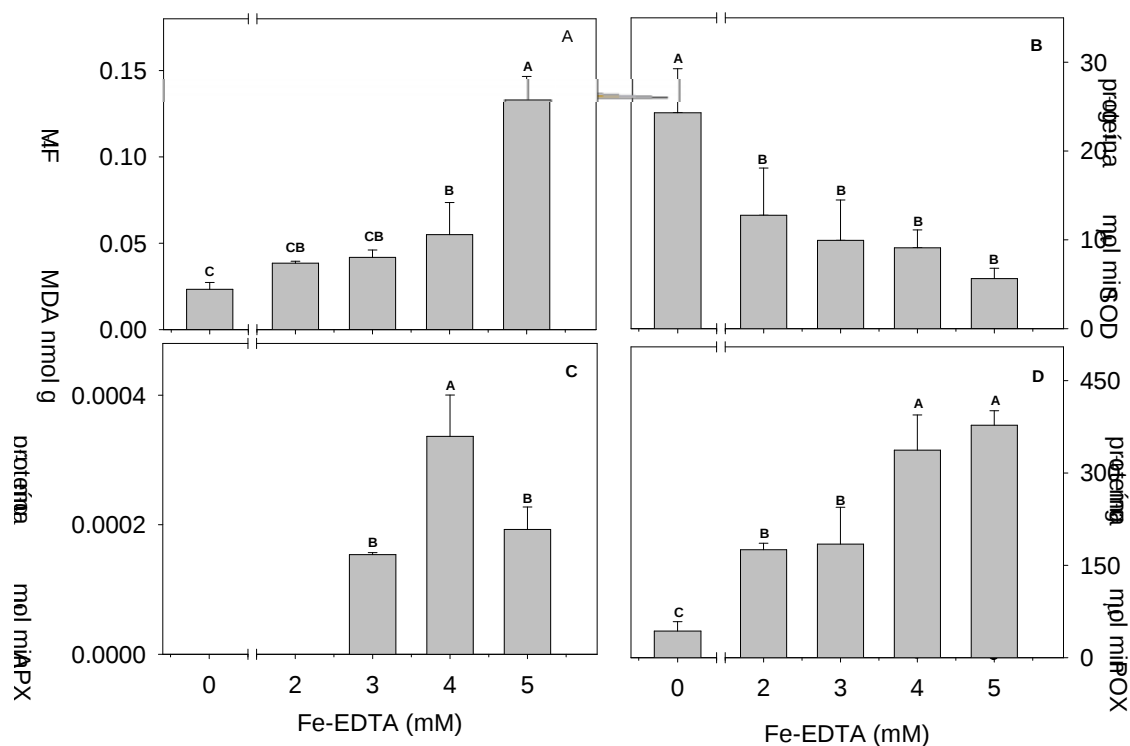


Figura 34. A- Concentração de malonaldeído (MDA) e atividade enzimática em folhas de *I. pes-caprae* cultivadas em solução de Hoagland com Fe-EDTA nas concentrações de 0, 2, 3, 4 e 5 mM . A- Concentração de malonaldeído (MDA), B- Atividade da superóxido dismutase (SOD); C- Atividade da peroxidase do ascorbato (APX); D- Atividade das peroxidases (POX). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

5. Discussão

A resposta das plantas à toxidez causada por metais depende da sensibilidade da espécie e das condições ambientais. Vários metais pesados são necessários às plantas como micronutrientes, e a absorção desses elementos pelas células, particularmente pelas raízes, é facilitada por mecanismos próprios de transporte e acumulação, não podendo evitar a entrada de elementos tóxicos pelo mesmo mecanismo (Larcher, 2000). As atividades antrópicas podem alterar as propriedades químicas do solo elevando as concentrações de metais a níveis tóxicos e a maioria das plantas é sensível aos metais pesados quando estes ultrapassam concentrações ideais (Narayan *et al.*, 1994; Gallego *et al.*, 1996; Larcher, 2004).

