

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**RODOLPHO HENRIQUE WAICHERT DA SILVA**

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR FERRO EM  
*PHASEOLUS VULGARIS* E *ZEA MAYS***

VITÓRIA, ES

2022

**RODOLPHO HENRIQUE WAICHERT DA SILVA**

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR FERRO EM  
*PHASEOLUS VULGARIS* E *ZEA MAYS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Viviana Borges Corte

Coorientador(a): Prof. Alessandro Coutinho Ramos

VITÓRIA, ES

2022

Rodolpho Henrique Waichert da Silva

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR FERRO EM  
*PHASEOLUS VULGARIS* E *ZEA MAYS*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Vegetal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Viviana Borges Corte (UFES)**  
Orientadora e Presidente da Comissão

**Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos**  
Coorientador

  
**Prof. Dr. Pedro Damasceno Junior (UFES)**  
Examinador Interno



Documento assinado digitalmente

Hildegardo Seibert Franca  
Data: 28/02/2022 08:44:40-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

**Prof. Dr. Hildegardo França (UFES)**  
Examinador Interno

**Prof. Dr. Jean Carlos Vencioneck Dutra (SEDU/ES)**  
Examinador Externo

**Prof. Dr. Frederico Jacob Eutrópio (FAESA)**  
Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
VIVIANA BORGES CORTE - SIAPE 2699666  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 24/02/2022 às 16:27

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/367445?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
GERALDO ROGERIO FAUSTINI CUZZUOL - SIAPE 1173398  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - PPGCBV/CCHN  
Em 02/03/2022 às 08:36

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/368930?tipoArquivo=O>

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esse momento tão especial que ele preparou para minha vida. Seu cuidar foi sentido todos os dias dessa jornada, e seu amor me sustentou em meio às tribulações do caminho.

Agradeço aos meus pais que sempre foram e referência ao longo de minha vida. Os incentivos e suporte aos estudos que sempre me deram foram fundamentais para chegar até aqui.

Agradeço a minha amada esposa Clarisse, pois seu amor e companheirismo formam uma sólida base e um porto seguro para mim. Por seu incentivo irrestrito nessa caminhada, e por muitas vezes ter de escutar os meus desabafos, te amo!

Ao meu filho Arthur, que mesmo tão novo, sempre fez questão de ir ao laboratório e ajudar nos experimentos. Será que presenciaremos o nascimento de um novo pesquisador?

A minha orientadora Viviana. Abrir a porta para um aluno que trabalha e tem pouco tempo a dedicar é algo único! Sou eternamente grato por essa oportunidade dada, e a cada compartilhamento de saberes ao longo desses anos, obrigado!

Aos dois irmãos que esse doutorado me deu, Camila e Josinei. Realmente Deus colocou vocês em minha vida para tornar essa caminhada mais suave e engraçada. Esse povinho é diferenciado!

Aos amigos do LASEF e LEB. Para não me esquecer de citar o nome de ninguém agradeço ao grupo (cada amigo que passou em minha vida), aprendi muito com vocês.

Aos professores Diolina, Geraldo e Hidalgo. Por auxiliar nesse trabalho cedendo laboratórios e equipamentos para as análises.

A UFV, em especial o Prof. Eduardo Borges (*in memoria*) e José Mauro (Famoso Maurinho o mago). Pelo auxílio na análise enzimática e contribuições valiosas a esse trabalho. Agradeço a receptividade em Viçosa e as tardes de prosa regadas a café!

A UFES. Por conceder estrutura e condições a realização das análises contidas nesse trabalho.

## RESUMO

A compreensão dos efeitos tóxicos do ferro nos processos fisiológicos vegetais aparece como importante ferramenta para o fomento de ações que visem potencializar a produção agrícola em áreas sob influência de atividade mineradora ou, cujas características ambientais favoreçam a biodisponibilidade do metal. O objetivo deste trabalho é verificar as alterações fisiológicas na germinação e crescimento do feijoeiro (*P. vulgaris*) e do milho (*Z. mays*) submetidos ao plantio em condições elevadas de ferro. As plantas foram submetidas às concentrações de 1, 4, e 8 mM de ferro nas formas de Fe-EDTA, Sulfato de Ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ), sendo que *P. vulgaris* passou pelo tratamento complementar com Cloreto de Ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) nas mesmas concentrações das demais fontes. As sementes foram germinadas em câmara de germinação B.O.D., utilizando-se a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo 12h/12h sendo que as variáveis analisadas foram a porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação. Plantas foram cultivadas em vasos de polietileno de 0,5L em substrato inerte, nutridas solução de Hoagland a meia força iônica e pH 5,0 e as seguintes variáveis foram analisadas: Área foliar, comprimento do caule, comprimento da raiz, massa seca, quantificação de pigmentos cloroplastídeos, análise da fluorescência da clorofila. Foi verificada a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, POX para as plântulas jovens. O estresse por ferro não gerou alteração na germinação das espécies avaliadas, porém afetou o crescimento inicial e alocação de biomassa nas concentrações de 4 mM e 8 mM para as diferentes fontes de Fe. A espécie *P. vulgaris* não apresentou variações nos teores de pigmentos cloroplastídeos entre os tratamentos, já em *Z. mays* os pigmentos variaram em relação ao controle em todos os tratamentos. O poluente não afetou a integridade do processo fotossintético das espécies avaliadas. A ação das enzimas antioxidantes não foi observada em *P. vulgaris*, sendo característica da espécie a utilização de rotas não enzimáticas para combate as ERO, já *Z. mays* apresentou ação da POX no tratamento  $\text{Fe}^{+2}$ . Desta forma se pode concluir que as concentrações de Fe acima de 4 mM geram alterações no crescimento dos cultivares avaliados.

Palavras chave: Estresse; Germinação; Metal pesado, Fisiologia

## ABSTRACT

Understanding the toxic effects of iron on plant physiological processes appears as an important tool for promoting actions that aim to enhance agricultural production in areas under the influence of mining activities or whose environmental characteristics favor the bioavailability of the metal. The objective of this work is to verify the physiological alterations in the germination and growth of common bean (*P. vulgaris*) and maize (*Z. mays*) submitted to planting under high iron conditions. The plants were submitted to concentrations of 1, 4, and 8 mM of iron in the forms of Fe-EDTA, Ferrous Sulfate ( $\text{Fe}^{+2}$ ), and *P. vulgaris* underwent complementary treatment with Iron Chloride ( $\text{Fe}^{+3}$ ) at the same concentrations as the other sources. The seeds were germinated in a germination chamber B.O.D., using a constant temperature of 25 °C and a photoperiod of 12h/12h. The analyzed variables were the germination percentage (%G), germination speed index. Plants were grown in 0.5L polyethylene pots in an inert substrate, fed Hoagland's solution at half ionic strength and pH 5.0 and the following variables were analyzed: Leaf area, stem length, root length, dry mass, quantification of chloroplast pigments, analysis of chlorophyll fluorescence. The activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, POX was verified for the young seedlings. Iron stress did not change the germination of the evaluated species, however it affected the initial growth and biomass allocation at concentrations of 4 mM and 8 mM for the different sources of Fe. The species *P. vulgaris* did not show variations in the levels of chloroplast pigments. between treatments, however, in *Z. mays* the pigments varied in relation to the control in all treatments. The pollutant did not affect the integrity of the photosynthetic process of the evaluated species. The action of antioxidant enzymes was not observed in *P. vulgaris*, and the use of non-enzymatic routes to combat ROS is characteristic of the species, whereas *Z. mays* showed POX action in the  $\text{Fe}^{+2}$  treatment. Thus, it can be concluded that Fe concentrations above 4 mM generate changes in the growth of the evaluated cultivars.

Keywords: Stress; germination; Heavy metal, Physiology

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1:

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro, clorose em folha do tratamento Fe-EDTA 8 mM, aos 20 dias de germinação.....36

Figura 2: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *P. vulgaris*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 60 dias.....39

## Capítulo 2:

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação de *Z. mays*. Taxa de germinação durante 7 dias.....54

Figura 2: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....56

Figura 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) do caule *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....57

Figura 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....58

Figura 5: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) do caule de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....59

Figura 6: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 60 dias.....63

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1:

Tabela 1: Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila a calculados pelo teste-JIP .....	30
Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), em sementes de sementes de <i>P. vulgaris</i> .....	32
Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz (C.R) e caule (C.C) de <i>P. vulgaris</i> , submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 20 dias de germinação (C.R.1 e C.C.1) e após 60 dias de germinação (C.R.2 e C.C.2). .....	34
Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz (M.R) e caule (M.C) de <i>P. vulgaris</i> , submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 20 dias de germinação (M.R.1 e M.C.1) e após 60 dias de germinação (M.R.2 e M.C.2). .....	35
Tabela 5: Efeitos do estresse por ferro na área foliar (AF) (cm <sup>2</sup> ), em plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.....	36
Tabela 6: Efeitos do estresse por ferro na concentração dos pigmentos fotossintéticos (mg g <sup>-1</sup> MS) Clorofila a, Clorofila b e Carotenoides, em plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.....	37
Tabela 7: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de <i>P. vulgaris</i> , submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 60 dias.....	39
Tabela 8: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT) (g <sup>-1</sup> MS), em plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.....	40

## Capítulo 2:

Tabela 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), em sementes de sementes de <i>Z. mays</i> .....	54
--	----



Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....56

Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) do caule (C.C) *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....57

Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz (M.R) de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....58

Tabela 5: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) do caule (M.S.C) de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.....59

Tabela 6: Efeitos do estresse por ferro na área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>), em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.....60

Tabela 7: Efeitos do estresse por ferro na concentração dos pigmentos fotossintéticos (mg g<sup>-1</sup> MS) Clorofila a, Clorofila b e Carotenoides, em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.....61

Tabela 8: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *Z. mays*, submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 30 dias de germinação.....62

Tabela 9: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT) (g-1 MS), em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações. Avaliação efetuada com 30 dias de germinação.....64

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....13

<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
Interação Ferro – solo: Ocorrência e acúmulo.....	16
Interação Ferro – planta: Absorção e tolerância.....	17
Toxicidade por Ferro: Sensibilidade e sintomas.....	18
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>21</b>

## Capítulo 1:

<b>RESUMO.....</b>	<b>26</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
Teste de germinação.....	28
Análise de desenvolvimento inicial.....	29
Extração e quantificação de pigmentos cloroplastídeos.....	29
Análise da fluorescência da clorofila a.....	30
Atividade das enzimas antioxidantes.....	31
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>32</b>
Teste de germinação.....	32
Análise de desenvolvimento inicial.....	33
Pigmentos cloroplastídeos.....	36
Fluorescência da clorofila a.....	37
Atividade das enzimas antioxidantes.....	39
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

## Capítulo 2:

<b>RESUMO.....</b>	<b>48</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
Teste de germinação.....	50
Análise de desenvolvimento inicial.....	51
Extração e quantificação de pigmentos cloroplastídeos.....	51

Análise da fluorescência da clorofila a.....	52
Atividade das enzimas antioxidantes.....	53
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>54</b>
Teste de germinação.....	54
Análise de desenvolvimento inicial.....	55
Pigmentos cloroplastídeos.....	60
Fluorescência da clorofila a.....	61
Atividade das enzimas antioxidantes.....	63
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os reflexos negativos das ações antrópicas exercem pressão sobre o meio ambiente, afetando a qualidade dos ecossistemas e também a produtividade agrícola em diversas regiões do mundo (TRIPATHI, et al. 2018).

Tais reflexos podem propulsionar a ação de agentes físicos e químicos que acarretam em estresses sobre as populações vegetais, dentre esses se destacam: calor, frio, seca, radiação ultravioleta e exposição a metais pesados. Tais agentes geram alterações sobre o ciclo de vida das plantas afetando-as em seu processo fisiológico, refletindo em mudanças em seus padrões de crescimento e produtividade (BOTELHO e PEREZ, 2001; VERDAGUER et al. 2017; LIU et al., 2021). A presença de metais pesados em cultivares, além de gerar alterações em produtividade, leva a redução do nível de nutrientes, alterações fisiológicas e anatômicas nas plantas (PASCALICCHIO, 2002; TRIPATHI, et al. 2018; SAEED et al., 2020).

Considerando o estresse por metais pesados, a presença do elemento ferro (Fe) em solos alagáveis ou em áreas de contato com o minério é um fenômeno preocupante, devido o seu potencial de toxicidade (JUCOSKY, 2011). A mineração constitui-se uma atividade econômica com considerável representatividade no Sudeste brasileiro ao mesmo tempo em que agrega resíduos em áreas de sua atuação, principalmente nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (RIOS, 2017).

A disponibilidade de ferro no solo, em condições normais, se dá na forma insolúvel e oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ), com baixa absorção pelos organismos vegetais. A forma reduzida do íon ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ocorre quando em condições aeróbias e ácidas e apresenta alta absorção pelo vegetal (BECANA et al. 1998; MAGALHAES JR. et al. 2005). Embora seja um elemento essencial, presente em diversas reações fundamentais de plantas (fotossíntese, respiração e reações redox) e composição de estruturas (proteínas), a grande disponibilidade de ferro pode ocasionar toxicidade, pela produção de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo (HELL e STEPHAN, 2003; JUCOSKY, 2011; RODRIGUES FILHO et al. 2021). Os efeitos da toxicidade por ferro podem incluir danos à membrana pela peroxidação lipídica, redução da taxa fotossintética, clorose nas folhas e queda na taxa de crescimento (BECANA et al. 1998; NEVES et al. 2009; KROHLING et al. 2016).

A contaminação por ferro tem sido alvo de preocupações ambientais, principalmente pela permanência do metal nos ambientes e ciclos biogeoquímicos, afetando tanto espécies de vegetação próximas as fontes do mineral, como de áreas adjacentes quando de seu fluxo biogeoquímico (COTTA et al., 2006; MARENGONI et al., 2013). Por não apresentar características biodegradáveis, são raras as espécies com capacidade de tolerância ou que conseguem evitar a absorção desse elemento (SILVA-OLIVEIRA et al., 2008).

No Brasil, as espécies *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) e *Zea mays* L. (Poacea) têm grande importância socioeconômica, principalmente para os agricultores familiares (BUENO et al., 2021). O alastramento de rejeitos de minério (principalmente os contaminantes metálicos), entretanto, pode afetar os diversos compartimentos ambientais (solo, água e ar), causando graves danos aos agricultores e pequenos proprietários, e prejudicando essas culturas de subsistência. Em Mariana (MG), por exemplo, após a tragédia do rompimento da barragem de Fundão ocorrida em 2015, houve diminuição significativa da área plantada e na produção de feijão e milho. Em 2017, a produção do milho teve redução de 6.480 para 80 toneladas e a área plantada de 2.000 para 53 hectares, sem que houvesse crescimento de área plantada em outra cultura. No total, a área plantada passou de 2.473 hectares, em 2016, para 165 hectares em 2017 (COELHO, 2018).

Desta forma, entende-se que a compreensão dos efeitos ocasionados pelo aumento na concentração de ferro nessas espécies, pode elucidar as rotas ecofisiológicas e metabólicas de plantas submetidas ao estresse por metais, além de incitar debates de cunho socioeconômico, já que muitas economias locais dependem da base mineradora (COELHO, 2018; ALTANGEREL et al., 2017; PANDEY et al., 2017).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar as respostas ecofisiológicas das espécies *Phaseolus vulgaris* e *Zea mays* submetidas ao estresse por ferro.

## 2. OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações ecofisiológicas na germinação e crescimento inicial das espécies *Phaseolus vulgaris* e *Zea mays* submetida ao cultivo em condições de toxidez de ferro.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a de germinação de sementes *P. vulgaris* e *Z. mays* submetidas ao plantio em condições de alto nível de ferro.
- Analisar o crescimento de mudas de *P. Vulgaris* e *Z. mays* submetidas ao plantio em condições de alto nível de ferro.
- Analisar as diferenças nos teores de pigmentos e da atividade fotossintética em mudas de *P. Vulgaris* e *Z. mays* submetidas a condições de alto nível de ferro.
- Determinar a atividade de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase, Catalase e Peroxidase) em plântulas de *P. Vulgaris* e *Z. mays* submetidas ao plantio em condições de alto nível de ferro.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Interação ferro-solo: ocorrência e acúmulo

A ocorrência de metais pesados se dá por razões de ordem antrópica (rejeitos industriais, biossólidos e agroquímicos) ou pela disposição livre no solo (SARMA, 2011). O advento da atividade mineradora, ocorrido principalmente entre os séculos XIX e XX, aliado ao crescimento populacional e da indústria, contribuiu para um incremento da disponibilidade dos metais, tais como o ferro, em solos ocupados por diversas espécies vegetais (MUNIZ e OLIVEIRA-FILHO, 2008; WANDERLEY et al. 2016; CANATTO, 2017).

