

EDUARDO GUSMÃO PEREIRA

EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS CAUSADOS PELA
DEPOSIÇÃO DE FERRO PARTICULADO EM *Clusia hilariana*,
UMA ESPÉCIE DE RESTINGA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

T

P436e
2006

Pereira, Eduardo Gusmão, 1977-

Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga / Eduardo Gusmão Pereira.

– Viçosa : UFV, 2006.

x, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marco Antonio Oliva Cano.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 55-61.

1. Fisiologia vegetal. 2. *Clusia hilariana* - Teor de ferro. 3. *Clusia hilariana* - Efeito da poluição do ar. 4. Fotossíntese. 5. Fluorescência. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

EDUARDO GUSMÃO PEREIRA

EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS CAUSADOS PELA
DEPOSIÇÃO DE FERRO PARTICULADO EM *Clusia hilariana*,
UMA ESPÉCIE DE RESTINGA

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

Aprovada: 07 de fevereiro de 2006

José Cambraia
(Conselheiro)

Andréa Miyasaka de Almeida
(Conselheira)

Luzimar Campos da Silva

Maria Neudes Sousa de Oliveira

Marco Antonio Oliva Cano
(Orientador)

*A Deus, à família e aos amigos,
dedico este trabalho*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de aprendizado;

Ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e aos professores, pela grande contribuição ao longo do curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

À SAMARCO MINERAÇÃO S.A. Usina de Pelotização de UBU – ES, pelo apoio financeiro e logístico;

Ao professor Marco Antonio Oliva, pela valiosa orientação e confiança;

Ao professor José Cambraia, pela grande colaboração;

Às professoras Andréa Miyasaka, Maria Neudes e Luzimar Campos pelas valiosas sugestões na banca de defesa, e a todos os outros professores que participaram na minha formação;

Ao Rogério Mauro Gomide, João Bosco Soares de Freitas, José Antônio Bhering e Domingos Sávio da Silva, pela grande contribuição prestada na realização deste trabalho;

A todos os amigos da Unidade de Crescimento de Plantas - UCP, especialmente Alan Costa, Cláudio Meira, Kacilda Kuki, Karla Ferreira, Rogério Ribas e Fábio Gomes, sem os quais não conseguiria concluir este trabalho;

Aos demais amigos que tive o prazer de desfrutar do agradável convívio, em especial, Leonardo Lucas, Ricardo Montanari, Lílian Hasegawa, Letícia Barbosa, Fernanda Segatto, Maria Luiza, Giovani Brito, Werner Antunes, Élcio Meira, Kelly Juliane, Carolina Jaramillo, Luiz Felipe, Michellia Pereira, Andreza Néri, Viviane Andrade e Dona Tereza;

A todos os colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal/UFV, pelo convívio;

Aos meus pais, Levi Barbosa e Maria dos Reis; aos meus irmãos, Silvana, César e Neide, pelo incentivo e compreensão ao período distante, mas na certeza de guardá-los sempre perto;

A Deus pelo dom precioso da vida.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 Efeito da aplicação de ferro em solução nutritiva	15
2.2 Efeito da aplicação do material sólido particulado de ferro ao solo	15
2.3 Efeito da aplicação do material sólido particulado de ferro na superfície foliar	16
2.4 Parâmetros avaliados.....	17
3. RESULTADOS.....	22
3.1 Efeitos da aplicação de ferro em solução nutritiva	22
3.2 Efeitos da aplicação de MSPFe ao solo	24
3.3 Avaliação dos efeitos da aplicação do MSPFe na superfície foliar	32
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Diagrama da câmara utilizada na aplicação do MSPFe.	17
Figura 2: Altura (A) e número de folhas (B), no início e final do experimento, de plantas de <i>C. hilariana</i> submetidas a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo.	25
Figura 3: Variação diária de fotossíntese (A) e condutância estomática (B) em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.	28
Figura 4: Acidez titulável no início e final do período luminoso em <i>C. hilariana</i> submetidas a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.	29
Figura 5: Taxa de transporte de elétrons (ETR; A) e rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$; B) em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, sob diferentes densidades de fluxo fotossintético.	30