I. pes-caprae cultivada na presença de altas concentrações de ferro apresentou sintomas característicos da toxidez causada pelo acúmulo de ferro nos tecidos. As folhas apresentaram manchas marrons, caracterizadas como bronzeamento, sintoma típico observado em folhas de *Eugenia uniflora*, *Nicotiana plumbaginifoli*, *Clusia hilariana* e *Solanum tuberosum*, entre outras espécies submetidas ao excesso de ferro (Kim & Jung, 1993; Kampfenkel *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 2002; Neves, 2004; Chattejee *et al.*, 2007). As circunferências das manchas aumentaram ao longo dos dias, desenvolvendo-se em necroses na lâmina foliar. As necroses são sintomas visíveis de injúrias causadas pelo efeito tóxico do ferro em excesso nos tecidos. O surgimento desses sintomas visíveis está relacionado aos agentes oxidantes nos espaços intercelulares que reagem com componentes da parede celular e das membranas plasmáticas, originando a formação de lesões necróticas foliares (Pell *et al.*, 1997).

O teor de ferro total nas folhas de *I. pes-caprae* foi expressivamente maior do que os valores requeridos para suprir as necessidades normais que é aproximadamente 0,1 mg g⁻¹MS (Larcher, 2000), alcançando doses cerca de 4 vezes maiores (1,98 mg g⁻¹MS) da considerada fitotóxica para plantas cultivadas (0,5 mg g⁻¹MS) (Marschner, 1995; Levy *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 2002).

O aumento expressivo do teor de ferro nos tecidos das raízes e das folhas das plantas expostas a 2 mM pode indicar a ocorrência de saturação do ferro nas raízes, uma vez que, somente na dose de 5 mM que a concentração de ferro nos tecido voltou a aumentar e diferiu significativamente nas raízes e nas folhas. Possivelmente, a saturação originada na raiz limitou a absorção e o transporte de ferro até as folhas.

A resistência das plantas à toxidez produzida pelo ferro pode primariamente ser determinada por sua habilidade de excluir esse elemento pela raiz ou ainda prevenir sua translocação até a parte aérea (Suh *et al.*, 2002). Além do mais, algumas plantas podem reduzir os efeitos tóxicos neutralizando os metais e transformando-os em precipitados insolúveis sobre a superfície radicular (Horne, 2000).

A reação positiva da histoquímica visualizada na raiz de *I. pes-caprae*, confirma que o ferro foi absorvido. A coloração com azul de Prússia é um método recomendado para localização do ferro por ser uma técnica de resposta rápida devido à penetração dos reagentes nos tecidos, levando a reação de coloração azul (Sivaprakash *et al.*, 2006). A reação positiva observada na epiderme deve-se, provavelmente, à grande retenção do ferro antes de ser transportado para o xilema. O parênquima cortical apresentou forte reação, indicando que parte do ferro absorvido foi armazenado nesse tecido. O acúmulo de ferro observado no parênquima cortical de *I. pes-caprae* também foi observado por Brnton & Jacobson (1962) em raízes de ervilha. A reação positiva ocorrida na endoderme de *I. pes-caprae* deve-se, possivelmente, à retenção de ferro nestas células antes de ser translocado para o xilema, visto que essa estrutura contém estrias de Caspary que direcionam a passagem da água via simplasto, atuando como barreira seletiva à água e aos íons. A reação verificada no xilema sugere que o ferro foi translocado da raiz até a parte aérea da planta.

A reação positiva verificada na epiderme das raízes das plantas do tratamento controle ocorreu devido a presença de ferro na solução de Hoagland, na concentração de 0,001 mM.

A reação histoquímica da raiz confirmou os dados de quantificação de ferro na matéria seca deste órgão, que apresentou 43 vezes o incremento deste metal.

A reação positiva observada na lâmina foliar indica que o ferro foi absorvido, translocado e armazenado nas folhas. A reação ao azul de Prússia verificada nos tecidos fotossintetizantes, como o parênquima paliçádico e em estruturas epidérmicas como os estômatos, deve-se possivelmente ao maior acúmulo de ferro nos cloroplastos, que segundo Suh *et al.* (2002) é o local de maior armazenamento deste metal. A reação histoquímica também observada no floema deve-se à função desse tecido de redistribuir o ferro que chega à parte aérea.