O contato do ferro com o solo pode ocasionar danos fitotóxicos na germinação de sementes e desenvolvimento de plantas, com potencial de persistência longa, sendo assimilado (absorvível) ou não pelas espécies vegetais em contato com substrato contaminado (SIMONETE e KIEHL, 2002; OLIVEIRA et al. 2005; SILVA et al. 2015; RODRIGUES FILHO et al. 2021).

As principais formas desse elemento metálico disponível em solo são: Solúvel no substrato; na forma trocável; constituinte de alguma estrutura de formação do solo; ou sob a forma insolúvel. As formas absorvíveis ocorrem com o ferro dissolvido em soluções do solo ou na forma trocável, estando sua disponibilidade sujeita aos parâmetros de pH e taxa de oxigênio (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997; AYDINALP e MARINOVA, 2003; ZENG et al. 2011).

Solos ácidos facilitam a absorção de ferro nas raízes, permitindo a passagem do metal para a forma reduzida ( $Fe^{+2}$ ). Essa condição favorece a dissolução de estruturas quelantes do solo, além de aumentar a disponibilidade/mobilidade do ferro para absorção direta pela planta (BADAWY et al., 2002; SIMONETE e KIEHL, 2002; SUKREEYAPONGSE et al., 2002; HELL e STEPHAN, 2003; BANG e HESTERBERG, 2004; WANG et al., 2006; DU LAING et al., 2007; ZHAO et al. 2010). Fatores responsáveis pela poluição atmosférica e ambiental tais como eventos de chuva ácida e uso indiscriminado de fertilizantes, acarretam acidificação do solo e aumento de absorção de metais pelas plantas (NEVES et al. 2009).

A taxa de oxigênio disponível no solo, afeta também a absorção de Ferro, que se encontra predominantemente na forma de óxidos e hidróxidos em condições aeróbicas.

Em solos alagados, o ambiente torna-se apóxico e o oxigênio é rapidamente consumido por microrganismos anaeróbicos, ocasionando incremento da taxa de gás carbônico, queda do pH circundante e aumento da disponibilidade do ferro (AHLERT, 2010).

A condição anaeróbica de solos ciliares e regiões próximas a cursos d'água favorecem condições de oxirredução do ferro, que em estado reduzido torna-se mais disponível e absorvível por plantas (KROHLING et al. 2016).

#### **4.2 Interação ferro-planta: absorção e tolerância**

São diversos os mecanismos que envolvem a absorção de ferro pelas plantas, sendo o metal absorvido de forma ativa ou passiva. Em espécies dicotiledôneas, é descrito o sistema de bombeamento de prótons pela bomba da H<sup>+</sup>-ATPase, que promove a acidificação do meio pela redução do ferro em Fe<sup>2+</sup> (LIU et al., 2021). A enzima FRO2 (oxidase redutora férrica 2) é sinalizada como responsável pela redução do Fe<sup>3+</sup>, transportando a forma reduzida via plasmalema (HELL e STEPHAN, 2003; TRIPATHI et al. 2018).

Em espécies gramíneas, estudos com *Zea mays* e *Oryza sativa* sinalizam que o íon Fe<sup>3+</sup> é quelado na raiz pela ação de fotossideróforos, e posteriormente assimilado via transportadores YS1 (JUCOSKY, 2011; TRIPATHI et al. 2018).

A absorção de Ferro por plantas inclui mecanismos de alteração na morfologia da raiz com aumento de pelos radiculares, desenvolvimento de células transportadoras e incremento da concentração de compostos de captação (AHLERT, 2010). O complexo ferro-nicotinamida (NA) atua na translocação do metal que precisa ser complexado para que não ocasione prejuízos às células. Via xilema e pelo auxílio de transportadores intracelulares do tipo YSL e NRAMP, o complexo NA permite ao elemento metálico atravessar as membranas, desembocar no xilema e ser conjugado com compostos orgânicos, em especial o citrato (JUCOSKY, 2011). As proteínas do tipo FRO atuam na retirada do ferro, quando o elemento alcança a parte aérea, sendo novamente conjugado na forma FeNA, antes de alcançar as folhas (BASHIR et al. 2016).

O armazenamento de ferro ocorre principalmente em vacúolos e apoplasto, como hidróxido e sal de fosfato, e seu excesso pode ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e estresse oxidativo (BRIAT e LEBRUN, 1999). No percurso evolutivo, as plantas demonstraram diversos mecanismos de tolerância a metais pesados que variem conforme características de espécie, metais contaminantes e condições das áreas afetadas (SOUZA et al. 2011).

A capacidade de tolerância considera os mecanismos de subsistência de uma espécie em ambientes afetados, e pode incluir processos de controle da toxicidade intra e extracelulares (RODRIGUES et al. 2016). Os exsudados radiculares participam do mecanismo de controle extracelular seja pela modificação do pH do ambiente que afeta a solubilidade dos íons ou pela redução da atividade de cátions metálicos (SOUZA et al. 2011). Ainda sobre mecanismos extracelulares, a associação mutualística fungo e plantas contribuem para a redução da disponibilidade dos metais através da liberação de glicoproteínas (glomalinas, principalmente) que possuem alta afinidade com metais (DA SILVA et al., 2006). As estruturas fúngicas podem ainda reter e imobilizar os elementos metálicos, reduzindo sua absorção (ZHU et al. 2001; DE SOUZA et al. 2011; KROHLING et al. 2016).

Os mecanismos intracelulares de controle incluem o processo de quelação dos metais (por agentes de alta afinidade que reduzem a reatividade dos metais no citosol) transporte e compartimentalização no vacúolo celular. São descritas, ainda, as funções da ferritina, proteína dos plastídeos e mitocôndrias que armazenam o ferro em sua forma não oxidante (HALL, 2002; ZANCANI et al., 2007; DOS SANTOS et al. 2011; SOUZA et al. 2011)

### **4.3 Toxicidade por ferro: sensibilidade e sintomas**

Danos de natureza fisiológica e morfológica, além do desequilíbrio redox, são efeitos desencadeados pelo excesso de Ferro em espécies vegetais (BRIAT e LEBRUN, 1999; HELL e STEPHAN, 2003; RODRIGUES FILHO et al. 2021).

Os efeitos da toxicidade por ferro podem ser percebidos desde seu contato inicial com sementes ou raízes. A membrana plasmática pode sofrer peroxidação lipídica e extravasamento celular, perdendo fluidez e alterando sua composição (HALL, 2002;

(RODRIGUES et al. 2016). Uma vez em meio intracelular, o ferro se liga a grupos sulfidríla de proteínas, afetando a atividade das enzimas do citoplasma, além de ocasionar danos à estrutura mitocondrial que afeta as taxas de respiração (GUIMARAES et al. 2008; RODRIGUES et al. 2016).

A toxicidade por ferro pode provocar a formação e acúmulo de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS), que incluem o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e Oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O peróxido de hidrogênio e o superóxido possuem alta reatividade com o ferro através da reação Fenton, produzindo mais radicais hidroxilas e oxidação do meio (BECANA et al. 1998; HELL e STEPHAN, 2003; JUCOSKY, 2011; RODRIGUES et al. 2016).

Em concentrações elevadas as EROS levam ao estresse oxidativo e resultam em danos severos ao metabolismo celular. Os efeitos gerados incluem alteração de proteínas nucleares, degradação de macromoléculas, danos ao material genético e redução da capacidade antioxidante (DOS SANTOS et al. 2011). Embora sejam compostos naturais do metabolismo vegetal, a presença de metais pode elevar os níveis das espécies reativas ao oxigênio (SHARMA e DUBEY, 2007). O excesso de ferro, por exemplo, reduz os níveis de clorofila e carotenoides, afetando o fotossistema II, e conseqüentemente a eficiência fotossintética e a taxa de crescimento vegetal (SOUZA et al. 2009; DOS SANTOS et al. 2011).

A presença de EROS induz nas plantas, a ativação de sistemas de defesa para lidarem com o aumento do estresse oxidativo. Esses mecanismos são classificados em enzimáticos e não enzimáticos (BECANA et al., 1998). O mecanismo enzimático agrupa um conjunto vasto de enzimas, que atuam na redução do estresse oxidativo (Glutathione-S-Transferase, Peroxidases, Superóxido-dismutase e Catalases). As enzimas superóxidos-dismutases (SOD) atuam na linha de frente dos sistemas de defesa, dismutando o radical  $\text{O}^{2-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (MCDONALD et al., 2008). O incremento na taxa de peróxido é proporcional ao acúmulo de ferro e induz uma segunda via de desintoxicação celular comandada pela catalase (CAT) e peroxidases (POX). Embora atuem sobre o mesmo substrato, as enzimas CAT e POX apresentam diferentes afinidades pela molécula de peróxido. A CAT é efetiva em concentrações relativamente altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo fundamental em situações de estresse severo, enquanto a POX trabalha na modulação mais precisa das EROS (ADAMSKI, 2011).

Ambas são capazes de converter diretamente  $H_2O_2$  em  $O_2$ , embora a POX consiga empregar diferentes compostos doadores de elétrons para essa redução (destaque para o ácido ascórbico como substrato eficiente) (ASADA, 1992).

Finalmente, nos mecanismos de defesa não enzimáticos, atuam diversos compostos, tais como: Tocoferol, Glutathione, Carotenoides, compostos fenólicos e Ubiquinol, que potencializam a inibição da reação oxidativa entre radicais orgânicos (PEREIRA, 2006).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKI, J. M. **Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2011.
- AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** Dissertação de mestrado. Ufpel. 2010.
- ALTANGEREL, N., ARIUNBOLD, G. O., GORMAN, C., ALKAHTANI, M. H., BORREGO, E. J., BOHLMAYER, D.; SCULLY, M. O. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, p. 3393-3396, 2017.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n.2, p. 235-241. 1992.
- AYDINALP, C. & MARINOVA, S. Distribution and forms of heavy metals in some agricultural soils. **Polish Journal of Environmental Studies** v. 12, 629-633. 2003.
- BADAWY, S.H.; HELAL, M.I.D.; CHAUDRI, A.M.; LAWLOR, K.; MCGRATH, S.P. Soil solid-phase controls lead activity in soil solution. **Journal of Environmental Quality** v.31, p.162-167, 2002.
- BANG, J. & HESTERBERG, D. Dissolution of trace element contaminants from two coastal plain soils as affected by pH. **Journal of Environmental Quality** v. 33, p. 891-901. 2004.
- BASHIR, K.; RASHEED, S.; KOBAYASHI, T.; SEKI, M., & NISHIZAWA, N. K. Regulating subcellular metal homeostasis: the key to crop improvement. **Frontiers in plant science**, v.7,p.1192. 2016.
- BECANA, M.; MORAN, J. F. & ITURBE-ORMAETXE, I. Iron dependent oxygen freeradical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection, **Plant and Soil**, n. 201, p. 137-147, 1998.
- BOTELHO, B. A.; PEREZ, S. C. G. Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de canafístula. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 43-49, 2001.
- BRIAT, J. F., & LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 322, n. 1, p. 43-54, 1999.
- BRIAT J.F. & LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in PlantScience**, v.2 n.5. p.187–193, 1997.
- BUENO, A. M.; FLORES, R. A.; FERREIRA, E. P. B.; ANDRADE, A, F.; LIMA, F. R. S.; SOUZA, M. A. P.; JÚNIOR, J. A.; MESQUITA, M. Productivity and gas exchanges of the common bean subjected to inoculation and nitrogen fertilization. **Research, Society and Development**, v.10, n. 4, p. 1-17, 2021.

CANATTO, B. F. **Caracterização geoquímica dos sedimentos da Bacia do Rio Gualaxo do Norte**. Monografia Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Geologia, 2017.

COELHO, T. P. Minério-dependência em Brumadinho e Mariana. **Revista Lutas Sociais**, v. 22, n. 41, p. 252-267, 2018.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O. & PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio betari no parque estadual turístico do alto ribeira-petar, são paulo, Brasil. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 40, 2006.

DA SILVA, S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, 2006.

DOS SANTOS, F. S.; DO AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. & GARBISU, C. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. **Quim. Nova**, v. 34, n. 1, p. 16-20, 2011.

DU LAING, G.; VANTHUYNE, D.R.J.; VANDECASTEELE, B.; TACK, F.M.G.; VERLOO, M.G. Influence of hydrological regime on pore water metal concentrations in contaminated sediment-derived soil. **Environmental Pollution**. v.147, p. 615-625, 2007.

GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 58-68, 2008.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HELL, R., & STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.

JUCOSKI, G. O. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L.** Universidade Federal de Viçosa. 2011.

KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; FIGUEIRA, F. F.; CAMPOSTRINI, E.; DOBBS, L. B. & RAMOS, A. C. Níveis tóxicos de ferro em lavouras de café conilon (*Coffea canephora* L.) em solos de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v. 11, n.2, p. 255-266, 2016.

LIU, Y., KONG, D., WU, H. L., LING, H. Q. Iron in plant-pathogen interactions. **J Exp Bot.** 17;72(6):2114-2124, 2021.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M de; FAGUNDES, P. R. R; GOMES, A. S; PETRINI J.A.;FRANCO, D. F.; SEVERO, A. SOARES, R. C.; BENDER, R. Seleção de linhagens de arroz irrigado do programa de melhoramento da Embrapa à toxicidade por ferro. In: Congresso brasileiro de arroz irrigado, 4.; reunião da cultura do arroz irrigado, 26., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM,. p. 204-206, 2005.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S. & JUNIOR, A. C. G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. **Química Nova, São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 359-363, 2013.

MCDONALD, I.; SLOAN, G.C.; ZIJLSTRA, A.A.; MATSUNAGA, N.; MATSUURA, M.; KRAEMER, K.E.; MEHRABAN, P.; ZADEH, A.A.; SADEGHIPOUR, H.R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition, **Asian journal of Plant Sci.** v. 7, p.251-259, 2008.

MUNIZ, D. H., & OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da saúde**, v. 4, n. 1, p. 83-100, 2008.

NEVES, N.R.; OLIVA, M.A.; CENTENO, D.C.; COSTA, A.C.; RIBAS, R.F.; PEREIRA, E.G. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga 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**. v. 407, p. 3740-3745. 2009.

OLIVEIRA, C. D.; MOURA BRASIL DO AMARAL SOBRINHO, N.; SANTOS MARQUES, V.D.; & MAZUR, N. Efeitos da aplicação do lodo de esgoto enriquecido com cádmio e zinco na cultura do arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 1, 2005.

PANDEY, N.; IQBAL, Z.; PANDEY, B. K. & SAWANT, S. V. Phytohormones and Drought Stress: Plant Responses to Transcriptional Regulation. **Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress**, v. 2, p. 477-504, 2017.

PASCALICCHIO, A. A. E. **Contaminação por metais pesados**. Annablume Editora, 2002.

PEREIRA, E. G. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga**. Tese de Doutorado. Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 54 pg. 2006.

RIOS, C. O. **Respostas fisiológicas de gramíneas ao déficit hídrico visando a revegetação de pilha de estéril**. Universidade Federal de Viçosa. 2017.

RODRIGUES, A. C. D.; DOS SANTOS, A. M.; DOS SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; & SOBRINHO, N. M. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

RODRIGUES FILHO, J.; BORGES, V. C.; PERIN, I. T. A. L.; WAICHERT, R. H.; REIS, C. Iron Toxicity on Germination and Early Growth of *Cecropia hololeuca* Miq. **Ensaio e Ciência**, v. 24, p. 584-592, 2021.

SARMA, H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 118-138, 2011.

SAEED S., ULLAH S., NAFEES M., BIBI F., ULLAH R. Morphological assessment of glutamate zerovalent iron nanoparticles by scanning electron microscopy and its combined effect with indole acetic acid on amelioration of lead toxicity in maize (*Zea mays* L.). **Microsc Res Tech.** (12):1499-1506, 2020.

SILVA, M. L. D. S.; VITT, G. C. & TREVIZAM, A. R. Toxicidade por metais pesados em plantas de arroz e soja cultivados em solo contaminado. **Ceres**, v. 61, n. 2, 2015.