Figura 6: Permeabilidade relativa de membranas em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.	31
Figura 7: Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar.....	32
Figura 8: Variação diurna de fotossíntese (A) e condutância estomática (B) em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.....	35
Figura 9. Temperatura foliar ao longo do dia em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, aos 45 dias após o início do experimento.	36
Figura 10: Acidez titulável no início e final do período luminoso em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.	36
Figura 11: Teor de clorofila <i>a</i> (A), <i>b</i> (B), carotenóides (C) e razão Clorofila <i>a/b</i> (D) em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.	38
Figura 12: Taxa de transporte de elétrons (ETR; A) e rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$; B) em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, sob diferentes densidades de fluxo fotossintético.....	39
Figura 13: Fluorescência mínima ou inicial (F_0 ; A) e eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m ; B), ao longo do dia, em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar.....	40
Figura 14: Permeabilidade relativa de membrana (A) e teor de MDA (B) em folhas de <i>C. hilariana</i> submetidas à aplicação de MSPFe na superfície foliar, aos 48 dias após o início do experimento.....	41
Quadro 1: Teor de ferro na parte aérea e sistema radicular em <i>C. hilariana</i> cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis e formas de ferro, em pH 4,0 e 5,5.	22
Quadro 2: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), C_i/C_a e eficiência do uso de água (WUE) em <i>C. hilariana</i> sob diferentes níveis e formas de ferro, em solução nutritiva nos pH 4,0 e 5,5.	23
Quadro 3: Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , carotenóides ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2} \times 10^{-3}$) e razão Clorofila <i>a/b</i> em <i>C. hilariana</i> sob diferentes níveis e formas de ferro, em solução nutritiva nos pH 4,0 e 5,5.	24

Quadro 4: Teor de ferro ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) nas folhas, caule e raízes em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.....	26
Quadro 5: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), C_i/C_a e eficiência do uso de água (WUE) em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo, em função do tempo (dias) após o início dos tratamentos (DAIT).	26
Quadro 6: Conteúdo de clorofila a, b, carotenóides ($\mu\text{g.m}^{-2} \times 10^{-3}$) e razão Clorofila a/b em <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.	29
Quadro 7: Atividades das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em folhas de <i>C. hilariana</i> submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.....	31
Quadro 8: Teor de ferro ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) nas folhas, caule e raízes em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.....	33
Quadro 9: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), C_i/C_a e eficiência do uso de água (WUE) em <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, em função do tempo (dias) após o início dos tratamentos (DAIT).....	34
Quadro 10: Atividades das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em folhas de <i>C. hilariana</i> submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.....	42

RESUMO

PEREIRA, Eduardo Gusmão; M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos causados pela deposição de ferro particulado em *Clusia hilariana*, uma espécie de restinga.** Orientador: Marco Antonio Oliva Cano. Conselheiros: José Cambraia, Andréa Miyasaka de Almeida.

Clusia hilariana é uma espécie que apresenta o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), de grande distribuição nas restingas brasileiras, onde desempenha importante papel ecológico. Com o objetivo de avaliar os efeitos das diferentes formas de deposição do material sólido particulado de ferro (MSPFe), em aspectos bioquímicos e fisiológicos, nesta planta, foram implantados três experimentos. No experimento inicial, plantas jovens foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland em pH 5,5 e 4,0, com duas fontes de ferro, o citrato de ferro III (0 e 2,0 mM) e o complexo FeEDTA (0; 1,0 e 2,0 mM). No segundo experimento, as plantas foram expostas a 6 e 18 mg.cm⁻².dia⁻¹ de MSPFe aplicados sobre o solo. O último experimento, com aplicação de 2,14 mg. cm⁻².dia⁻¹ de MSPFe sobre a superfície foliar, foi realizado após a construção de uma câmara de deposição de MSPFe, que simula o que ocorre naturalmente nas áreas sujeitas à poluição por ferro. A fonte de ferro disponível na solução nutritiva foi determinante para a ocorrência do estresse, os parâmetros de trocas gasosas, nesse experimento, foram prejudicados apenas com a exposição das plantas ao FeEDTA. Foi verificado maior teor de ferro nos tecidos vegetais expostos às diferentes formas de deposição do MSPFe, em relação aos respectivos controles. A aplicação do MSPFe sobre as folhas de *C. hilariana* causou reduções significativas em vários parâmetros avaliados, como altura da planta, número de folhas, fotossíntese, condutância estomática, fluorescência da clorofila *a*, teor de pigmentos e acumulação de ácidos orgânicos, além de aumento na permeabilidade relativa de membrana e redução na atividade da enzima catalase. Entretanto, a peroxidação de lipídios de membrana não sofreu alterações. Com a deposição do MSPFe sobre o solo, os mesmos parâmetros permaneceram invariáveis. Houve incremento significativo na atividade da enzima superóxido dismutase em decorrência da deposição do MSPFe no solo, indicando controle efetivo das espécies reativas de oxigênio. A resposta fisiológica em *C. hilariana*, como consequência da