A natureza da secreção dos tricomas dessa espécie ainda não foi elucidada, mas a estrutura destas glândulas se assemelha com as glândulas de sal estudadas em

outras espécies vegetais. Embora se tenha detectado reação positiva em todas as células do tricoma, não se pode afirmar se na secreção desses tricomas o ferro pode estar presente. Os íons chegam à glândula através do fluxo transpiratório e os mesmos são conduzidos pelas células do mesofilo até as células basais dos tricomas, e destas até as secretoras (Castro & Machado, 2003). Estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de esclarecer se esta espécie é capaz de eliminar o excesso de ferro pelos tricomas secretores.

A histolocalização de ferro verificada em *I. pes-caprae* expostas a concentrações crescentes de ferro é semelhante à verificada por Silva *et al.* (2006) nas espécies de restinga *Byrsonima sericea*, *Cordia verbenacea* e *Psidium guineense* expostas às emissões de material particulado de ferro. Assim, independente de como o ferro chega aos tecidos, se na forma particulada ou em solução, este pode se acumular nos tecidos vegetais.

Vários fatores podem contribuir para uma desordem no processo fotossintético, dentre eles a ocorrência de danos envolvendo os movimentos estomáticos, a coleta de luz ou etapa bioquímica de fixação do CO₂ (Pell *et al.*, 1994). A compartimentalização do ferro, como confirmado pela histoquímica nos diferentes tecidos, pode repercutir em uma variedade de alterações na etapa fotoquímica da fotossíntese. Nas folhas grande parte do ferro é acumulada no mesofilo, especificamente em tecidos fotossintetizantes, que apresentam aproximadamente 40% do ferro absorvido armazenado nos cloroplastos (Briat *et al.*, 2007).

O decréscimo de 87% da fotossíntese em *I. pes-caprae* na concentração de 5 mM de Fe-EDTA, parece estar diretamente relacionado com o acúmulo de ferro na parte aérea. Entretanto, a redução acentuada da taxa fotossintética a partir do controle não é coerente as reduções da condutância estomática (g_s); clorofila *a* (Chl*a*) e taxa de transporte de elétrons (ETR) que iniciaram em doses superiores a 2 mM de Fe-EDTA.

Como a maior parte do ferro absorvido é armazenado no cloroplasto, danos causados pelo seu acúmulo podem ocorrer primariamente nessa organela promovendo alterações em processos fisiológicos cruciais para o desenvolvimento da planta como a fotossíntese (Kim & Jung, 1993; Suh *et al.*, 2002). Este mecanismo fisiológico é bastante sensível às condições ambientais adversas, sendo um dos primeiros

processos alterados por ação de poluentes antes mesmo que a planta apresente sintomas visuais (Moraes *et al.*, 2000).

A redução da taxa fotossintética nas plantas de *I. pes-caprae* cultivadas com Fe-EDTA, acompanhada pelo aumento da razão Ci/Ca, pode estar relacionada com alterações causadas pela toxidez do ferro como, por exemplo, baixa formação de poder redutor (NADPH e ATP). Além disso, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzido pelas proteínas ferro-enxofre pode causar a inativação do ciclo de Calvin. Da mesma forma, a produção de $OH^{\cdot}$ via reação de Fenton, degrada a subunidade maior da RUBISCO, e conseqüentemente, reduz a assimilação de CO_2 contribuindo para o aumento da razão Ci/Ca (Kim & Jung, 1993; Apel & Hirt, 2004; Möller *et al.*, 2007).

A redução da taxa fotossintética não pode ser atribuída diretamente à redução da condutância estomática. Como pode ser observado nos resultados obtidos, a fotossíntese reduziu rapidamente na primeira dose de ferro, 2 mM, sendo que a redução da condutância estomática ocorreu somente a partir da dose de 3 mM de Fe-EDTA.

O mecanismo pelo qual o estresse com ferro afeta o movimento estomático ainda não está muito claro. Possivelmente, o movimento estomático pode ser alterado pela inibição da atividade da H^+ -ATPase das membranas celulares devido ao efeito da despolarização promovido pelo excesso de ferro. O ferro livre é capaz de reduzir em 80-90% a atividade da H^+ -ATPase ou ainda pode levar a perda de função da proteína (Casano *et al.*, 1997; Santos-Souza *et al.*, 2001).