SILVA OLIVEIRA, L.; BONA, C.; DE OLIVEIRA SANTOS, G.& KOEHLER, H. S. Crescimento de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em solo contaminado com petróleo. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 5, n. 1/2, p. 21-33, 2008.

SIMONETE, M. A., & KIEHL, J. D. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 555-563, 2002.

SOUZA, E. P.; DA SILVA, I. D. F. & FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2011.

SUKREEYAPONGSE, O.; HOLME, P.E.; STROBEL, B.W.; PANICHSAKPATANA, S.; MAGID, J.; HANSEN, H.C.B.pH-dependent release of cadmium, copper, and lead from natural and sludge-amended soils. **Journal of Environmental Quality** v. 31 p. 1901-1909. 2002.

TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; GAUR, S.; SINGH, S.; YADAV, V.; LIU, S.; SINGH, V. P.; SARMA, S.; SRIVASTAVA, P.; PRASAD, S. M.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K.; SAHI, S. Acquisition and Homeostasis of Iron in Higher Plants and Their Probable Role in Abiotic Stress Tolerance. perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-15, 2018.

VERDAGUER, D.; JAMSER, M. A. K.; LLORENES, L.; MORALES, O.; NEUGATS, S. UV – radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown. **Plant Science**, v. 255, p. 72-81, 2017.

WANDERLEY, L. J.; MANSUR, M. S.; MILANEZ, B. & PINTO, R. G. Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socio ambientais. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 30-35, 2016.

WANG, A.S.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L.; DELORME, T.A.& REEVES, R.D. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, v. 281, p. 325-337. 2006.

ZANCANI, M.; PERESSON, C.; PATUI, S.; TUBARO, F.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Mitochondrial ferritin distribution among plant organs and its involvement in ascorbate-mediated iron uptake and release. **Plant Science**, v.173, p.182-189, 2007.

ZENG, F.; ALI, S.; ZHANG, H.; OUYANG, Y.; QIU, B.; WU, F. & ZHANG, G. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. **Environmental pollution**, v. 159, n. 1, p. 84-91, 2011.

ZHAO, K.L.; LIU, X.M.; XU, J.M. & SELIM, H.M. Heavy metal contaminations in a soil-rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields. **Journal of Hazardous Materials**. v. 181, p. 778-787. 2010.

ZHU, Y.; CHRISTIE, P. & LAIDLAW, A. S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 42, n. 2, p. 193-199, 2001.

## CAPÍTULO 1

*Artigo submetido à revista Acta Scientiarum Agronomy (e-ISSN 1807-8621) – Em fase de ajustes pelo editor.*

### RESUMO

O ferro é um elemento natural no ambiente e sua presença no vegetal é muito importante uma vez que participa ativamente de vários processos fisiológicos essenciais à manutenção do metabolismo da planta, porém em altas doses esse metal apresenta toxicidade ao organismo. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de altas doses de ferro na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *P. vulgaris*. A espécie foi submetida às concentrações de 1, 4 e 8mM aplicados na forma de Fe-EDTA, Sulfato Ferroso e Cloreto de Ferro. As variáveis analisadas foram à porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação. Para a análise de desenvolvimento inicial as seguintes variáveis foram analisadas: área foliar, comprimento do caule, comprimento da raiz e seca, quantificação de pigmentos cloroplastídeos, análise da fluorescência da clorofila a. Foi verificada a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, POX para as plantas. O estresse por ferro quelado gerou retardamento do crescimento radicular e diminuição na alocação de biomassa na raiz. A área foliar foi influenciada por todas as fontes de ferro testadas. O acúmulo de ferro não gerou alterações nos teores de clorofila a, clorofila b e carotenoides bem como nas ações fotossintéticas. As enzimas do estresse oxidativo também não apresentaram variações ao comparadas ao controle, o que indica que a espécie *P. vulgaris* adota rotas não enzimáticas para combate aos EROS.

Palavras chave: Estresse; Fisiologia Vegetal; Germinação; Metal pesado, Crescimento

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração se destaca como importante linha econômica do Brasil tendo no sudeste os estados de Minas Gerais e Espírito Santo como principais polos da planta mineradora (DNPM, 2016). Os impactos ambientais dessa atividade são bastante conhecidos e vão da formação de áreas degradadas à contaminação de solos e água por rejeitos minerários ricos em metais (MECHI & SANCHES, 2010). Dentre esses rejeitos o Ferro é muito abundante, e sua presença em solos e água tem despertado o interesse em conhecer seus efeitos sobre os organismos animais e vegetais (VITORINO, 2015).

Em plantas a toxicidade do ferro tem sido estudada principalmente pois seus efeitos deletérios geram prejuízos na produtividade de várias espécies comerciais (AHLERT, 2010). Áreas sob influência da atividade de mineração tem sofrido cronicamente com os efeitos cumulativos desse metal (WANDERLEY et al. 2016; CANATTO 2017). Eventos críticos como o de Mariana em 2015, recebendo o Rio Doce um aporte de mais de 40 milhões de metros cúbicos de rejeitos ricos em ferro (VIANA e COSTA, 2016), destacam a importância de conhecimento acerca dos efeitos desse metal.

Na região da bacia do rio Doce o cultivo do feijão (*Phaseolus vulgaris*) possui grande importância entre os pequenos produtores, sendo para consumo doméstico ou comércio local esse produto fomenta a economia de diversos vilarejos (NETO, 2017). Porém ao utilizar as várzeas do rio Doce para o cultivo e suas águas para irrigação o pequeno produtor expõe as plantas a altas concentrações de ferro, podendo esse metal gerar efeitos tóxicos no vegetal até mesmo diminuindo ou impossibilitando sua produtividade (BATAGLIA & MASCARENHAS, 1981; KAMPFENKEL et al. 1995; KROHLING et al., 2016; LAURETT et al. 2017).

O presente trabalho tem por objetivo elucidar os efeitos fisiológicos do excesso de ferro sobre as planta do feijoeiro *P. vulgaris*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de *P. vulgaris*, colhidas em 2018 e provenientes do município de Domingos Martins (ES), foram armazenadas no laboratório de sementes e eco fisiologia florestal da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória (ES) em câmara fria (5°C) até o início do experimento.

As sementes foram submetidas a dez tratamentos, sendo três fontes de ferro em três concentrações mais um controle, tanto no teste de germinação quanto na análise de desenvolvimento.

Para o controle foi utilizada água destilada, os demais tratamentos seguiram as concentrações de, 1mM, 4mM e 8mM dos seguintes agentes cloreto de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sulfato ferroso ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e Fe-EDTA. As soluções de Ferro foram produzidas seguindo o protocolo estabelecido por Simonete & Kiehl (2002) para efeito de biodisponibilidade pelas plantas.

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema constituído de quatro repetições de 25 sementes para o teste de germinação e 20 plântulas por tratamento para a análise de desenvolvimento. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando o programa Sisvar.

### 2.1. Teste de Germinação

As sementes foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e colocadas em placas de Petri, tendo como substrato duas folhas de papel filtro umedecidas com as soluções correspondentes a cada tratamento na proporção de três vezes o seu peso seco (FERREIRA & BORGUETTI, 2005). A germinação foi conduzida em câmara de germinação B.O.D., utilizando-se a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo 12h/12h por um período de 7 dias. A germinação foi verificada diariamente durante todo o experimento, considerando germinada a semente que

apresentou protrusão da radícula com pelo menos 2mm através do tegumento (BRASIL, 2009).

Após sete dias de experimento foram efetuadas a avaliação de porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\%G = \sum G \times 100/100$$

$$IVG = \sum (ni/ti)$$

Onde: %G: porcentagem de germinação;  $\sum G$ : somatório do número de plântulas germinadas por tratamento; 100: número máximo possível de plântulas por tratamento. Ni = número de sementes que germinaram no tempo 'i'; ti= tempo após instalação do teste.

## 2.2. Análise de desenvolvimento inicial

Sementes de *P. vulgaris* foram semeadas em vasos de polietileno de 0,5L com substrato não adubado mais areia lavada na proporção 1:1. Foram montados vinte vasos com uma planta cada, totalizando vinte plântulas por tratamento.

Vinte dias após a germinação, as plântulas foram submetidas aos respectivos tratamentos com as soluções de Ferro aplicadas via solo. O cultivo foi realizado em sala de crescimento a 25° C e fotoperíodo de 12h. Todas as plântulas foram mantidas em solução de Hoagland a meia força iônica e pH 5,0 (HOAGLAND e ARNON, 1950).

Para avaliar o crescimento das plântulas, aos 20 e 60 dias após início dos tratamentos foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: Área foliar (AF) determinada em medidor de área (LI-COR Modelo 3100, Lincoln, Nebraska, USA), comprimento do caule, comprimento da raiz, massa seca do caule e massa seca da raiz.

## 2.3. Extração e quantificação de pigmentos cloroplastídeos

A determinação dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides foi realizada ao término do experimento, no 60° dia. Foram utilizadas três replicatas, cada uma com 20 mg de massa fresca foliar sendo homogeneizada em 5 ml de acetona (80%) gelada com o

auxílio de almofariz e pistilo. O material foi filtrado utilizando-se funil e papel filtro. O líquido filtrado foi então armazenado em balão volumétrico de 10ml envolvido em papel alumínio e PVC. Para a quantificação dos pigmentos o extrato foi lido em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) nos comprimentos de onda 470, 645 e 662 nm. As concentrações foram determinadas segundo as equações de Lichtenthaler (1987):

$$Ca = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$Cb = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$C = (1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb) / 214$$

Onde: Ca (quantidade de clorofila a); Cb (quantidade de clorofila b); C (quantidade de carotenoides).

Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca (mg g<sup>-1</sup> MS).

#### **2.4. Análise da fluorescência da clorofila a**

A fluorescência da clorofila a foi quantificada ao final do experimento (60 dias) utilizando um fluorômetro portátil modelo Handy-PEA (Photosynthetic Efficiency Analyser) Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norfolk, UK. As medições ocorreram em folhas jovens de 10 plantas por tratamento, completamente expandidas e previamente adaptadas a 40 minutos de escuro por meio de cliques foliares para a oxidação completa do sistema fotossintético. Os resultados obtidos foram posteriormente tabulados em planilha eletrônica utilizando-se o software PEA Plus v1.11. A partir desta análise, foram calculados os parâmetros biofísicos que quantificam o fluxo de energia através da cadeia transportadora de elétrons por meio do teste-JIP (STRASSER e STRASSER, 1995). O significado de cada parâmetro avaliado está disposto na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila a calculados pelo teste-JIP .

PARÂMETROS	SIGNIFICADOS
Fv/Fm	Rendimento quântico máximo do FSII.
$\phi_i(P_o)$	Rendimento quântico máximo do FSII
$\psi_i(E_o)$	Rendimento quântico do transporte de elétron após a QA-.
$\phi_i(E_o)$	Eficiência com que a energia move o elétron na cadeia de transporte de elétrons após a QA-.
$\delta(R_o)$	Eficiência que elétrons se movem dos receptores do intersistema até os receptores finais do FSI.
$\phi_i(R_o)$	
PI abs	Conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos receptores finais do FSI (Índice de desempenho potencial do FSII).
PI total	Conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos receptores finais do FSI (Índice de desempenho fotoquímico total).

## 2.5. Atividades das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas Superóxido-dismutase, Peroxidase e Catalase foi verificada nas plântulas jovens ao final do experimento (60º dia). Para a extração das enzimas antioxidantes, 300 mg de material vegetal foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTANa<sub>2</sub> 0,1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e o homogeneizado centrifugado a 12000 xg durante 15 min, a 4 °C. Utilizou-se o sobrenadante para os ensaios das atividades da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (POX). A atividade da SOD foi baseada em Del Longo et al. (1993), Giannopolitis e Ries (1997) e Beauchamp e Fridovich (1971), com a reação sendo conduzida a 25 °C em câmara iluminada com lâmpada de 15W. Após 6 minutos de exposição, procedeu-se a leitura em 560nm. A atividade da POX foi medida baseada em Kar e Mishra (1976) e Chance e Maehley (1955) com a reação a temperatura ambiente por 2 minutos seguido de leitura a 420nm; e a atividade da CAT seguiu o protocolo de Havir e Mchale (1987) e Anderson et al. (1995), realizado a temperatura ambiente com leitura a 240nm por 2 minutos. Foram utilizadas três repetições com duplicatas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) (PEIXOTO et al., 1999).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Teste de Germinação

O ferro apresenta importante função fisiológica para os vegetais aparecendo como estruturador em enzimas, co-fatores enzimáticos e agindo como regulador de reações Redox. Participa dos processos vitais tais como a fotossíntese, respiração e fixação de nitrogênio (BROADLEY et al. 2012; VERMA e PANDEY, 2015). Toda via o excesso desse metal pode gerar efeitos tóxicos com a formação de EROS, atuando sobre as membranas lipídicas ocasionando problemas nas funções celulares somáticas e reprodutivas do vegetal (RAVET et al., 2009). É capaz de afetar a captação e o transporte da água necessários à embebição das sementes, bem como causar danos permanentes ao embrião (BEWLEY e BLACK, 1983; WIERZ-BICKA e OBIDZINSKA, 1998; LI et al., 2005). Em sua forma reduzida ou quelada, o ferro tem a capacidade de ser prontamente absorvido pelas plantas e, se em excesso, causar danos às estruturas membranosas, DNA e proteínas devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) (DE DORLODOT et al., 2005; NAGAJYOTI et al. 2010).

A presença do Ferro afetou significativamente a germinação de *P. vulgaris* para a fonte Fe-EDTA na concentração de 8 mM, não gerando efeitos significativos para as demais concentrações e fontes de ferro, o IVG permaneceu constante para todos os tratamentos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), em sementes de *P. vulgaris*.

Tratamento	%G	IVG
Controle	98,0 ± 2,3 <sup>bc</sup>	10,5 ± 1,5 <sup>ab</sup>
EDTA 1mM	94,0 ± 2,3 <sup>bc</sup>	11,3 ± 1,8 <sup>ab</sup>
EDTA 4mM	91,0 ± 3,8 <sup>abc</sup>	11,4 ± 1,7 <sup>ab</sup>
EDTA 8mM	<b>71,0 ± 26,6<sup>a</sup></b>	08,4 ± 3,2 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	100,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	13,1 ± 1,8 <sup>b</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	96,0 ± 5,6 <sup>bc</sup>	12,2 ± 1,9 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	95,0 ± 2,0 <sup>bc</sup>	12,7 ± 1,6 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	95,0 ± 6,0 <sup>bc</sup>	11,7 ± 1,5 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	95,0 ± 3,8 <sup>bc</sup>	11,9 ± 1,3 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	77,0 ± 8,2 <sup>ab</sup>	08,9 ± 0,8 <sup>ab</sup>

Um dos efeitos tóxicos observados em elevadas concentrações de ferro está relacionado à oxidação e danos em proteínas, síntese de DNA e divisão celular

(KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2012). O período de germinação das sementes é marcado por intensa atividade fisiológica, por esse motivo os vegetais desenvolveram vasta gama de mecanismos de proteção a injúrias químicas e físicas externas como forma de proteção a essa fase, mesmo que tais mecanismos apresentem diminuição pós fase de embebição (LI et al. 2005), possivelmente esses mecanismos de defesa foram suficientes para atenuar os efeitos sobre a %G e IVG da maioria das concentrações de ferro testadas.

Efeitos observados principalmente em testes com fontes queladas, apontam para a redução da atividade mitótica do meristema embrionário e efeitos clastogênicos nos cromossomos, já descrito em trabalhos envolvendo espécies cultivadas como o milho e girassol (CHAKRAVARTY e SRIVASTAVA, 1992; NAGAJYOTI et al. 2010). Tais resultados corroboram com o obtido para a forma quelada Fe-EDTA na concentração de 8 mM onde a %G apresentou valores mais baixos que as demais fontes e concentrações. As concentrações 1 mM e 4 mM de Fe-EDTA, mesmo não apresentando valores significativos, possuem as médias mais baixas de %G quando comparadas as demais fontes de ferro. Embora o metal seja essencial ao processo germinativo, contribuindo inclusive para a superação da dormência em plantas (MURGIA e MORANDINI, 2017), ao atingir padrões acima da concentração ótima, em torno de 0,9 mM, afeta negativamente a germinação de sementes (EL RASAFI et al. 2016).