aplicação do MSPFe, depende da forma de deposição, como evidenciado pelos diversos danos causados quando o MSPFe foi aplicado sobre a superfície foliar, em relação à aplicação do mesmo material ao solo. Provavelmente, os danos causados pela aplicação do MSPFe sobre as folhas de *C. hilariana*, não se deve, primeiramente, à toxidez do ferro, mas sim devido aos efeitos físicos da deposição. A tolerância de *C. hilariana*, encontrada nesse experimento, à elevada concentração de ferro no solo e conseqüente acúmulo deste metal, fornece indícios para sua utilização em estudos com objetivos de fitoextração do ferro em ambientes contaminados.

ABSTRACT

PEREIRA, Eduardo Gusmão; M.S., Universidade Federal de Viçosa, february, 2006. **Physiological and biochemical effects of iron ore dust in *Clusia hilariana*, a plant of restinga.** Advisor: Marco Antonio Oliva Cano. Committee Members: José Cambraia, Andréa Miyasaka de Almeida.

Clusia hilariana, a CAM plant with crucial ecological role, has a broad distribution in brazilian restingas. With the aim to evaluate the physiological and biochemical effects of iron ore particulate matter (MSPFe), deposited in different fashions, on this species, three distinct experiments were carried out. Young plants were hydroponic cultivated in Hoagland solution at pH 5,5 and 4,0, using two source of iron, iron citrate III (0 and 2,0 mM) and FeEDTA complex (0, 1 and 2,0 mM). On the second experiment the plants were exposed to 6 and 18 mg.cm⁻².day⁻¹ of MSPFe, applied directly on the soil surface. On the final experiment, 2,14 mg.cm⁻².day⁻¹ of MSPFe was applied on the leaf surface by keeping the plant inside a MSPFe deposition chamber, in order to simulate the phenomenon that takes place in the field. The source of available iron in the hydroponic solution was critical for the stress onset. The gas exchange parameters were only affected on plants treated with FeEDTA. The iron content in plant tissues was greater in plants exposed to MSPFe deposition treatments than the control plants. The deposition of MSPFe on leaf surface caused significant decrease of a number of parameters such as plant height, leaf number, net photosynthesis, stomatal conductance, chlorophyll a fluorescence, pigments content and organic acid accumulation, yonder increment on the relative membrane permeability, reduction of activity of catalase enzyme, without similar effect on lipid peroxidation. These effects were less dramatic on the treatment with MSPFe deposited on the soil surface. The enzymatic activity of superoxide dismutase was enhanced in those plants treated with MSPFe applied on the soil surface, revealing an effective control of the reactive oxygen species. Thus, the set of physiological response of *C. hilariana*, as a consequence of MSPFe applications depends upon the target of the deposition, as supported by the significant results obtained when the MSPFe was applied directly on the leaves surface. The damages caused by the applications of MSPFe on the leaves of *C. hilariana*, were probably due to a physical effect rather than a toxic effect of the iron. The tolerance of *C. hilariana* to the high

iron content in the soil, followed by iron accumulation in the plant, reveals the possibility of its use in iron phytoextraction of contaminated environments.

1. INTRODUÇÃO

Emissões de material sólido particulado (MSP) por fontes poluidoras, como indústrias ou áreas urbanas, podem afetar diversos níveis de organização de um sistema vegetacional. Ao nível de indivíduo as emissões podem proporcionar perdas em propriedades funcionais como fotossíntese, nutrição mineral, redução da biomassa e reprodução. Em um grau mais severo de risco ecológico, e a nível populacional, o MSP pode ocasionar danos ao ecossistema pela alteração na ciclagem de nutrientes ou no fluxo energético, culminando na redução da biodiversidade, diminuindo a capacidade de retorno ao estado original (Grantz et al., 2003).

O efeito do MSP na vegetação depende dos constituintes presentes na emissão, do tamanho das partículas, bem como do grau de tolerância dos vegetais e do ecossistema (Grantz et al., 2003). A sobrevivência de um indivíduo exposto ao MSP é determinada pelo genótipo, estágio de crescimento, disponibilidade de recursos e microhabitat (Levin, 1998; Grantz et al., 2003).