A razão Fv/Fm é largamente aplicada para interpretação de sinais de fluorescência como uma medida de eficiência dos centros de reações na utilização dos fótons capturados em reações fotoquímicas primários nos fotossistemas II (PSII) (Oliveira 2005). Na avaliação de Fv/Fm, cerca de 83% da luz absorvida foi potencialmente utilizada nos processos fotossintéticos nas plantas sem aplicação do ferro, esse valor é concernente com o valor proposto por Björkman & Demmig (1987) em folhas de plantas saudáveis. As folhas das plantas expostas a 5 mM ferro, apresentaram valores de Fv/Fm em torno de 0,664, indicando a ocorrência da fotoinibição que foi acompanhada por um aumento no teor de ferro nas folhas. Portanto, esse decréscimo de Fv/Fm indica uma queda no rendimento quântico do fotossistema II ou danos na maquinaria fotossintética (Lichtenthaler, 2005). Na dose de 2 mM, mesmo sendo considerada uma dose relativamente alta, as plantas

apresentam valores de F_v/F_m em torno de 0,818. Portanto, esta dose não causou queda na eficiência de captura de fótons por centros de reações oxidados.

A redução dos valores de $\Delta F/F_m'$ e ETR nas plantas expostas ao ferro pode indicar danos aos complexos fotossintéticos. As alterações na atividade da RUBISCO e o decréscimo na regeneração de $NADP^+$ podem limitar o fluxo de elétrons (ETR) e conseqüentemente a redução dos valores $\Delta F/F_m'$. A limitação no fluxo de elétrons pode resultar em um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (Kampfenkel 1995; Baker & Rosenqvist, 2004; Edreva, 2005) que atuam nas duplas ligações levando ao comprometimento de sistemas de membranas dos tilacóides e do centro de reação fotossintético do PSII e PSI (Jung & Kim, 1990; Barber & Andresson, 1992; Edreva, 2005). Suh *et al.* (2002) afirmam que ocorre uma correlação positiva entre o conteúdo de ferro nos tilacóides, a taxa de fotoprodução do 1O_2 e uma severa fotoinibição do PSII.

As imagens da superfície das folhas sugerem que a composição e a concentração de pigmentos diferem nas diferentes regiões da folha, contribuindo para diferenças espaciais na fotoquímica da fotossíntese. Dessa forma, foi possível verificar mudanças na fluorescência mínima ou inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) como conseqüência do acúmulo de ferro nos tecidos.

O aumento significativo da fluorescência inicial (F_0) em *I. pes-caprae* pode indicar danos no complexo antena ou no centro de reação do PSII. F_0 representa a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* excitadas, antes de a energia ser transferida para o centro de reação do PSII e é independente de eventos fotoquímicos (Krause & Weis, 1991). Seu valor pode aumentar caso o centro de reação do PSII esteja comprometido, ou se a transferência de energia de excitação do complexo antena para o centros de reação for prejudicada (Bolhár-Nordenkamp *et al.*, 1980). Além disso, as alterações dos valores de F_0 podem ocorrer em detrimento aos estresses ambientais que ocasionam modificações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII. Estresse por temperaturas supra-ótimas, por exemplo, é caracterizado por aumentar os valores de F_0 (Smillie & Nott, 1979).

Nas plantas controle, cerca de 83% da luz absorvida pode potencialmente ser utilizada nos processos fotossintéticos. Este valor de F_v/F_m é semelhante ao obtido pelo MINI-PAM. A fluorescência máxima (F_m) e o rendimento quântico potencial F_v/F_m caracterizam o estado funcional do PSII das folhas adaptadas ao escuro. A

redução desses parâmetros em *I. pes-caprae* indica que ocorreu um comprometimento centros de reação do PSII e na utilização de fótons capturados em reações fotoquímicas primárias. O declínio de Fv/Fm foi atribuído a um decréscimo em Fm e aumento em Fo, indicando a ocorrência de dano fotoinibitório no PSII pelas altas concentrações de ferro.

A redução da clorofila *a*, *b* e carotenóides encontrados em *I. pes-caprae* está relacionado ao aumento do ferro nas folhas. A clorofila *a* apresentou-se mais sensível ao incremento de ferro apresentando redução de 67,3% do seu teor na maior dose de ferro. As clorofilas são constituídas por uma molécula de proteína ligada a um grupo cromóforo que é susceptível ao ataque de espécies reativas de oxigênio, e possivelmente foram degradadas em consequência do estresse oxidativo produzido pelo excesso de Fe²⁺ livre nos tilacóides (Gallego *et al.*, 1996; Vansuyt *et al.*, 1997; Becana *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2002; Neves, 2004).