### **3.2. Análise de desenvolvimento inicial**

Quando comparado ao controle, o crescimento da raiz das plantas de *P. vulgaris* cultivadas nas fontes de ferro Fe-EDTA (4 e 8 mM) e  $Fe^{+3}$  (8 mM) apresentaram valores médios mais baixos no dia 20 pós germinação (Tabela 3), porém a medição do dia 60 não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Essa situação demonstra que o ferro retardou do crescimento da raiz porém esse retardo não culminou em diferenças significativas no comprimento da raiz das plantas adultas. Verma e Pandey (2017) ao avaliar a germinação e crescimento inicial de indivíduos do gênero *Vigna* (Leguminosae) em condições de acúmulo de ferro observaram variações na velocidade de crescimento e alocação de biomassa de plântulas, em especial da área radicular. Resultados similares foram encontrados por Lingua et al. (2008) ao trabalhar com espécies dos gêneros *Phaseolus* e *Triticum*. O contato direto da raiz com

o contaminante pode ser fator determinante para uma maior expressão de variações quando da avaliação da toxicidade de metais (YANG et al., 2010; YUSUF et al., 2011). Discrepâncias no crescimento em plantas sob estresse férrico estão relacionados às consequências negativas exercidas pelo poluente nos processos de divisão celular e expansão da parede celular, comuns nos meristemas com consequência direta sobre o desenvolvimento vegetal (HARGEMEYER e BRECKLE, 1996; NASEER et al., 2001). A alocação de biomassa também será afetada pois o ferro tende a se depositar nas cristas mitocondriais, acarretando queda na taxa respiratória e atraso no desenvolvimento (NENOVA, 2006; MCDONALD et al., 2008).

Para o crescimento do caule situação semelhante é observada, as fontes Fe-EDTA (1 mM) e Fe<sup>+3</sup> (8 mM) apresentaram valores médios mais baixos que os demais tratamentos na medição do dia 20, porém na medição do dia 60 as médias foram estaticamente iguais (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz (C.R) e caule (C.C) de *P. vulgaris*, submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 20 dias de germinação (C.R.1 e C.C.1) e após 60 dias de germinação (C.R.2 e C.C.2).

Tratamento	C.R.1	C.R.2	C.C.1	C.C.2
Controle	11,100 ± 0,360 <sup>b</sup>	19,666 ± 2,138 <sup>a</sup>	18,566 ± 0,568 <sup>cde</sup>	33,666 ± 7,023 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	11,666 ± 0,702 <sup>bc</sup>	27,800 ± 6,187 <sup>a</sup>	<b>14,600 ± 0,655<sup>ab</sup></b>	28,700 ± 2,705 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	<b>13,400 ± 0,964<sup>c</sup></b>	23,400 ± 4,167 <sup>a</sup>	17,033 ± 2,059 <sup>bc</sup>	30,233 ± 11,944 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	<b>09,033 ± 0,568<sup>a</sup></b>	20,333 ± 7,223 <sup>a</sup>	18,333 ± 1,001 <sup>cde</sup>	23,566 ± 2,400 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	11,333 ± 1,101 <sup>b</sup>	24,066 ± 4,214 <sup>a</sup>	16,900 ± 1,322 <sup>bc</sup>	24,666 ± 7,371 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	11,133 ± 0,585 <sup>b</sup>	19,933 ± 1,814 <sup>a</sup>	20,933 ± 0,550 <sup>d</sup>	32,133 ± 5,059 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	11,800 ± 0,199 <sup>bc</sup>	17,766 ± 4,726 <sup>a</sup>	20,233 ± 0,850 <sup>de</sup>	29,166 ± 3,208 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	11,600 ± 0,793 <sup>bc</sup>	23,633 ± 4,202 <sup>a</sup>	17,533 ± 0,611 <sup>bcd</sup>	29,366 ± 5,810 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	10,200 ± 0,300 <sup>ab</sup>	20,933 ± 1,059 <sup>a</sup>	17,800 ± 1,178 <sup>cd</sup>	32,466 ± 4,899 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	<b>08,566 ± 0,929<sup>a</sup></b>	19,500 ± 9,006 <sup>a</sup>	<b>11,766 ± 0,602<sup>a</sup></b>	16,633 ± 1,789 <sup>a</sup>

A massa seca da raiz de *P. vulgaris* cultivada nas fontes Fe-EDTA (4 e 8 mM) Fe<sup>+2</sup> (8 mM) e Fe<sup>+3</sup> (8 mM) apresentaram valores mais baixos quando comparadas ao controle aos 20 dias de germinação, essa variação manteve-se para Fe-EDTA (4 e 8 mM) e Fe<sup>+3</sup> (8 mM) quando da avaliação aos 60 dias (Tabela 4). A massa seca do caule não apresentou variações significativas.

Problemas de alocação de biomassa em plantas sob estresse férrico estão relacionadas à interferência do metal no processo de respiração celular, bem como em modificações no fluxo de micronutrientes, sendo que tais efeitos são mais severos quanto mais elevada à concentração do poluentes (VERMA e PANDEY, 2017).

Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz (M.R) e caule (M.C) de *P. vulgaris*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 20 dias de germinação (M.R.1 e M.C.1) e após 60 dias de germinação (M.R.2 e M.C.2).

Tratamento	M.S.R.1	M.S.R.2	M.S.C.1	M.S.C.2
Controle	0,096 ± 0,001 <sup>d</sup>	0,130 ± 0,010 <sup>de</sup>	0,083 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,104 ± 0,003 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	0,089 ± 0,003 <sup>cd</sup>	0,103 ± 0,005 <sup>bcd</sup>	0,082 ± 0,002 <sup>ab</sup>	0,105 ± 0,001 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	<b>0,073 ± 0,001<sup>b</sup></b>	<b>0,086 ± 0,005<sup>bc</sup></b>	0,084 ± 0,000 <sup>b</sup>	0,105 ± 0,007 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	<b>0,055 ± 0,006<sup>a</sup></b>	<b>0,046 ± 0,011<sup>a</sup></b>	0,078 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,106 ± 0,003 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	0,095 ± 0,001 <sup>d</sup>	0,116 ± 0,002 <sup>de</sup>	0,084 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,104 ± 0,005 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	0,090 ± 0,002 <sup>cd</sup>	0,106 ± 0,015 <sup>cde</sup>	0,085 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,104 ± 0,003 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	<b>0,079 ± 0,004<sup>bc</sup></b>	0,105 ± 0,004 <sup>cd</sup>	0,082 ± 0,003 <sup>ab</sup>	0,101 ± 0,000 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	0,094 ± 0,003 <sup>d</sup>	0,133 ± 0,015 <sup>e</sup>	0,085 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,103 ± 0,002 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	0,089 ± 0,004 <sup>cd</sup>	0,103 ± 0,005 <sup>bcd</sup>	0,082 ± 0,002 <sup>ab</sup>	0,102 ± 0,001 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	<b>0,080 ± 0,004<sup>bc</sup></b>	<b>0,076 ± 0,005<sup>b</sup></b>	0,078 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,105 ± 0,004 <sup>a</sup>

A avaliação da área foliar, aos 60 dias de germinação, apresentou valores mais baixos para os tratamentos Fe-EDTA (4 e 8 mM), Fe<sup>+2</sup> (1 e 4 mM) e Fe<sup>+3</sup> (4 e 8 mM). (Tabela 5).

Uma das características da ação do ferro sobre o metabolismo do vegetal é sua capacidade de influenciar no balanço de outros íons nas células (TANAKA et al., 1966; ZHANG et al. 2018). De maneira que os processos de entrada de ferro nos vegetais apresenta marcos regulatórios para evitar sua competição com outros íons. Dentre esses mecanismos destaca-se a acidificação da rizosfera por liberação de prótons, que possibilitará diferenças na solubilidade do elemento, e mudanças morfoanatômicas, principalmente em folhas e raízes (MORRISSEY e GUERINOT, 2010), fato corroborado com esse estudo.

Tabela 5: Efeitos do estresse por ferro na área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>), em plantas de *P. vulgaris* cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.

Tratamento	A.F
Controle	19,536 ± 6,015 <sup>b</sup>
EDTA 1mM	21,140 ± 6,402 <sup>b</sup>
EDTA 4mM	<b>4,266 ± 0,285<sup>a</sup></b>
EDTA 8mM	<b>4,413 ± 0,453<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	<b>8,410 ± 1,162<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	<b>7,236 ± 2,053<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	<b>3,616 ± 0,030<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	22,903 ± 4,923 <sup>b</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	<b>7,493 ± 1,813<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	<b>8,493 ± 0,230<sup>a</sup></b>

### 3.3. Pigmentos cloroplastídeos

Um dos efeitos visuais mais conhecidos do estresse por ferro é a degradação de pigmentos gerando cloroses. Esse efeito foi observado nos tratamentos com Fe-EDTA (Figura 1).

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro, clorose em folha do tratamento Fe-EDTA 8 mM, aos 20 dias de germinação.



O ferro gera reduções na concentração de pigmentos cloroplastídicos devido sua ação como inibidor de enzimas foliares bem como a desestabilizando moléculas orgânicas dos plastídios (JUCOSKI, 2011). Atua como inibidor da enzima protoclorofilide-

redutase, alterando a rota de biossíntese de pigmentos (CHANDRA e KANG, 2015), gerando assim diminuição da concentração de Clorofila a e Carotenoides em plantas sob elevadas concentrações do metal (MCDONALD et al., 2008; ARUNACHALAM et al., 2009; VERMA e PANDEY, 2017).

Entre tanto, trabalhos com *C. hololeuca* demonstraram que para a espécie os valores de Clorofila b e Carotenoides não são afetados pelas concentrações de ferro. Tal efeito está ligado à capacidade do ferro em inativar a Clorofila a Oxigenase, devido sua afinidade pelo grupamento sulfidríla, bloqueando as conversões da clorofila b catalisados por essa enzima (STREIT et al. 2005; GUIMARAES et al. 2008; RODRIGUES et al. 2016).

No presente trabalho a avaliação dos pigmentos não apresentou variação significativa entre os tratamentos (Tabela 6). Apesar da presença de cloroses, nos tratamentos com Fe-EDTA, nos primeiros 10 dias após inoculação do poluente esse efeito não foi evidenciado nas avaliações. Cabe ressaltar que as folhas em clorose sofreram senescência após o dia 20 e, quando da avaliação do dia 60 apenas folhas sem manchas aparentes estavam presentes nos indivíduos.

Tabela 6: Efeitos do estresse por ferro na concentração dos pigmentos fotossintéticos ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) Clorofila a, Clorofila b e Carotenoides, em plantas de *P. vulgaris* cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.

Tratamento	Clorofila A	Clorofila B	Carotenoides
Controle	3,518 <sup>ab</sup>	0,996 <sup>a</sup>	1,085 <sup>ab</sup>
EDTA 1mM	2,278 <sup>a</sup>	0,876 <sup>a</sup>	0,832 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	2,661 <sup>ab</sup>	0,997 <sup>a</sup>	0,834 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	3,838 <sup>ab</sup>	2,177 <sup>a</sup>	1,086 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	3,573 <sup>ab</sup>	2,143 <sup>a</sup>	0,980 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	3,557 <sup>ab</sup>	1,522 <sup>a</sup>	1,098 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	3,746 <sup>ab</sup>	1,533 <sup>a</sup>	1,126 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	4,492 <sup>b</sup>	1,966 <sup>a</sup>	1,438 <sup>b</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	3,876 <sup>ab</sup>	1,714 <sup>a</sup>	1,169 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	4,749 <sup>b</sup>	2,244 <sup>a</sup>	1,388 <sup>b</sup>

### 3.4. Fluorescência da clorofila a

A fotossíntese necessita da ação do ferro em suas reações, sendo que esse age como Co-fator nos Fotossistemas I e II, no Citocromo b6f, bem como tem papel estrutural no complexo LHC. Podendo as variações de sua concentração afetar negativamente todo processo fotossintético (NENOVA, 2009; SHU et al., 2012; PINTO et al. 2016). A ação

do ferro sobre a degeneração da proteína D1 faz com que suas concentrações mais elevadas tenham efeitos significativos sobre o Fotossistema II, sendo esse mais sensível ao metal (KALAJI et al., 2017).

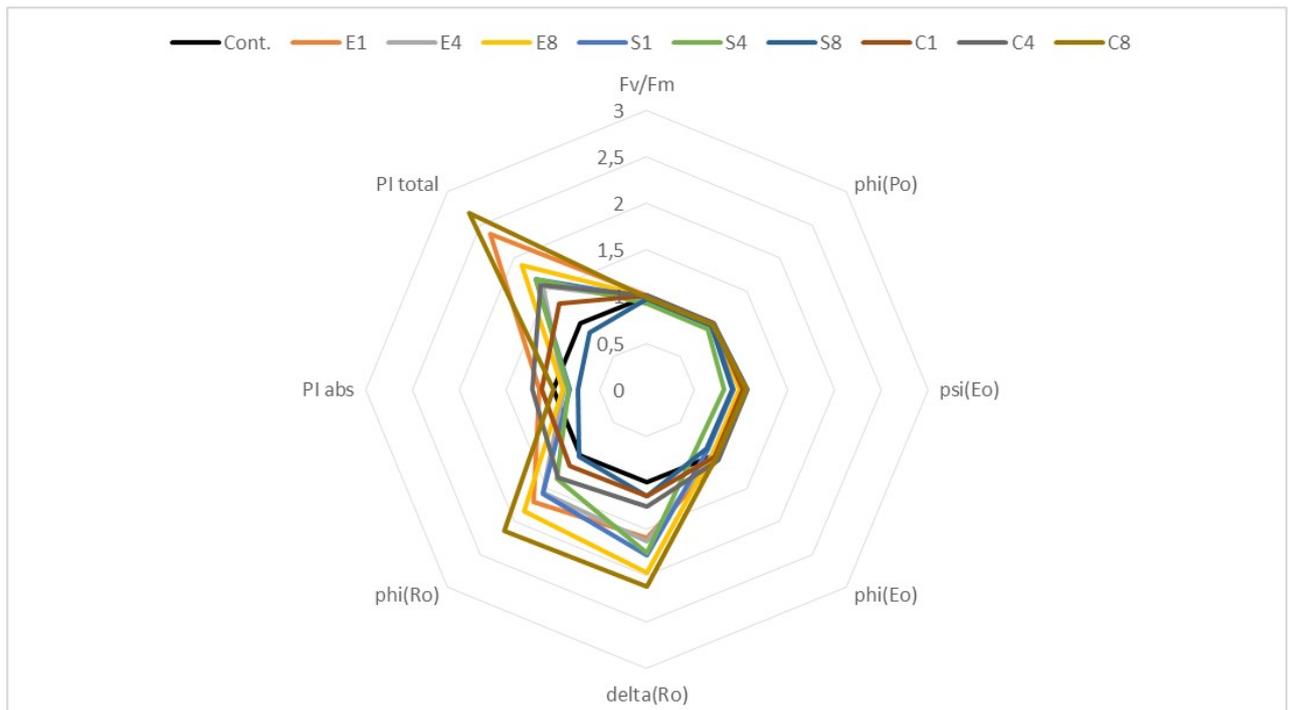
As reações de oxirredução do FSI, em seu fluxo de elétrons, parece não apresentar sensibilidade às concentrações mais elevadas de ferro (SANTOS JUNIOR, 2018), já para o FSII, em plantas tratadas com sulfato ferroso, foram observadas elevações na densidade nos centros de reação, com vias a otimizar o processo energético (GALAZZI, 2011; SANTOS JUNIOR, 2018). Aparentemente o FSI permanece mais protegido que as demais estruturas da membrana indicando menor probabilidade de fotoinibição/oxidação do que o FSII. Porém, o comprometimento do FSI é um sinal de que as reações fotoquímicas da fotossíntese foram severamente afetadas (STRASSER et al. 2010; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2013). Danos ao processo fotossintético ocasionam a baixa assimilação final de elétrons e queda na formação de compostos redutores,  $\text{NADPH}_2$  e ATP, trazendo danos também à fase de carboxilação da fotossíntese com consequente queda da taxa de açúcares e crescimento (ARAUJO, 2012; CHEN et al. 2016).

Quando comparados ao controle os parâmetros referentes a fluorescência da clorofila a avaliados nesse estudo não apresentaram variações significativas (Tabela 7, Figura 2). Tal resultado também, assim como pigmentos, está atrelado ao fato de que as folhas que apresentam alterações de cores nos primeiros 10 dias da inserção do poluente caíram, sendo substituídas por folhas integras, cujos efeitos tóxicos não foram observados. Tal mecanismo se apresenta como uma estratégia de *P. vulgaris* para minimizar os efeitos tóxicos do ferro.