No litoral do Estado do Espírito Santo, uma das principais indústrias responsável pela exploração e beneficiamento do minério de Ferro (Fe) localiza-se próxima a fragmentos de restinga. Durante o processo de beneficiamento é gerado minério de ferro em pó (ou material sólido particulado de ferro - MSPFe), pequenas partículas que são suspensas e carregadas pelo vento. O MSPFe pode causar danos à vegetação por efeitos físicos: bloqueio da radiação luminosa, abrasamento, aquecimento foliar, alterações em processos como fotossíntese e transpiração; ou por efeitos químicos: alterações no pH, no estado nutricional e lixiviação de nutrientes das folhas. Além do agravante provocado pelo MSPFe, os danos causados pelo efeito tóxico do Fe no ambiente somam as conseqüências de sua absorção e acúmulo excessivo, à sua precipitação sobre as raízes, formando uma crosta de óxido férrico que altera a absorção de outros nutrientes como o fósforo, potássio e zinco (Howeler, 1973).

O Fe é um nutriente essencial para as plantas, estando envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, metabolismo de

nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (Briat e Lobréaux, 1997; Becana et al., 1998). Algumas de suas funções se devem à sua capacidade de atuar em reações redox reversíveis entre os íons ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) (Becana et al., 1998; Hell e Stephan, 2003). Abundante na crosta terrestre, o Fe presente no solo está em sua maior parte na forma oxidada (Fe^{3+}), que não é prontamente absorvido pelas plantas (Fageria et al., 1990).

Os vegetais apresentam diferentes estratégias para a absorção de Fe. Na estratégia I, comumente encontrada em dicotiledôneas, as plantas promovem a acidificação do solo pela excreção de prótons, aumentando a solubilidade do Fe^{3+} e sua posterior redução para Fe^{2+} pela redutase férrica da membrana plasmática. O Fe^{2+} é então absorvido por um transportador específico. Na estratégia II, encontrada nas gramíneas, há produção e liberação de fitossideróforos que quelam o Fe^{3+} na rizosfera, sendo o complexo Fe^{3+} -fitossideróforo absorvido pelo transportador específico (Briat et al., 1995; Hell e Stephan, 2003). Uma vez absorvido pelas raízes, o Fe^{3+} é transferido para o xilema e translocado até a parte aérea pelo fluxo transpiratório (Curie e Briat, 2003), na forma de complexo com ácidos orgânicos, especialmente citrato (Tiffin, 1966; Curie e Briat, 2003).

O excesso de Fe pode levar à potencialização de estresses oxidativos, com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas (OH^\bullet), este último considerado o mais tóxico para a célula (Sinha et al., 1997; Becana et al., 1998; Fang et al., 2001; Souza-Santos et al., 2001; Eaton e Qian, 2002). O Fe tem participação antagônica e importante no ciclo de formação e degradação das EROs. Por um lado o Fe constitui a principal fonte de radicais hidroxilas na célula pela reação de Fenton, mas por outro, é constituinte das principais enzimas antioxidativas (Becana et al., 1998). A atividade redox do Fe utilizada em várias reações de transferência de elétrons, por exemplo, na fotossíntese, pode, entretanto, levar à geração de EROs (Becana et al., 1998).

Algumas espécies vegetais não apenas toleram níveis elevados de certos metais no solo, mas podem acumular estes metais em seus órgãos, ou transformá-los em formas menos tóxicas (Salt et al., 1998), promovendo a fitorremediação destes solos contaminados. Diferentemente de contaminantes orgânicos, contudo, os metais não podem ser degradados, mas os vegetais

utilizam outras estratégias como acumulação, estabilização e em alguns casos volatilização (EPA, 1998). A taxa de acumulação parece ser governada mais por requerimentos fisiológicos da planta do que pela toxidez do metal (Clemens et al., 2002).

A proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo Fe nas plantas pode ser feita por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Vansuyt et al., 1997). Enzimas como dismutase do superóxido, catalases e peroxidases atuam na eliminação de EROs. Compostos orgânicos como a glutathiona, carotenóides, α -tocoferóis, ácidos úrico, ácido lipóico e ubiquinol compõem o sistema não-enzimático para a neutralização de EROs (Becana et al., 1998). Além disso, a planta pode dispor de um controle homeostático do Fe. As ferritinas, que são Fe-proteínas, são capazes de complexar cerca de 4.500 átomos de Fe por molécula em sua cavidade interna, mantendo o Fe numa forma inócua (Briat et al., 1999).