A redução de clorofilas e carotenóies podem ter como consequência uma redução na produtividade da planta, uma vez que eles estão diretamente envolvidos na captação de energia para a fotossíntese. Chatterjee *et al.* (2007) reportaram um decréscimo de clorofila em folhas de plantas expostas a dose de 2 mM de ferro, tendo como consequência decréscimos na produtividade de biomassa. A redução da clorofila também foi reportada em girassol e *Eugenia uniflora* expostas a altas concentrações de Fe²⁺ (Gallego *et al.*, 1996; Neves, 2004).

A redução da fotossíntese em 50%, ocorreu com o acúmulo de 1,4 mg g⁻¹ MS de ferro nas folhas. Este acúmulo é aproximadamente três vezes maior que a concentração citada como fitotóxica (0,5 mg g⁻¹ MS).

Os parâmetros ETR, *g_s* e teor de chl*a* estão diretamente relacionados com a fotossíntese. No entanto, não se pode afirmar que a redução destes promoveu em um primeiro momento a redução da taxa fotossintética, uma vez que o decréscimo dos parâmetros supracitados ocorreu em concentração de ferro superior à que promoveu a redução da assimilação de CO₂, como confirmado pelas regressões da dose crítica de ferro. Isso pode levar a entender que, primariamente, ocorreu uma redução na atividade da RUBISCO e posteriormente na *g_s*, Chl*a* e ETR.

As variações observadas em *g_s*, Chl*a* e ETR incidiram subsequenteiramente na fotossíntese. Nas doses mais altas de ferro esses parâmetros podem ter sido relevantes e contribuintes para uma redução mais pronunciada da taxa fotossintética. Portanto, pode-se inferir que o acúmulo de altas concentrações de ferro pode causar

uma inibição na atividade fotossintética, sendo o precursor de uma desordem celular até o aparecimento de sintomas visíveis nas folhas.

Radicais livres e outros intermediários de oxigênio são inevitáveis em reações biológicas de organismos aeróbicos como sub-produtos do consumo de oxigênio. Porém, para que esse mecanismo não exerça um papel potencialmente tóxico para a planta, há um balanço entre a produção das EROs e a posterior remoção das mesmas (Edreva, 2005; Möller *et al.*, 2007). Neste contexto, o aumento de malonaldeído nas plantas de *I. pes-caprae* submetidas a doses crescentes de Fe-EDTA indica que o acúmulo de ferro nos tecidos potencializou o surgimento do estresse oxidativo, levando à oxidação de lipídios das membranas celulares, haja vista que, a peroxidação lipídica ocorre quando as duplas ligações dos ácidos graxos são destruídas, resultando na formação de malonaldeído (Thompson *et al.*, 1987; Edreva, 2005; Möller *et al.*, 2007). A peroxidação resulta na alteração da permeabilidade de membrana, alterando seus domínios lipídicos e protéicos, tendo como consequência o extravasamento de eletrólitos. O aumento da peroxidação lipídica como observado em *I. pes-caprae*, é continuamente reportada em plantas sob condições de estresse por metais pesados (Gallego *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1997; Fürtig *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2001; Connolly & Guerinot, 2002; Sinha & Saxena, 2006).

A alteração da atividade de enzimas antioxidativas SOD, APX e POX em *I. pes-caprae*, corrobora o acréscimo de malonaldeído nas plantas tratadas com doses crescentes de Fe, indicando ocorrência do estresse oxidativo.

A adição de altas doses de ferro estimulou significativamente a atividade das POX em *I. pes-caprae*, conferindo a essa enzima, um importante papel na proteção contra o estresse oxidativo. Geralmente, a indução da atividade da POX, ocorre em resposta à absorção de níveis tóxicos de metais. Tal fato tem sido relatado em raízes e folhas de várias espécies após a aplicação de doses fitotóxicas de Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , e Pb^{2+} (Van Asshe & Clijsters 1990; Fang & Kao, 2000; Gallego *et al.*, 1996; Sinha & Saxena, 2006). Como observado nesse trabalho, o aumento da atividade de POX foi reportado em folhas de *Eugenia uniflora* e *Solanum tuberosum* cultivadas em solução com ferro (Fang & Kao, 2000; Neves, 2004; Chatterjee *et al.*, 2006).