Tabela 7: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *P. vulgaris*, submetida e diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 60 dias.

Tratamento	Fv/Fm	phi(Po)	psi(Eo)	phi(Eo)	delta(Ro)	phi(Ro)	PI abs	PI total
Controle	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,44 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,13 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,55 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	0,77 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,40 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,23 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,08 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,30 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	0,73 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,00 ± 1,16 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,48 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	0,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,17 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,19 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	0,80 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,20 <sup>a</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,41 <sup>a</sup>

Figura 2: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *P. vulgaris*, submetida e diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 60 dias.



### 3.5. Atividades das enzimas antioxidantes

O Ferro possui forte ação pró-oxidativa acarretando, no sistema vegetal, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (HELL e STEPHAN, 2003). As ERO gerados devem ser rapidamente degradados, pois sua presença no meio intracelular pode gerar severos danos a nível molecular (mutações e degenerações de proteínas e lipídeos) e

tecidual (necroses) (STEIN et al., 2009). Como linha primária de defesa as células vegetais apresentam a enzima SOD, que age na dismutação dos radicais superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SINHA, 2006). Porém o peróxido de hidrogênio é um produto tóxico às células e necessita ser eliminado, sendo essa ação efetuada pelas enzimas CAT ou POX que agem nos peroxissomos e cloroplastos. As POXs, devido a degradação de  $H_2O_2$  em  $OH^-$  agem no crescimento da célula vegetal via alongamento da parede (MAIA et al. 2012).

Os resultados desse estudo não demonstram alterações nas enzimas antioxidantes (Tabela 8). Esse resultado diverge dos trabalhos que demonstram correlação entre tais enzimas e o estresse por ferro (FOYER et al., 1994; PEREIRA, 2006; JUCOSKY, 2011; ADAMSKI, 2011). Tal resultado não é determinante para excluir a formação de EROS na espécie em face ao estresse por ferro, mas pode apontar para uma estratégia diferenciada de neutralização de EROS via antioxidantes não enzimáticos (ELSTNER e OSSWALD, 1994; MOHAMED e ALY, 2004; SCANDALIOS, 2005). Tal fato já foi identificado para a *P. vulgaris* por Pekker et al, 2002, onde o tratamento com glutathione, um eficiente antioxidante não enzimático, resultou na redução da expressão gênica de enzimas antioxidantes em plântulas expostas a altos níveis de ferro. Resultados semelhantes foram obtidos em plantas do gênero *Arabidopsis* (FOURCROY et al. 2004).

Tabela 8: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT) ( $\mu$ g-1 MS), em plantas de *P. vulgaris* cultivada em três diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.

Tratamento	SOD	CAT	POX
Controle	1,064 <sup>a</sup>	32,882 <sup>abc</sup>	144,643 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	1,274 <sup>a</sup>	44,616 <sup>abc</sup>	211,699 <sup>ab</sup>
EDTA 4mM	0,997 <sup>a</sup>	46,448 <sup>bc</sup>	256,778 <sup>ab</sup>
EDTA 8mM	1,019 <sup>a</sup>	48,816 <sup>c</sup>	307,646 <sup>b</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	1,212 <sup>a</sup>	30,574 <sup>ab</sup>	174,665 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	2,103 <sup>a</sup>	43,199 <sup>abc</sup>	271,235 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	1,086 <sup>a</sup>	37,497 <sup>abc</sup>	218,557 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 1mM	0,932 <sup>a</sup>	27,070 <sup>a</sup>	174,559 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 4mM	0,989 <sup>a</sup>	35,278 <sup>abc</sup>	210,106 <sup>ab</sup>
Fe <sup>+3</sup> 8mM	1,166 <sup>a</sup>	41,159 <sup>abc</sup>	287,640 <sup>ab</sup>

#### 4. CONCLUSÕES

- O Fe em sua forma quelada apresentou influência sobre a % de germinação das sementes de *P. vulgaris*.
- O ferro EDTA e Fe<sup>+3</sup> causaram lentidão no crescimento das raízes de *P. vulgaris*, ocasionando menor alocação de biomassa radicular nos respectivos tratamentos.
- A área foliar foi menor, quando comparada ao controle, em todas as fontes de ferro. Tal processo se dá como estratégia do vegetal para minimizar os efeitos tóxicos do metal.
- Os pigmentos fotossintéticos permaneceram constantes em todos os tratamentos. Mesmo que em uma fase da vida da planta houve a manifestação de clorose, levando a senescência da folha, quando da avaliação, todas as folhas estavam integras quanto os pigmentos.
- *P. vulgaris* não apresentou variações na fotossíntese quando em diferentes tratamentos de estresse por ferro.
- Não foram observadas variações nas enzimas antioxidantes nas plantas de *P. vulgaris*, sendo que esse resultado sinaliza a utilização pela espécie de vias não enzimáticas para combate aos EROS.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSKI, J. M. **Respostas morfológicas de *Ipomoea batatas* L. em função da concentração de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2011.
- AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro.** Dissertação de mestrado. Ufpel. 2010.
- ANDERSON, M. D; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- ARAUJO, R. A. **Estresse por alumínio alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades do maracujazeiro.** 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- ARUNACHALAM, R.; PAULKUMAR, K.; RANJITSINGH, A.J.A. & ANNADURAI, G. Environmental assessment due to air pollution near iron smelting industry. **J. Environ. Sci. Technol.**, v. 2: p. 179-186. 2009.
- BATAGLIA, O. C. & MASCARENHAS, H.A.A. Toxicidade de ferro em soja. **Bragantia**, v. 40, n. 1, 1981.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, 44, 276-287, 1971.
- BEWLEY, J.D. & BLACK M. **Physiology and biochemistry of seeds.** New York: Springer-Verlag. 1983.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Brasília: Mapa/ACS, 399p. 2009.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.I.C.; RENGEL, Z. & ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner P., editor. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.** Elsevier; Amsterdam. 2012.
- CANATTO, B. F. **Caracterização geoquímica dos sedimentos da Bacia do Rio Gualaxo do Norte.** Monografia Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Geologia, 2017.
- CHAKRAVARTY, B. & SRIVASTAVA, S. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. **Mutat Res** 283:287–294.1992.
- CHANDRA, R. & KANG, H. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. **Forest science and technology**, v. 12, n. 2, p. 55-61, 2015.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.

CHEN, S.; YANG, J.; ZHANG, M.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. **Environmental and Experimental Botany**. v. 122, p. 126-140, 2016.

DE DORLODOT, S. ; LUTTS, S. & BERTIN P. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. *J. Plant Nutr.*, 28, 1–20. 2005.

DEL LONGO, O. T.; GOINZLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

DNPM - Departamento nacional de produção mineral, 2016. Disponível em:

[http://www.dnpm.gov.br/assuntos/ao-publico/anuariomineral/arquivos/ANUARIO\\_MINERAL\\_2010.pdf/view](http://www.dnpm.gov.br/assuntos/ao-publico/anuariomineral/arquivos/ANUARIO_MINERAL_2010.pdf/view) . Acesso 13maio. 2019.

EL RASAFI, T.; NOURI, M.; BOUDA, S. & HADDIOUI, A. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. **Ekológia (Bratislava)**, v. 35, n. 3, p. 213-223, 2016.

ELSTNER, F. & OSSWALD, W. Mechanism of oxygen activation during plant stress., **Proc. R. Sci. Edinb.**, v. 102, p. 131-154.1994.

FERREIRA, A. G. & BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323p, 2005.

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

FOURCROY, P.; VANSUYT, G.; KUSHNIR, S.; INZÉ, D.; BRIAT, J.F. Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1-9. 2004.

GALAZZI, E. B. **Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no estado do Espírito Santo**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

GIANNOPOLITIS, C.N & RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59:309-314, 1997.

GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 58-68, 2008.

HARGEMEYER, J. & BRECKLE S.W. Growth under trace element stress. In Waisel, Y., Ashel, A.(Eds.), **Plant roots. e hidden half** (p. 415–433). New York: Marcel Dekker. 1996

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

- HELL, R., & STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.
- HOAGLAND, D. R & ARNON, DI. The waterculture method for growing plants without soil. **Berkeley, CA: Agric. Exp. Stn.**, Univ. of California. 1950.
- JUCOSKI, G. O. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo** em *Eugenia uniflora* L. Universidade Federal de Viçosa. 2011.
- KALAJI, H.M.; SCHANSKER,G; BRESTIC,M.; BUSSOTTI, F.; CALATAYUD, A.; FERRONI, WOJCIECH,B.A. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Photosynthesis Research**, v.132, p.13–66, 2017.
- KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M., & INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). **Plant Physiology**, v. 107, n. 3, p. 725-735, 1995.
- KAR, M. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; FIGUEIRA, F. F.; CAMPOSTRINI, E.; DOBBSS, L. B.& RAMOS, A. C. Níveis tóxicos de ferro em lavouras de café conilon (*Coffea canephora* L.) em solos de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v. 11, n.2, p. 255-266, 2016.
- KOBAYASHI, T. & NISHIZAWA, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152,2012.
- LAURETT, L.; FERNANDES, A. A.; SCHMILDT, E. R.; ALMEIDA, C. P.& PINTO, M. L. P. B.Desempenho da alface e da rúcula em diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 60, n. 1, p. 45-52, 2017.
- LI, W.; KHAN, M.A.; YAMAGUCHI, S. & KAMIYA Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regul.**, v. 46, p. 45-50, 2005.
- LICHTHENTALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v, 148, p. 350-382 1987.
- LINGUA, G.; FRANCHIN, C.; TODESCHINI, V.; CASTIGLIONE, S.; BIONDI, S., BURLANDO, B.; PARRAVICINI, V.; TORRIGIANI, P. & BERTA G. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.*, 153, 137–147, 2008.
- MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. D.; PONTE, L. F. A.& SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **ActaBotânica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342-349. 2012.
- MAGUIRE J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177.1962.

- MCDONALD, I.; SLOAN, G.C.; ZIJLSTRA, A.A.; MATSUNAGA, N.; MATSUURA, M.; KRAEMER, K.E.; MEHRABAN, P.; ZADEH, A.A.; SADEGHIPOUR, H.R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition, **Asian journal of Plant Sci.** v. 7, p.251-259, 2008.
- MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 209-220, 2010.
- MOHAMED, A. A. & ALY, AMINA, A. Iron deficiency stimulated some enzymes activity, lipid peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced in vitro. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, n. 1, p. 179-184, 2004.
- MORRISSEY, J. & GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2009.
- MURGIA, I. & MORANDINI, P. Iron deficiency prolongs seed dormancy in Arabidopsis plants. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 2077, 2017.
- NASEER, S.; NISAR, A.; ASHRAF, M. Effect of salt stress on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Pak. J. Biol. Sci.**, 4: 359-360. 2001.
- NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D. & SREEKANTH T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 199-216, 2010.
- NASEER, S.; NISAR, A. & ASHRAF, M. Effect of salt stress on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 4, n. 3, p. 359–360, 2001.
- NENOVA, V. Effect of iron supply on growth and photosystem II efficiency of pea plants. **Gen.Appl. Plant Physiol.** p. 81-90.2006.
- NENOVA, V. R. Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. **Acta Physiol Plant**, v.31, p.385-391, 2009.
- NETO; A.A.O. Evolução dos custos de produção de feijão no Brasil e sua rentabilidade. Safra 2010/11 a 2015/16. **Compêndio de estudos CONAB** – Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, v. 1. 2017.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R. & MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**v. 11, p.137-143, 1999.
- PEKKER, I.; TEL-OR, E. & MITTLER, R. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 429-438, 2002.
- PEREIRA, E. G. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga.** Tese de Doutorado. Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 54 pg. 2006.

PINTO, S. D. S.; SOUZA, A. E. D.; OLIVA, M. A. & PEREIRA, E.G. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Scientia Agricola*, v. 73,n.3, p. 217-226, 2016.

RAVET, K.; TOURAINE, B. ; BOUCHEREZ, J. ; BRIAT, J.F.; GAYMARD, F.& CELLIER, F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant J.** v. 57 p. 400-412, 2009.

RODRIGUES, A. C. D.; DOS SANTOS, A. M.; DOS SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.;& SOBRINHO, N. M. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

SANTOS JUNIOR, R. N. Fisiologia de Acessos de *Jatropha Curcas* L. Cultivados em Solo Contendo Lama do Rio Doce. 2018. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.**

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Resv.* 38, p. 995-1014, 2005.

SHU, X.; YIN, L.; ZHANG, Q.& WANG, W. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. **Environ.Sci. Pollut. Res.**, v. 19, p. 893-902, 2012.

SIMONETE, M. A., & KIEHL, J. D. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 555-563, 2002.

SINHA, 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**, v.62, p.1340-1350, 2006.

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**.v. 154, p. 269-277, 2009.

STRASSER, B. J. & STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis, (Ed.) **Photosynthesis: from 74 Light to Biosphere**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 977-980, 1995.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S. & GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochim. Biophys. Acta** (BBA), p.1313-1326, 2010.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; DO CANTO, M. W.& HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

- TSIMILLI-MICHAEL, M. & STRASSER, R. J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **PhotosynthesisResearch.**, v.117, p.289- 320, 2013.
- VERMA, L. & PANDEY, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research**, v.6, n.8, 2017.
- VIANA, J. H. M. & COSTA, A. M. da A ciência do solo como instrumento para a recuperação das áreas afetadas pelo desastre de Mariana e dos solos na Bacia do Rio Doce. Embrapa Milho e Sorgo. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 42, n. 1, p. 24-27, 2016.
- VITORINO, H. A. Compostos de ferro de interesse farmacológico: avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.** 2015.
- WANDERLEY, L. J.; MANSUR, M. S.; MILANEZ, B. & PINTO, R. G. Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socio ambientais. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 30-35, 2016.
- WIERZBICKA, M. & OBIDZINSKA J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. **Plant Sci.** v.137, p. 155-171.1998.
- YANG, Y.; WEI, X.; LU, J.; YOU, J.; WANG, W. & SHI R. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 73, p. 1982–1987.2010.
- YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S. & AHMAD A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 86, p. 1–17,2011.
- ZHANG, L.; LI, G.; WANG, M.; DI, D.; SUN, L.; KRONZUCKER, H. J. & SHI, W. Excess iron stress reduces root tip zone growth through nitric oxide-mediated repression of potassium homeostasis in Arabidopsis. **New Phytologist**, v. 219,n.1, p. 259-274. 2018.

## CAPÍTULO 2

### RESUMO

Muitos processos fisiológicos nos vegetais são dependentes da presença do Ferro (Fe), seja como elemento estrutural ou cofator na ação enzimática. Porém, quando em altas doses esse metal apresenta toxicidade ao organismo. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do Fe sobre a fisiologia do milho híbrido *Zea mays*. As plantas foram tratadas com duas fontes de Fe ( $\text{Fe}^{+2}$  e Fe-EDTA) nas doses de 1, 4 e 8 mM. Foram avaliadas as Taxas de germinação, IVG, crescimento inicial (10, 20 e 30 dias pós germinação), pigmentos cloroplastídeos e fluorescência da clorofila a. Também foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e POX. O Fe não promoveu modificações na germinação das sementes de *Z. mays*, porém atuou no crescimento inicial gerando retardo do crescimento e da alocação de biomassa para os tratamentos  $\text{Fe}^{+2}$  (8 mM) e Fe-EDTA (4 e 8 mM), a área foliar não apresentou variações significativas entre os tratamentos. Os pigmentos clorofila a, clorofila b e carotenoides apresentaram variações significativas em todos os tratamentos com Fe, demonstrando a ação desse metal no processo de clorose foliar. A eficiência da fotossíntese permaneceu constante em todos os tratamentos. A enzima POX apresentou ação para  $\text{Fe}^{+2}$  (8 mM), atuando como ação secundária dado o período das análises, já as demais enzimas não apresentaram variações ao comparadas ao controle.

Palavras chave: Estresse; Fisiologia; Germinação; Metal pesado, Crescimento

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro desempenha um papel importante nas reações de redox, bem como no transporte de elétrons, a síntese de DNA, e fixação de nitrogênio e é, portanto, um elemento essencial para os organismos vivos (LIU et al., 2021). A disponibilidade de ferro bioassimilável no ambiente é baixa, especialmente sob condições aeróbicas na faixa de pH alto. Portanto, as plantas desenvolveram mecanismos eficientes de absorção de ferro (KOBAYASHI et al., 2019). Toda via em condições anóxicas e de pH ácido o metal é reduzido e fica biodisponível aos vegetais (KROHLING et al. 2016), e em elevadas concentrações no solo, pode levar à toxicidade ou alterações nutricionais, que podem afetar negativamente o metabolismo da planta (VERMA e PANDEY, 2017; HASAN et al 2020; RODRIGUES FILHO et al. 2021).

A presença do elemento ferro em solos alagáveis ou em áreas de contato com atividade de mineração é um fenômeno preocupante, considerando seu potencial de toxicidade (JUCOSKY, 2011). A permanência do metal nos ciclos biogeoquímicos, afeta tanto espécies de vegetação próximas às fontes do mineral, como de áreas adjacente (COTTA et al., 2006; MARENGONI et al., 2013). Por não apresentar características biodegradáveis, são raras as espécies com capacidade de tolerância ou que conseguem evitar a absorção desse elemento (LIU et al., 2021).

Desta forma, entende-se que a compreensão dos efeitos ocasionados pelo aumento na concentração de ferro nessas espécies, pode elucidar as rotas ecofisiológicas e metabólicas de plantas submetidas ao estresse por metais, além de incitar debates de cunho socioeconômico, já que muitas economias locais dependem da base mineradora (ALTANGEREL et al., 2017; PANDEY et al., 2017).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi caracterizar as respostas ecofisiológica da espécie *Zea mays* submetida ao estresse por ferro.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de *Z. mays* híbrido foram adquiridas comercialmente de Monsanto S.A. lote AG1051 e armazenadas em câmara fria a 5° C e abrigadas de luz por sete dias.

Foram montadas sete baterias caualizadas, com três placas de Petri e 20 sementes cada, totalizando 60 sementes por bateria. A primeira bateria foi o controle onde utilizou – se 15 ml de água destilada, as demais baterias seguiram as concentrações de, 1mM, 4mM e 8mM dos seguintes agentes Sulfato de ferro (Fe<sup>+2</sup>) e Fe-EDTA com 15 ml de cada respectiva solução (FERREIRA e BORGUETTI, 2005). As soluções de Ferro foram produzidas seguindo o protocolo estabelecido por Simonete e Kiehl (2002) para efeito de biodisponibilidade pelas plantas.

As médias dos tratamentos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando o programa Sisvar.

### 2.1. Teste de Germinação

A germinação foi conduzida em câmara de germinação B.O.D., utilizando-se a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo 12h/12h por um período de 7 dias. A germinação foi verificada diariamente durante todo o experimento, considerando germinada a semente que apresentou protrusão da radícula com pelo menos 2mm através do tegumento (BRASIL, 2009).

Após sete dias de experimento foram efetuadas a avaliação de porcentagem de germinação (%G) e índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\%G = \sum G \times 100/100$$

$$IVG = \sum (ni/ti)$$

Onde: %G: porcentagem de germinação;  $\sum G$ : somatório do número de plântulas germinadas por tratamento; 100: número máximo possível de plântulas por tratamento.

Ni = número de sementes que germinaram no tempo 'i'; ti= tempo após instalação do teste.

## **2.2. Análise de desenvolvimento inicial**

Foram utilizados vasos de polietileno de 0,5L com substrato não adubado mais areia lavada na proporção 1:1, sendo semeada uma planta por vaso. As baterias (Controle, Fe<sup>+2</sup> e Fe-EDTA) foram montadas com 20 vasos cada, totalizando 20 plantas para cada tratamento.

Dez dias após a germinação as plantas apresentavam estágio V2 e foram submetidas aos respectivos tratamentos com as soluções de Ferro aplicadas via solo. O cultivo foi realizado em sala de crescimento a 25° C e fotoperíodo de 12h. Todas as plântulas foram mantidas em solução de Hoagland a meia força iônica e pH 5,0 (HOAGLAND e ARNON, 1950).

Para avaliar o crescimento das plântulas, aos 10, 20 e 30 dias após germinação foram realizadas as seguintes medidas de crescimento: Área foliar (AF) determinada em medidor de área (LI-COR Modelo 3100, Lincoln, Nebraska, USA), comprimento do caule, comprimento da raiz, massa seca do caule e massa seca da raiz.

## **2.3. Extração e quantificação de pigmentos cloroplastídeos**

A determinação dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides foi realizada ao término do experimento, no 30º dia. Foram utilizadas três replicatas, cada uma com 20 mg de massa fresca foliar sendo homogeneizada em 5 ml de acetona (80%) gelada com o auxílio de almofariz e pistilo. O material foi filtrado utilizando-se funil e papel filtro. O líquido filtrado foi então armazenado em balão volumétrico de 10ml envolvido em papel alumínio e PVC.

Foi utilizado espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) em leitura dos comprimentos de onda 470, 645 e 662 nm. As concentrações dos pigmentos foram encontradas segundo Lichtenthaler (1987), utilizando – se as seguintes equações:

$$Ca = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$Cb = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$C = (1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb) / 214$$

Onde: Ca (quantidade de clorofila a); Cb (quantidade de clorofila b); C (quantidade de carotenoides).

Os resultados encontrados foram expressos em mg por grama de massa seca (mg g<sup>-1</sup> MS).

#### 2.4. Análise da fluorescência da clorofila a

As medidas de fluorescência da clorofila a foram tomadas no dia 30 após a germinação com auxílio de fluorômetro portátil modelo Handy-PEA (Photosynthetic Efficiency Analyser) Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norfolk, UK.

Foram selecionadas aleatoriamente 10 plantas por tratamento, dessas a segunda folha mais alta no colmo foi clipada para a leitura. As folhas selecionadas foram adaptadas a 40 minutos de escuro por meio de cliques foliares para a oxidação completa do sistema fotossintético. Os resultados obtidos foram posteriormente tabulados em planilha eletrônica utilizando-se o software PEA Plus v1.11. A partir desta análise, foram calculados os parâmetros biofísicos que quantificam o fluxo de energia através da cadeia transportadora de elétrons por meio do teste-JIP (STRASSER e STRASSER, 1995).

Os parâmetros avaliados foram: Fv/Fm: Rendimento quântico máximo do FSII, phi(Po): Rendimento quântico máximo do FSII, psi(Eo): Rendimento quântico do transporte de elétrons a QA-, phi (Eo): Eficiência da movimentação de elétrons na cadeia de transporte de elétrons após a QA-, delta(Ro): Eficiência da movimentação dos elétrons do intersistema para os receptores finais de FSI, phi(Ro): Eficiência da movimentação dos elétrons do intersistema para os receptores finais de FSI, Plabs: Conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para redução dos receptores finais do FSI e

PItotal: Conservação de energia dos fótons absorvidos pelo FSII para redução dos receptores finais do FSI.

## **2.5. Atividades das enzimas antioxidantes**

A atividade das enzimas Superóxido-dismutase, Peroxidase e Catalase foram verificados nas plântulas jovens com 30 dias pós germinação. Para a extração das enzimas antioxidantes, 30 mg de material vegetal foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTANa<sub>2</sub> 0,1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v).

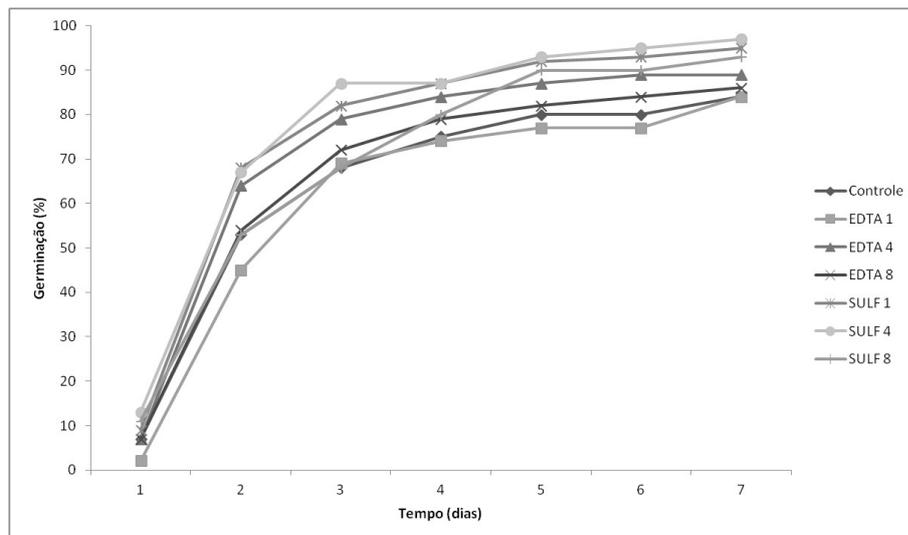
As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e o homogeneizado centrifugado a 12000 rppm durante 15 min, a 4 °C. Utilizou-se o sobrenadante para os ensaios das atividades da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase (POX). A atividade da SOD foi baseada em Del Longo et al. (1993), Giannopolitis e Ries (1997) e Beauchamp e Fridovich (1971), com a reação sendo conduzida a 25 °C em câmara iluminada com lâmpada de 15W. Após 6 minutos de exposição, procedeu-se a leitura em 560nm. A atividade da POX foi medida baseada em Kar e Mishra (1976) e Chance e Maehley (1955) com a reação a temperatura ambiente por 2 minutos seguido de leitura a 420nm; e a atividade da CAT seguiu o protocolo de Havir e Mchale (1987) e Anderson et al. (1995), realizado a temperatura ambiente com leitura a 240nm por 2 minutos. Foram utilizadas três repetições com duplicatas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) (PEIXOTO et al., 1999).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Teste de Germinação

As sementes de *Z. mays* tratadas em diferentes fontes e concentrações de ferro não apresentaram variações significativas no tempo de germinação completando esse processo em 7 dias (Figura 1).

Figura 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação de *Z. mays*. Taxa de germinação durante 7 dias.



Também não foram observados efeitos significativos dos poluentes sobre a porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos do estresse por ferro na porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), em sementes de sementes de *Z. mays*.

Tratamento	%G	IVG
Controle	84,00 ± 18,18 <sup>a</sup>	9,57 ± 2,65 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	84,00 ± 3,26 <sup>a</sup>	8,56 ± 0,99 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	89,00 ± 8,24 <sup>a</sup>	10,62 ± 0,93 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	86,00 ± 6,92 <sup>a</sup>	9,85 ± 1,28 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	95,00 ± 3,82 <sup>a</sup>	11,43 ± 0,41 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	97,00 ± 6,00 <sup>a</sup>	12,10 ± 0,99 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	93,00 ± 6,00 <sup>a</sup>	10,57 ± 0,22 <sup>a</sup>

Estudos realizados com *Z. mays* demonstraram que ação tóxica do ferro na fase de germinação gera uma diminuição da atividade mitótica devido a clatogênese dos cromossomos, oxidação e danos em proteínas e interferência na síntese de DNA (NAGAJYOTI et al. 2010, KOBAYASHI e NISHIZAWA, 2012).

Entre tanto como o período de germinação e crescimento inicial é crítico para o sucesso reprodutivo dos vegetais várias espécies desenvolveram uma gama de mecanismos de proteção a injúrias químicas e físicas (LI et al. 2005), que protegem os meristemas com eficiência ao atingir padrões acima da concentração ótima, em torno de 0,9 mM (EL RASAFI et al. 2016).

Os mecanismos de defesa da fase de germinação (LI et al. 2005) atuaram com eficiência sobre as fontes EDTA e  $\text{Fe}^{+2}$ , eliminando os efeitos deletérios do metal, refletindo sobre a %G e IVG fazendo com que esses não apresentassem diferenças significativas entre os tratamentos avaliados.

### **3.2. Análise de desenvolvimento inicial**

Avaliando o crescimento radicular de *Z. mays* sob influência do ferro observa-se que as plantas cultivadas com EDTA 4mM e 8mM e  $\text{Fe}^{+2}$  8mM apresentaram diminuição significativa de suas raízes (Tabela 2, Figura 2). O resultado corrobora com os estudos de Saeed et al (2020) que ao avaliar a influência do ferro sobre o crescimento do milho híbrido (*Z. mays* L.) concluíram que há uma correlação negativa entre concentração do poluente e crescimento da planta, onde concentrações acima de 8 ppm apresentam resultados negativos significativos sobre o crescimento e desenvolvimento das raízes do cultivar.

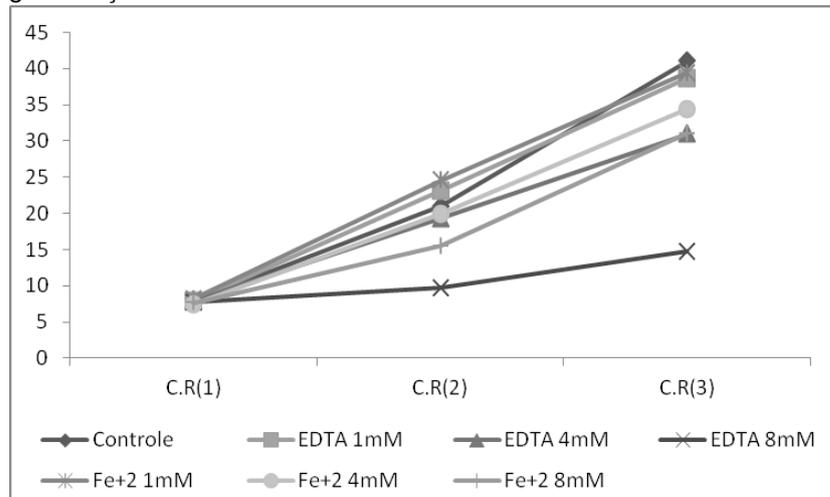
Alterações no crescimento em plantas sob estresse férrico estão relacionados as consequências negativas exercidas pelo poluente nos processos de divisão celular e expansão da parede celular (HARGEMEYER e BRECKLE, 1996; NASEER et al., 2010), bem como na produção de compostos secundários e hormônios (SAEED et al., 2020). Em *Z. mays* o acúmulo de ferro gera efeito na velocidade de crescimento e alocação de biomassa principalmente nas raízes (VERMA e PANDEY, 2017). O contato direto da raiz com o contaminante pode ser fator determinante para uma maior

expressão de variações quando da avaliação da toxicidade de metais (YANG et al., 2010; YUSUF et al., 2011; LIU et al., 2021).

Tabela 2: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.

Tratamento	C.R(1)	C.R(2)	C.R(3)
Controle	7,96 ± 0,76 <sup>a</sup>	20,98 ± 1,38 <sup>cd</sup>	41,02 ± 4,45 <sup>c</sup>
EDTA 1mM	7,84 ± 1,23 <sup>a</sup>	23,16 ± 3,18 <sup>cd</sup>	38,64 ± 2,64 <sup>c</sup>
EDTA 4mM	7,88 ± 0,96 <sup>a</sup>	19,28 ± 1,69 <sup>bc</sup>	<b>30,96 ± 3,44<sup>b</sup></b>
EDTA 8mM	7,78 ± 1,05 <sup>a</sup>	<b>9,68 ± 1,36<sup>a</sup></b>	<b>14,70 ± 1,86<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	8,20 ± 0,98 <sup>a</sup>	24,54 ± 2,40 <sup>d</sup>	39,40 ± 1,47 <sup>bc</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	7,48 ± 0,90 <sup>a</sup>	19,96 ± 1,35 <sup>c</sup>	34,38 ± 1,78 <sup>bc</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	7,64 ± 0,70 <sup>a</sup>	<b>15,48 ± 2,59<sup>b</sup></b>	<b>31,00 ± 2,12<sup>b</sup></b>

Figura 2: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.



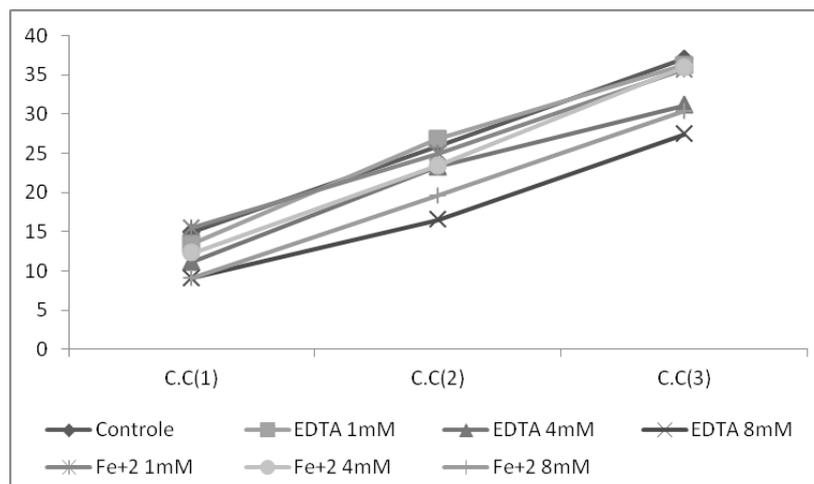
Os efeitos do ferro sobre o crescimento do caule de *Z. mays* foram similares aos observados para o crescimento radicular, onde plantas cultivadas com EDTA 4mM e 8mM e Fe<sup>+2</sup> 8mM foram afetadas significativamente (Tabela 3, Figura 3). Porém essa variação é observada desde a medida tomada com 10 dias de germinação e perdura durante todo o experimento, diferente do efeito nas raízes onde a afetação é perceptível apenas com 20 dias de germinação.