Ao contrário das POX, a atividade da SOD apresentou decréscimos com o aumento das doses de Fe-EDTA, sugerindo que o tratamento pode ter interferido na atividade dessa enzima. Os níveis da atividade da SOD aumentam em baixos a moderados estresses. Todavia, certos níveis de estresses podem resultar em sua

inativação ou degradação. É possível que as próprias espécies reativas de oxigênio produzidas com o acúmulo excessivo de ferro nos compartimentos celulares contribuíram para sua inativação ou até mesmo em sua degradação (Casano *et al.*, 1997). Como ocorreu em *I. pes-caprae*, o efeito inibitório do ferro sobre a atividade da SOD foi observado em *Bacopa monnieri*, *Eugenia uniflora* e folhas de girassol (Gallego *et al.*, 1996, Neves, 2004; Sinha & Saxena, 2006).

A ausência da atividade da APX no controle e na dose de 2 mM e ativação nas doses seguintes pode indicar que sua atividade foi estimulada pelo aumento do ferro nos tecidos. Porém, o estresse causado pela maior dose de ferro pode ter potencializado a redução da sua atividade, como verificado por Gallego *et al.* (1996) em folhas de girassol expostas a 0,5 mM de ferro e Sinha & Saxena (2006), em folhas de *Bacopa monnieri* expostas a doses crescentes de ferro.

5. Conclusões

A espécie mostrou-se susceptível às altas concentrações de ferro. O Fe^{2+} disponibilizado em solução nutritiva foi absorvido e compartimentalizado em diferentes tecidos da raiz e da folha. Este acúmulo favoreceu o surgimento de sintomas visuais.

As análises histoquímicas corroboraram os dados da quantificação de ferro na matéria seca da raiz e das folhas de *I. pes-caprae*, indicando que mesmo sendo uma análise qualitativa, demonstrou aumento na intensidade da coloração com o aumento do teor de ferro nos tecidos dessa espécie.

Os altos níveis de ferro fornecidos a *I. pes-caprae* alcançaram níveis fitotóxicos nas folhas na dose de 2 mM. O excesso de ferro nas folhas foi potencialmente tóxico em doses superiores a 2 mM, promovendo reduções significativas em todos os processos fisiológicos analisados, exceto a fotossíntese que foi sensível em todas as concentrações de ferro em função do estresse oxidativo originado pelo excesso de ferro nos tecidos.

A fotossíntese líquida (A) foi o processo fisiológico mais sensível em detrimento ao acúmulo de ferro nas folhas quando comprada ao teor de clorofila *a*, *g_s* e ETR, sendo o primeiro a sofrer redução de 50% conforme visto nas regressões da concentração crítica de ferro total nas folhas de *I. pes-caprae*.

As alterações nas atividades das enzimas antioxidativas peroxidases, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase e aumento na concentração de MDA indicam que plantas de *I. pes-caprae* expostas às altas concentrações de ferro apresentaram estresse oxidativo em decorrência do acúmulo de ferro nos compartimentos celulares. A atividade de algumas destas enzimas não foi suficiente para reduzir o estresse oxidativo determinado pelo acúmulo de ferro nos tecidos de *I. pes-caprae*.

Os resultados obtidos apontam que os parâmetros avaliados podem ser potenciais biomarcadores de risco ambiental.

6. Bibliografia

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews Plant Biology* **55**: 373-399

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production: an examination of future possibilities. *Journal Experimental Botany* **55**: 1607-1621

Bancroft JD, Stevens A, Turner DR (1996) Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone **4**: 776

Barber J, Andersson B (1992) Too much of good thing: light be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 61-66

Beauchamp CO, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287

Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil*. **201**: 137-147

Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K amongst vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504

Bolhàr-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Scheeibers U, Lechner NR (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* **3**: 497-514

Branton D, Jacobson L (1962) Iron localization in Pea plants. *Plant Physiology* **54**: 546-551

Briat JF, Curie C, Gaymard F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**: 276-282

Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoirion S, Wirén NV, Wuytswinkel OV (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Cell Biology* **84**: 69-81

Briat JF, Lobréaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* **2**: 187-193

Casano LM, Gómes LD, Lascano HR, Gonzáles CA, Trippi VS (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell physiology* **38**: 433-440

Castro MM, Machado SR (2003) Células e tecidos secretorios. In: Apazzato B da G, Guerreiro S M C (eds). *Anatomia Vegetal*. Viçosa-UFV. Pp-267-281

Chatterjee C Gopal, Dube BK (2006) Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulturae* **108**:1-6

Connolly EL, Guerinot ML (2002) Iron stress in plants. *Genome Biology* **3**: reviews1024.1–1024.4

Cordazzo CV, Paiva JB, Seeliger U (2006) **Guia Ilustrado- Plantas das Dunas da Costa Sudoeste Atlântica**. Pelotas: USEB

Curie C, Briat JF (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 183-206

Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001) Maize yellow stripe 1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* **409**: 346-349

Del Longo OT, Gonzales CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hypergenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology* **34**: 1023-1028

Edreva A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture Ecosystems & Environment* **106**: 119-133

Estevez MS, Malanga G, Puntarulo S (2001) Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science* **161**: 9-17

Fang CW, Kao CH (2000) Enhanced peroxidase activity in Rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science* **158**: 71-76

Fang WC, Wang JW, Lin CC, Kao CH (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in Rice leaves. *Plant Growth Regulation* **35**: 75-80

Fürtig K, Pavelic D, Brunold C, Brändle R (1999) Copper-and- iron-induced injuries in roots and rhizomes. *Limnologia* **29**: 60-63

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal in excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**: 151-159

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309-314

Grantz DA, Garnerb JHB, Johnson DW (2003) Ecological effects of particulate matter. *Environment International* **29**: 213-239

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics **125**: 189-198

Hell R, Stephan UW (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. Planta. **216**: 541-551

Hoagland DR, Arnon DI (1938) **The method for growing plants without soil: water-culture**. Berkeley: Univ. of California, 32p. Circular of the Agricultural Experimentation Station

Horne, AJ (2000) Phytoremediation by constructed wetlands. In: Terry N, Bañuelos G (Eds). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Lewis, Boca Raton, Florida, p.13–40

Howeler R H (1973) Iron –induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in flooded soil. Soil. Science Society of American Proceedings. **37**: 898-903

Inoue MT, Reissmann CB (1994) Efeitos da poluição na fotossíntese, dimensões da folha, deposição de particulados e conteúdo de ferro e cobre em alfeneiro (*Ligustrum lucidum*) da arborização de Curitiba, PR. Floresta **21**: 3-11

Jung J, Kim HS (1990) The chromophores as endogenous sensitizers involved in the photodegradation of singlet oxygen in spinach thylakoids. Photochemistry and Photobiology **52**: 1003-1009

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Effects of Iron Excess on *Nicotiana glauca* Plants: Implications to Oxidative Stress. Plant Physiology **107**: 725-735

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology **57**: 315-319

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. Journal of Cellular Biology **27**: 27-137

Kim SC, Jung J (1993) The susceptibility of mung bean chloroplasts to photoinhibition is increased by an excess supply of iron to plants: a photobiological aspect of iron toxicity in plant leaves. Photochemistry and Photobiology **58**: 120-126

Kobayashi T, Suzuki M, Inoue H, Itai RN, Takahashi M, Nakanishi H, Mori Satoshi, Nishizawa NK (2005) Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. Journal of Experimental Botany **56** (415): 1305-1316

Krishnan S, Datta K, Baisakh N, Vasconcelos Md, Datta K (2003) Tissue-specific localization of *b*-carotene and iron in transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.). Current Science **84**: 9- 10

Kuki NK, Oliva MA, Costa AC (2008) Metodologia não invasiva para detecção do impacto causado pelo ferro em espécies tropicais de Rentinga (Brasil). (Em processo para publicação). Setac Quimica y Ecotoxixologia em America Latina

Larcher W (2000) **Ecofisiologia vegetal**. RiMa Artes e Textos, São Carlos

Lemos-Filho JP de (2000) Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuva. Revista Brasileira de Botânica **23**: 45-50

Levy DB, Redente EF, Uphoff GD (1999) Evaluating the phytotoxicity of PB-Zn tailings to big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Soil Science **164**: 363-375

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll decrease ratio RFD of leaves with the PAM fluorimeter. Photosynthetica **43**: 379-393

Lindsay WL (1972) Inorganic phase equilibrium of micronutrients in soils. In: micronutrient in Agriculture p 41-58. **Mortevedt JJ, Giordano PM & Lindsay W L.** eds Soil Sci Soc. America, Inc Madison. 666p

Marschner H (1995) Functions of mineral nutrients: micronutrients. In: Mineral nutrition of higher plants. London. Second ed. Academic Press, 889p

Marschner H, Romhelb V, Knissel M (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. Journal of Plant Nutrition **9**: 695-713

Möller MI, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology **58**: 459-481

Moraes RM de, Delitti WBC, Moraes JAPV de (2000) Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* à poluição aérea de Cubatão, SP: Fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. Revista Brasileira de Botânica **23**: 443-449

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol **22**: 867-880

Narayan D, Agrawal M, Pandey J, Singh J (1994) Changes in vegetation characteristics downwind of an aluminum factory in India. Annals of Botany **73**: 557-565

Neves NR (2004) **Respostas Fisiológicas e antioxidativas em plantas de *Eugenia uniflora* L. submetidas ao excesso de ferro e chuva ácida**. Tese de mestrado de Fisiologia Vegetal, UFV

Oliva AM, Cambraia J, Neves NR, Lopes SA, Kuki KN, Silva LC da, Gusmão E F (2005) Espécies vegetais bioindicadoras da poluição atmosférica. In: Nogueira R M C, Araújo E L, Willadino L G, Cavalcante U M T (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Imprensa Universitária, Recife, pp. 457-467

Oliveira JG. (2005) Estresse luminoso: uma abordagem a partir das variáveis de fluorescência da clorofila *a*. In: Nogueira R M C, Araújo E L, Willadino L G, Cavalcante U M T (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Imprensa Universitária, Recife, pp. 182-191

Pell EJ, Eckart Na, Glick RE (1994) Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthesis potential. *Photosynthesis Research* **39**: 453-462

Pereira OJ (1990) Caracterização fitofisionômica da restinga de Setiba – Guarapari -Espírito Santo. In: II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira - Estrutura, função e manejo, 2. Águas de Lindóia, São Paulo. ACIESP. 3: 207-219

Pugh RE, Dick DG, Fredeen AL (2002) Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52**: 273-279

Silva CL, Azevedo AA (2007) Anatomia de Plantas de restinga e sua aplicação como ferramenta área para a bioindicação. In: Menezes LFT, Pires FR, Pereira OJ **Ecossistemas Costeiros do Espírito Santo Conservação e Restauração**. Vitória. EDUFES. p. 213-225

Silva CL, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JMD (2006) Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air, and Soil Pollution* **175**: 241-256

Sinha S, Gupta M, Chandra P (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**: 286-291

Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron lipid peroxidation, and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* **62**: 1340-135

Sivaprakash KR, Krishnan S, Swapan K, Parida1 DAK (2006) Tissue-specific histochemical localization of iron and ferritin gene expression in transgenic *indica* rice Pusa Basmati (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics* **85**: 157-160

Smillie RM, Nott R (1979) Heat injury in leaves of alpine, temperate and tropical plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **6**: 135-141

Souza-Santos P, Ramos RS, Ferreira ST, Carvalho-Alves PC (2001) Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1512**: 357-36

Suh H, Kim CS, Lee J, Jung J (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology* **75**: 513-518

Thompson JE, Legge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and woundinf. *New Phytologist* **105**: 317-344

Tiffin LO (1966) Iron Translocation: I. Plant Culture, Exudate Sampling. Iron-Citrate Analysis. *Plant Physiology* **41**: 510-514

Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plan Cell Environment* **13**:195-206

Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, Briat JF, Fourcroy P (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Letter* **410**: 1195-1200

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

Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macri F (2004) Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur. J. Biochem* **271**: 3657–366

Zocchi G, Cocucci S (1990) Fe uptake mechanism in Fe-efficient Cucumber roots. *Plant Physiology*. **92**: 908-911

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)