A raiz está em contato direto com o poluente apresentando ações mais agudas em seus efeitos (LIU et al., 2021), já o caule recebe o poluente via transportador YS1 já quelado na raiz pela ação de fotossideróforos (JUCOSKY, 2011; TRIPATHI et al. 2018), e seu armazenamento ocorre preferencialmente no apoplasto, como hidróxido e sal de fosfato, e seu excesso pode ocasionar efeitos fisiológicos (BRIAT e LEBRUN, 1999). Outro fato relevante é a deposição do ferro nas cristas mitocondriais, acarretando queda na taxa respiratória e atraso no desenvolvimento do vegetal (NENOVA, 2006; MCDONALD et al., 2008).

Tabela 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) do caule (C.C) *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.

Tratamento	C.C(1)	C.C(2)	C.C(3)
Controle	14,98 ± 1,53 <sup>cd</sup>	25,92 ± 2,10 <sup>bc</sup>	37,04 ± 1,89 <sup>b</sup>
EDTA 1mM	13,44 ± 1,22 <sup>bcd</sup>	26,84 ± 1,31 <sup>c</sup>	36,26 ± 2,08 <sup>b</sup>
EDTA 4mM	<b>11,14 ± 1,41<sup>ab</sup></b>	23,22 ± 1,40 <sup>b</sup>	<b>31,10 ± 1,85<sup>a</sup></b>
EDTA 8mM	<b>9,12 ± 0,68<sup>a</sup></b>	<b>16,52 ± 1,80<sup>a</sup></b>	<b>27,42 ± 1,97<sup>a</sup></b>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	15,50 ± 2,63 <sup>d</sup>	24,98 ± 1,74 <sup>bc</sup>	35,72 ± 3,06 <sup>b</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	12,28 ± 0,71 <sup>bc</sup>	23,38 ± 2,25 <sup>bc</sup>	35,94 ± 1,93 <sup>b</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	<b>9,14 ± 0,64<sup>a</sup></b>	<b>19,56 ± 1,32<sup>a</sup></b>	<b>30,32 ± 1,98<sup>a</sup></b>

Figura 3: Efeitos do estresse por ferro no crescimento (cm) do caule *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.



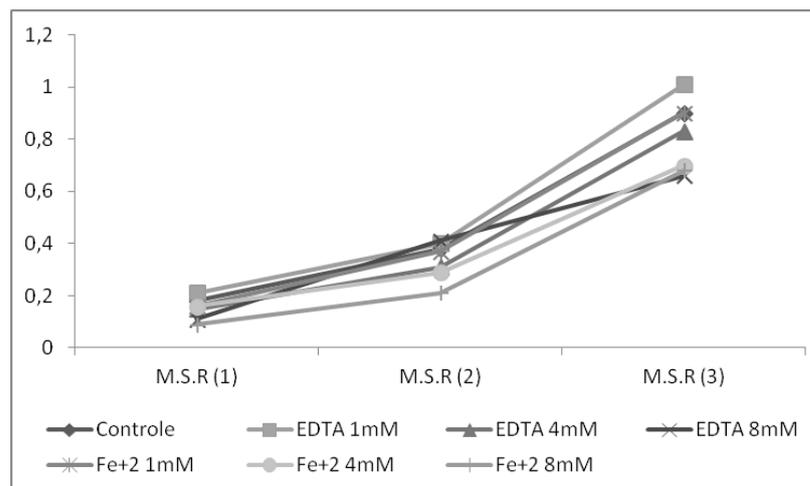
A massa seca das raízes de *Z. mays* cultivadas sob EDTA (4 e 8 mM) e  $\text{Fe}^{+2}$  (8 mM) apresentaram valores médios mais baixos que o controle ao final de 30 dias pós germinação (Tabela 4, Figura 4).

O estresse químico causado pelo ferro afeta diretamente a alocação de biomassa em raiz de milho (HASAN et al 2020) Esse efeito é causado pela interferência do metal no processo de respiração celular, bem como em modificações no fluxo de micronutrientes, sendo que tais efeitos são mais severos quanto mais elevada a concentração do poluentes (VERMA e PANDEY, 2017; SAEED et al., 2020).

Tabela 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz (M.R) de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.

Tratamento	M.S.R (1)	M.S.R (2)	M.S.R (3)
Controle	0,18 ± 0,07 <sup>bc</sup>	0,38 ± 0,13 <sup>ab</sup>	0,90 ± 0,06 <sup>b</sup>
EDTA 1mM	0,21 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>b</sup>
EDTA 4mM	0,15 ± 0,01 <sup>abc</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>ab</sup>	<b>0,83 ± 0,03<sup>a</sup></b>
EDTA 8mM	0,11 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>b</sup>	<b>0,66 ± 0,02<sup>a</sup></b>
$\text{Fe}^{+2}$ 1mM	0,16 ± 0,03 <sup>abc</sup>	0,37 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,90 ± 0,05 <sup>b</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 4mM	0,16 ± 0,02 <sup>abc</sup>	0,29 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>b</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 8mM	<b>0,09 ± 0,02<sup>a</sup></b>	0,21 ± 0,10 <sup>a</sup>	<b>0,68 ± 0,04<sup>a</sup></b>

Figura 4: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) da raiz de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.



Os valores médios de massa seca do caule para os tratamentos EDTA (4 e 8 mM) e  $\text{Fe}^{+2}$  (8 mM) foram mais baixos quando comparados ao controle (Tabela 5, Figura 5).

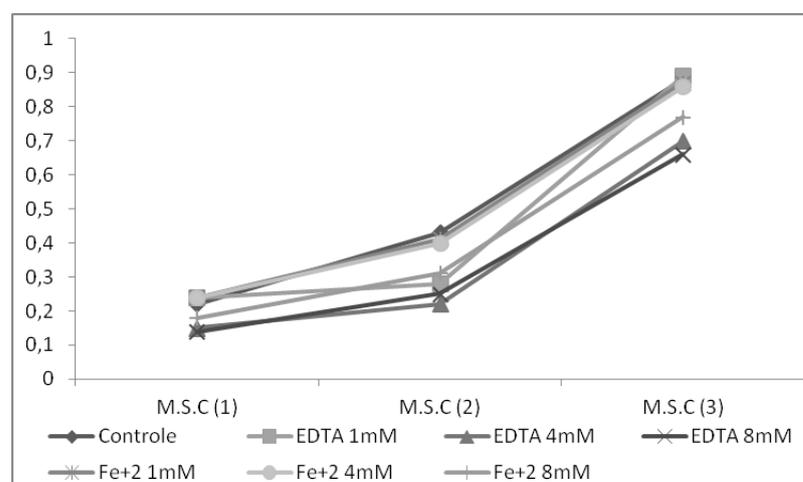
O ferro é transportado para a parte aérea da planta via xilema ligado a uma molécula de citrato, neste processo as formas queladas, como o EDTA, possuem maior mobilidade nos vasos condutores (JUCOSKY, 2011; VERMA e PANDEY, 2017).

Ao alcançar a porção aérea da planta o ferro se acumulará nos vacúolos do apoplasto ou nas cristas das mitocôndrias (NENOVA, 2006), sendo que neste poderá ocasionar a queda da taxa respiratória e, conseqüentemente, atraso no crescimento e desenvolvimento do vegetal (MCDONALD et al., 2008).

Tabela 5: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) do caule (M.S.C) de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.

Tratamento	M.S.C (1)	M.S.C (2)	M.S.C (3)
Controle	0,22 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>c</sup>
EDTA 1mM	0,24 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>abc</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>c</sup>
EDTA 4mM	<b>0,15 ± 0,01<sup>ab</sup></b>	<b>0,22 ± 0,06<sup>a</sup></b>	<b>0,70 ± 0,01<sup>ab</sup></b>
EDTA 8mM	<b>0,14 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>0,25 ± 0,03<sup>ab</sup></b>	<b>0,66 ± 0,03<sup>a</sup></b>
$\text{Fe}^{+2}$ 1mM	0,24 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,41 ± 0,15 <sup>bc</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>c</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 4mM	0,24 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,40 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,86 ± 0,03 <sup>c</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 8mM	<b>0,18 ± 0,00<sup>a</sup></b>	0,31 ± 0,10 <sup>abc</sup>	<b>0,77 ± 0,05<sup>b</sup></b>

Figura 5: Efeitos do estresse por ferro na massa seca (g) do caule de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 10 (1), 20 (2) e 30 (3) dias de germinação.



A área foliar de *Z. mays* não apresentou variações significativas ao longo do tempo (Tabela 6).

Alterações morfológicas em folhas e raízes estão entre os efeitos tóxicos conhecidos do ferro em vegetais (MORRISSEY e GUERINOT, 2010). Essas alterações podem estar associadas a processos fisiológicos de transporte e complexação do metal (AHLERT, 2010), ou são reflexos diretos dos efeitos deletérios do poluente (HELL e STEPHAN, 2003; RODRIGUES FILHO et al. 2021). No presente trabalho as concentrações de ferro utilizadas não foram suficientes para gerar alterações morfológicas nas folhas do milho. Toda via, como os resultados morfológicos das raízes demonstraram variações significativas para as concentrações de ferro de 4 e 8 mM, entende-se que os mecanismos celulares de contenção do poluente (JUCOSKY, 2011; VERMA e PANDEY, 2015) atuaram de maneira satisfatória, inibindo o efeito tóxico na morfologia da parte aérea da planta.

Tabela 6: Efeitos do estresse por ferro na área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>), em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.

Tratamento	A.F (1)	AF (2)	AF (3)
Controle	21,80 ± 0,98 <sup>a</sup>	28,50 ± 3,70 <sup>a</sup>	41,27 ± 2,81 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	21,19 ± 0,68 <sup>a</sup>	36,10 ± 4,89 <sup>a</sup>	40,15 ± 1,56 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	21,63 ± 0,08 <sup>a</sup>	27,52 ± 7,26 <sup>a</sup>	37,42 ± 2,25 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	21,20 ± 0,78 <sup>a</sup>	29,75 ± 6,33 <sup>a</sup>	37,44 ± 2,48 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	21,16 ± 0,65 <sup>a</sup>	28,40 ± 5,10 <sup>a</sup>	40,55 ± 1,19 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	21,36 ± 0,81 <sup>a</sup>	32,57 ± 6,03 <sup>a</sup>	39,73 ± 2,99 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	21,25 ± 0,58 <sup>a</sup>	31,54 ± 8,96 <sup>a</sup>	38,56 ± 2,36 <sup>a</sup>

### 3.3. Pigmentos cloroplastídeos

Os pigmentos cloroplastídeos (clorofila a, clorofila b e carotenoides) apresentaram valores médios de concentração significativamente mais baixos que os valores do controle para todos os tratamentos avaliados (Tabela 7).

Os efeitos do ferro sobre os pigmentos cloroplastídicos ocorrem em duas frentes distintas, na primeira o metal atua inibindo a ação de enzimas foliares relacionadas a formação pigmentar, principalmente a enzima protoclorofilide-redutase (CHANDRA e KANG, 2015). Também pode gerar a inativação Clorofila a Oxigenase quando se liga

ao grupo sulfidrila da enzima, inativando as rotas de transformação da clorofila b (STREIT et al. 2005; GUIMARAES et al. 2008).

Em uma segunda linha atua desestabilizando a estrutura molecular de compostos orgânicos presentes nos plastídeos (JUCOSKI, 2011), gerando assim diminuição da concentração de Clorofila a e Carotenoides em plantas sob elevadas concentrações do metal (MCDONALD et al., 2008; ARUNACHALAM et al., 2009; VERMA e PANDEY, 2017; HASAN et al 2020; RODRIGUES FILHO et al. 2021).

Tabela 7: Efeitos do estresse por ferro na concentração dos pigmentos fotossintéticos ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) Clorofila a, Clorofila b e Carotenoides, em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações.

Tratamento	Clorofila A	Clorofila B	Carotenoides
Controle	$10,97 \pm 0,04^a$	$3,79 \pm 0,02^a$	$2,86 \pm 0,02^a$
EDTA 1mM	<b><math>3,19 \pm 0,03^f</math></b>	<b><math>1,59 \pm 0,03^e</math></b>	<b><math>0,90 \pm 0,01^e</math></b>
EDTA 4mM	<b><math>5,49 \pm 0,06^c</math></b>	<b><math>2,18 \pm 0,10^c</math></b>	<b><math>1,40 \pm 0,01^c</math></b>
EDTA 8mM	<b><math>4,08 \pm 0,05^e</math></b>	<b><math>1,98 \pm 0,12^d</math></b>	<b><math>1,23 \pm 0,00^d</math></b>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	<b><math>6,63 \pm 0,03^b</math></b>	<b><math>3,38 \pm 0,05^b</math></b>	<b><math>1,74 \pm 0,02^b</math></b>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	<b><math>3,86 \pm 0,04^e</math></b>	<b><math>1,78 \pm 0,04^d</math></b>	<b><math>1,08 \pm 0,01^{de}</math></b>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	<b><math>4,48 \pm 0,02^d</math></b>	<b><math>2,16 \pm 0,03^c</math></b>	<b><math>1,25 \pm 0,01^d</math></b>

### 3.4. Fluorescência da clorofila a

Apesar da diminuição significativa dos pigmentos cloroplastídeos entre os diferentes tratamentos em comparação com o controle os níveis fotossintéticos não foram afetados (Tabela 8, Figura 6).

O ferro é essencial para o funcionamento da cadeia bioquímica fotossintética (KOBAYASHI et al., 2019), atuando diretamente nos fotossistemas e citocromo B6F como co fator das cadeias de reações (NENOVA, 2009), e participando estruturalmente do complexo LHC (SHU et al., 2012; PINTO et al. 2016).

Porém, quando em concentrações tóxicas pode gerar modificações negativas no complexo fotossintético dos vegetais (LIU et al., 2021). O Fotossistema II é mais sensível à toxicidade do ferro, devido a ação de degradação da proteína D1 (KALAJI et al., 2017). Como esse Fotossistema apresenta maior plasticidade ocorrem elevações na densidade nos centros de reação, com vias a aperfeiçoar o processo energético, em resposta à ação tóxica do metal (GALAZZI, 2011; SANTOS JUNIOR, 2018).

Já o Fotossistema I apresenta maior tolerância às concentrações de ferro, preservando as reações Redox em seu interior (SANTOS JUNIOR, 2018), Porém, em doses altas do poluente, o comprometimento desta estrutura leva o vegetal a severas consequências fisiológicas (STRASSER et al. 2010; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2013), como, baixa assimilação final de elétrons e queda na formação de compostos redutores, NADPH<sub>2</sub> e ATP e alterações na carboxilação da fotossíntese com consequente queda da taxa de açúcares e crescimento (ARAUJO, 2012; CHEN et al. 2016).

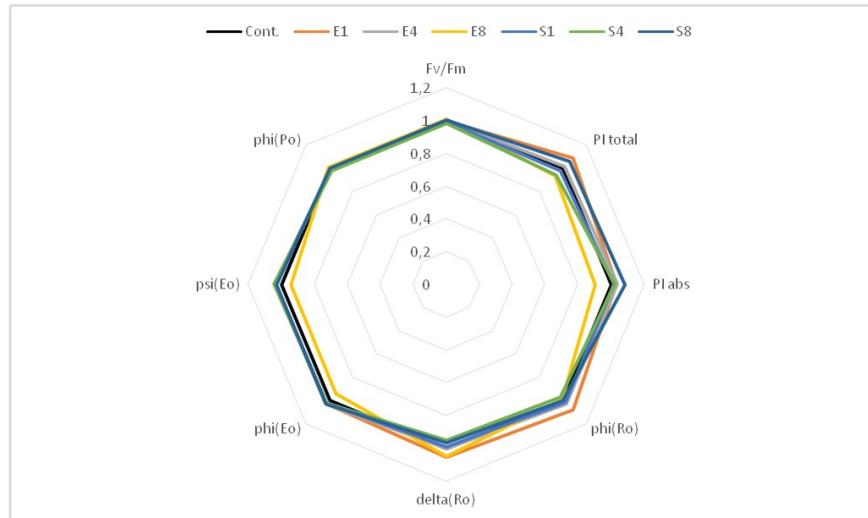
Em estudo com clones de arroz Pereira et al., 2013 observaram que plantas tratadas com Fe<sup>+2</sup> e Fe-EDTA apresentaram alterações em suas taxas de fotossíntese em concentrações superiores a 4 mM. Toda via tal modificação está relacionada a alterações na ação estomática, não foram evidenciando modificação nos fotossistemas. Já Poelking, 2008, em estudo com o gênero Ipomea, observou redução de 50% na taxa de fotossíntese em plantas tratadas com Fe-EDTA a 2 mM.

Como os resultados encontrados para *Z. mays* não evidenciam modificações nas funções bioquímicas dos fotossistemas e citocromo pode se assumir que as concentrações do poluente utilizadas no estudo não foram suficientes para afetar a fotossíntese do vegetal. Porém, como não foram avaliadas as conduções gasosas via estômatos tal afirmação é feita com cautela, pois não é conclusiva.

Tabela 8: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *Z. mays*, submetida e diferentes fontes de ferro em três concentração. Medidas tomadas após 30 dias de germinação.

Tratamento	Fv/Fm	phi(Po)	psi(Eo)	phi(Eo)	delta(Ro)	phi(Ro)	PI abs	PI total
Controle	7,81 ± 0,67 <sup>ab</sup>	7,81 ± 0,07 <sup>ab</sup>	5,10 ± 0,24 <sup>a</sup>	3,99 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,68 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,20 <sup>a</sup>	7,46 ± 2,80 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	7,79 ± 0,12 <sup>ab</sup>	7,78 ± 0,13 <sup>ab</sup>	5,29 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,12 ± 0,15 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,14 <sup>a</sup>	8,11 ± 2,14 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	7,77 ± 0,07 <sup>ab</sup>	7,76 ± 0,07 <sup>ab</sup>	5,31 ± 0,30 <sup>a</sup>	4,12 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,43 ± 0,32 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,54 ± 1,82 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	7,88 ± 0,05 <sup>b</sup>	7,87 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,80 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,44 <sup>a</sup>	3,59 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,22 <sup>a</sup>	7,01 ± 1,58 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 1mM	7,74 ± 0,11 <sup>ab</sup>	7,74 ± 0,12 <sup>ab</sup>	5,30 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,10 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,31 ± 1,87 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 4mM	7,68 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,67 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,73 <sup>a</sup>	4,09 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,46 <sup>a</sup>	7,03 ± 3,45 <sup>a</sup>
Fe <sup>+2</sup> 8mM	7,83 ± 0,09 <sup>ab</sup>	7,83 ± 0,09 <sup>ab</sup>	5,26 ± 0,26 <sup>a</sup>	4,12 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,89 ± 4,40 <sup>a</sup>

Figura 6: Efeitos do estresse por ferro na fluorescência da clorofila a de *Z. mays*, submetida a diferentes fontes de ferro em três concentrações. Medidas tomadas após 60 dias.



### 3.5. Atividades das enzimas antioxidantes

A assimilação de concentrações de ferro pelo vegetal acima dos limites fisiológicos de quelação, transporte e armazenamento, levam a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SAEED et al., 2020). Esses compostos são altamente reativos e, dentro da célula, podem gerar danos moleculares em lipídios, proteínas causando necrose de tecidos, e mutações no DNA (HELL e STEPHAN, 2003; STEIN et al., 2009).

Os vegetais apresentam uma linha não enzimática para defesa das ERO, onde compostos como: glutathiona, citrato e AIA atuam como antioxidantes, inativando as ERO e evitando os danos moleculares (ELSTNER e OSSWALD, 1994; PEKKER et al., 2002; FOURCROY et al. 2004; MOHAMED e ALY, 2004; SCANDALIOS, 2005; SAEED et al., 2020). Já a linha enzimática é composta por uma gama de enzimas que atuam sobre diferentes substratos dos radicais livres, sendo primária de defesa das células vegetais a SOD, que age na dismutação dos radicais superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SINHA, 2006). Porém o peróxido de hidrogênio é um produto tóxico às células e necessita ser eliminado, sendo essa ação efetuada pelas enzimas CAT ou POX que agem nos peroxissomos e cloroplastos. As POXs, devido a degradação de  $H_2O_2$  em  $OH^-$  agem no crescimento da célula vegetal via alongamento da parede (MAIA et al. 2012).

Na avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e POX de *Z. mays* tratada com diferentes fontes de ferro apenas o valor de POX apresentou variação significativa ( $\text{Fe}^{+2}$  8 mM) quando comparada ao controle (Tabela 9).

Como os vegetais foram tratados com ferro aos 10 dias de germinação e a avaliação enzimática foi conduzida com 30 dias as linhas de defesa primária de SOD já haviam atuado, e os teores da enzima normalizados pela fisiologia do vegetal. Já a linha secundária da POX é priorizada em plantas em estágios iniciais de crescimento devido ao seu efeito sobre o crescimento da célula vegetal (MAIA et al. 2012).

Para o *Z. mays* a linha enzimática de defesa será acionada com maior intensidade quanto mais altas as concentrações de ferro, pois em concentrações intermediárias a ação conjunta dos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos são priorizadas pela espécie (SAEED et al., 2020)

Tabela 9: Efeitos do estresse por ferro sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Peroxidase Total (POX) e catalase (CAT) (g-1 MS), em plantas de *Z. mays* cultivada em duas diferentes fontes de ferro em diferentes concentrações. Avaliação efetuada com 30 dias de germinação

Tratamento	SOD	CAT	POX
Controle	1,21 ± 0,43 <sup>a</sup>	260,57 ± 103,16 <sup>a</sup>	1608,88 ± 308,51 <sup>a</sup>
EDTA 1mM	1,93 ± 0,23 <sup>a</sup>	295,13 ± 73,06 <sup>a</sup>	1487,85 ± 65,21 <sup>a</sup>
EDTA 4mM	1,97 ± 0,46 <sup>a</sup>	150,81 ± 53,82 <sup>a</sup>	1630,27 ± 261,92 <sup>a</sup>
EDTA 8mM	1,53 ± 0,24 <sup>a</sup>	297,57 ± 23,65 <sup>a</sup>	2000,26 ± 302,55 <sup>a</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 1mM	2,04 ± 0,30 <sup>a</sup>	250,36 ± 19,09 <sup>a</sup>	1449,15 ± 191,44 <sup>ab</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 4mM	2,74 ± 1,09 <sup>a</sup>	167,45 ± 78,97 <sup>a</sup>	1649,24 ± 333,68 <sup>a</sup>
$\text{Fe}^{+2}$ 8mM	2,07 ± 0,60 <sup>a</sup>	221,83 ± 87,93 <sup>a</sup>	<b>790,68 ± 267,85<sup>b</sup></b>

#### 4. CONCLUSÕES

O ferro não afeta a germinação de *Z. mays* permanecendo a % de germinação e IVG constantes nas diferentes concentrações do poluente. O crescimento inicial da espécie foi afetado nas concentrações de 8mM ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e 4 e 8 mM (Fe-EDTA) em 20 e 30 dias de germinação, ocasionando queda do crescimento radicular e parte aérea e suas respectivas biomassas. A área foliar não apresentou variações quanto à presença e concentração do poluente. O ferro afetou negativamente os teores de clorofila a, b e carotenoides, toda via tal variação não influenciou na integridade dos processos fisiológicos da fotossíntese. A atividade das enzimas SOD e CAT não foram evidenciadas neste estudo, POX apresentou atividade para  $\text{Fe}^{+2}$  na concentração de 8 mM.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLERT, R. J. **Análise proteômica diferencial em raízes de plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) submetidas ao estresse por ferro**. Dissertação de mestrado. Ufpel. 2010.
- ALTANGEREL, N.; ARIUNBOLD, G. O.; GORMAN, C.; ALKAHTANI, M. H.; BORREGO, E. J.; BOHLMAYER, D.; SCULLY, M. O. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(13), 3393-3396, 2017.
- ANDERSON, M. D; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.
- ARAUJO, R. A. **Estresse por alumínio alterações ecofisiológicas e bioquímicas em variedades do maracujazeiro**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- ARUNACHALAM, R.; PAULKUMAR, K.; RANJITSINGH, A.J.A. & ANNADURAI, G. Environmental assessment due to air pollution near iron smelting industry. **J. Environ. Sci. Technol.**, v. 2: p. 179-186. 2009.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, 44, 276-287, 1971.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399p, 2009.
- BRIAT J.F. & LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2 n.5. p.187–193, 1997.
- CHANDRA, R. & KANG, H. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. **Forest science and technology**, v. 12, n. 2, p. 55-61, 2015.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-775, 1955.
- CHEN, S.; YANG, J.; ZHANG, M.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. **Environmental and Experimental Botany**. v. 122, p. 126-140, 2016.
- COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira: PETAR, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, 29, 40-45, 2006.
- DEL LONGO, O. T.; GOINZLEZ, C. A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential to drought. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

- EL RASAFI, T.; NOURI, M.; BOUDA, S. & HADDIOUI, A. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. **Ekológia (Bratislava)**, v. 35, n. 3, p. 213-223, 2016.
- ELSTNER, F. & OSSWALD, W. Mechanism of oxygen activation during plant stress., **Proc. R. Sci. Edinb.**, v. 102, p. 131-154.1994.
- FERREIRA, A. G. & BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323p, 2005.
- FOURCROY, P.; VANSUYT, G.; KUSHNIR, S.; INZÉ, D.; BRIAT, J.F. Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the APX1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1-9. 2004.
- GALAZZI, E. B. **Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no estado do Espírito Santo**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.
- GIANNOPOLITIS, C.N & RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59:309-314, 1997.
- GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 58-68, 2008
- HARGEMEYER, J. & BRECKLE S.W. Growth under trace element stress. In Waisel, Y., Ashel, A.(Eds.), **Plant roots. e hidden half** (p. 415–433). New York: Marcel Dekker. 1996
- HASAN, M., RAFIQUE, S., ZAFAR, A., LOOMBA, S., KHAN, R., HASSAN, S. G., KHAN, M. W., ZAHRA, S., ZIA, M., MUSTAFA, G., SHU, X., IHSAN, Z., MAHMOOD, N. Physiological and anti-oxidative response of biologically and chemically synthesized iron oxide: Zea mays a case study. **Heliyon.**,26;6(8):e04595, 2020.
- HAVIR, E. A.& MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.
- HELL, R., & STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, n. 4, p. 541-551, 2003.
- HOAGLAND, D. R & ARNON, DI. The waterculture method for growing plants without soil. **Berkeley, CA: Agric. Exp. Stn.**, Univ. of California. 1950.
- JUCOSKI, G. O. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L.** Universidade Federal de Viçosa. 2011.
- KALAJI, H.M.; SCHANSKER, G; BRESTIC, M.; BUSSOTTI, F.; CALATAYUD, A.; FERRONI, WOJCIECH, B.A. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Photosynthesis Research**, v.132, p.13–66, 2017.

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

KOBAYASHI, T. & NISHIZAWA, N.K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.

KOBAYASHI, T., NOZOYE, T., NISHIZAWA, N. K. Iron transport and its regulation in plants. **Free Radic Biol Med**. 133:11-20, 2019.

KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; FIGUEIRA, F. F.; CAMPOSTRINI, E.; DOBBSS, L. B. & RAMOS, A. C. Níveis tóxicos de ferro em lavouras de café conilon (*Coffea canephora* L.) em solos de tabuleiros costeiros. **Coffee Science**, v. 11, n.2, p. 255-266, 2016.

LI, W.; KHAN, M.A.; YAMAGUCHI, S. & KAMIYA Y. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regul.**, v. 46, p. 45-50, 2005.

LICHTHENTALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v, 148, p. 350-382 1987.

LIU, Y., KONG, D., WU, H. L., LING, H. Q. Iron in plant-pathogen interactions. **J Exp Bot**. 17;72(6):2114-2124, 2021.

MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. D.; PONTE, L. F. A. & SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342-349. 2012

MAGUIRE J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177.1962.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P. D.; CHAMBO, A. P. S.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. **Química Nova**, 36(3), 359-363, 2013.

MCDONALD, I.; SLOAN, G.C.; ZIJLSTRA, A.A.; MATSUNAGA, N.; MATSUURA, M.; KRAEMER, K.E.; MEHRABAN, P.; ZADEH, A.A.; SADEGHIPOUR, H.R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition, **Asian journal of Plant Sci**. v. 7, p.251-259, 2008.

MOHAMED, A. A. & ALY, AMINA, A. Iron deficiency stimulated some enzymes activity, lipid peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced in vitro. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, n. 1, p. 179-184, 2004.

MORRISSEY, J. & GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4553-4567, 2010.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D. & SREEKANTH T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 199-216, 2010.

NASEER, S.; NISAR, A. & ASHRAF, M. Effect of salt stress on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 4, n. 3, p. 359–360, 2010.

NENOVA, V. Effect of iron supply on growth and photosystem II efficiency of pea plants. **Gen.Appl. Plant Physiol.** p. 81-90. 2006.

NENOVA, V. R. Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. **Acta Physiol Plant**, v.31, p.385-391, 2009.

PANDEY, N.; IQBAL, Z.; PANDEY, B. K.& SAWANT, S. V. Phytohormones and Drought Stress: Plant Responses to Transcriptional Regulation. **Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress**, v. 2, p. 477-504, 2017.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R. & MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**v. 11, p.137-143, 1999.

PEKKER, I.; TEL-OR, E. & MITTLER, R. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 429-438, 2002.

PEREIRA, E. G. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga.** Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 54 pg. 2006.

PINTO, S. D. S.; SOUZA, A. E. D.; OLIVA, M. A. & PEREIRA, E.G. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Scientia Agricola*, v. 73,n.3, p. 217-226, 2016.

POELKING, V. G. C. **Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de *Ipomoea pes-caprae* cultivada em diferentes concentrações de ferro.** Tese de mestrado em Fisiologia Vegetal, UFV, 2008.

RODRIGUES FILHO, J.; BORGES, V. C.; PERIN, I. T. A. L.; WAICHERT, R. H.; REIS, C. Iron Toxicity on Germination and Early Growth of *Cecropia hololeuca* Miq. **Ensaio e Ciência**, v. 24, p. 584-592, 2021.

SAEED S., ULLAH S., NAFEEES M., BIBI F., ULLAH R. Morphological assessment of glutamate zerovalent iron nanoparticles by scanning electron microscopy and its combined effect with indole acetic acid on amelioration of lead toxicity in maize (*Zea mays* L.). **Microsc Res Tech.** (12):1499-1506, 2020.

SANTOS JUNIOR, R. N. Fisiologia de Acessos de *Jatropha Curcas* L. Cultivados em Solo Contendo Lama do Rio Doce. 2018. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.**

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Resv.* 38, p. 995-1014, 2005.

SHU, X.; YIN, L.; ZHANG, Q.& WANG, W. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. **Environ.Sci. Pollut. Res.**, v. 19, p. 893-902, 2012.

SIMONETE, M. A., & KIEHL, J. D. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 555-563, 2002.

SINHA, 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**, v.62, p.1340-1350, 2006.

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**.v. 154, p. 269-277, 2009.

STRASSER, B. J. & STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis, (Ed.) **Photosynthesis: from 74 Light to Biosphere**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 977-980, 1995.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S. & GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)**, p.1313-1326, 2010.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; DO CANTO, M. W.& HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; GAUR, S.; SINGH, S.; YADAV, V.; LIU, S. & DUBEY, N. K. Acquisition and homeostasis of iron in higher plants and their probable role in abiotic stress tolerance. **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 86, 2018.

TSIMILLI-MICHAEL, M. & STRASSER, R. J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **Photosynthesis Research**., v.117, p.289- 320, 2013.

VERMA, L. & PANDEY, N. The Effect of Iron Toxicity on Seed Germination and Early Seedling Growth of Green Gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research**, v.6, n.8, 2017.

YANG, Y.; WEI, X.; LU, J.; YOU, J.; WANG, W. & SHI R. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 73, p. 1982–1987.2010.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S. & AHMAD A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 86, p. 1–17, 2011.