Plantas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) são especialmente equipadas para lidar com estresses oxidativos pelo aumento na expressão do sistema de resposta antioxidativo (Lüttge, 2002). Além disso, tais plantas apresentam diversas características anatômicas e morfológicas, incluindo cutículas espessas, baixa relação superfície-volume, células e vacúolos grandes, com elevada capacidade de acúmulo de água (suculência) e redução do tamanho ou da frequência dos estômatos (Cushman, 2001), que as permitem suportar grande diversidade de estresses ambientais, provavelmente por apresentarem poderoso e persistente controle de seu suprimento de CO₂ e água (Black e Osmond, 2003).

Diferentemente de outras espécies vegetais, as plantas CAM fixam predominantemente o CO₂ atmosférico durante a noite. Esta estratégia permite que as plantas CAM apresentem elevadas taxas de eficiência no uso da água (WUE) algumas vezes maiores que plantas C₃ e C₄ sob condições similares (Drennan e Nobel, 2000; Cushman, 2001).

Plantas CAM são dependentes do malato que, acumulado durante a noite nos vacúolos e descarboxilado durante o dia, fornece o CO₂ para a fotossíntese, estando fechados os estômatos (Franco et al., 1999). Interferências no balanço diário dos níveis de malato, portanto, podem levar a distúrbios nos processos fotossintéticos, como fotoinibição e geração de EROs.

A amplitude da mudança diária de acidez e a quantidade de CO₂ fixado dia *versus* noite é muito sensível a mudanças ambientais. Dados da literatura mostram que variações da intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, níveis de O₂ e CO₂, desenvolvimento vegetal, salinidade ou disponibilidade de água afetam a fotossíntese das plantas CAM (Black e Osmond, 2003). À semelhança dos estresses citados anteriormente, a toxidez causada por excesso de Fe pode ser capaz de induzir, entre outras, alterações no fluxo de elétrons provocando estresse oxidativo.

Clusia hilariana é uma espécie CAM (Franco et al., 1996) de elevada ocorrência em restingas do Brasil, ecossistema sujeito a fortes estresses ambientais, de alta irradiância solar, temperaturas elevadas do ar e solo, baixa disponibilidade de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água (Liebig et al., 2001). Além das condições ambientais extremas encontradas na restinga, a vegetação submetida à deposição de Fe particulado pode estar sofrendo alterações em sua dinâmica e composição florística. Nesse contexto, *C. hilariana* aparece como espécie chave na dinâmica das comunidades vegetais na restinga, favorecendo o estabelecimento de outras espécies e desta forma contribuindo para a diversidade encontrada nesse ambiente (Liebig et al., 2001). Como planta pioneira no substrato arenoso, ao seu entorno estabelecem uma grande diversidade de espécies vegetais, devido à acumulação de folhas secas, húmus e nutrientes, aumentando a capacidade de retenção de água, proteção da radiação solar e conseqüentemente das altas temperaturas do solo (Zaluar e Scarano, 2000). Desta forma, *C. hilariana* está geralmente como árvore central nas ilhas isoladas de vegetação da restinga (Liebig et al., 2001) e quaisquer danos a essa espécie pode resultar em prejuízos enormes às comunidades vegetais nas quais está inserida. Devido ao significativo papel ecológico que *C. hilariana* desempenha no ecossistema, o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos do excesso de Fe sobre esta espécie, mediante a deposição do MSPFe sobre solo e superfícies fotossintetizantes e procurar relacionar sua resposta ao tipo de metabolismo de carbono que apresenta (CAM), uma vez que esta espécie é de grande distribuição nas áreas de restinga próximas às usinas mineradoras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *Clusia hilariana* Schletlendl utilizadas foram obtidas por propagação vegetativa, por meio de estaquia de mudas de um indivíduo, fornecidas pelo viveiro do Parque Estadual Paulo César Vinha, localizado no município de Guarapari, no Espírito Santo. Após enraizadas, as plantas foram transferidas para bandejas contendo solução nutritiva de Hoagland a meia força iônica em pH 5,5. Após cultivo em casa de vegetação as plantas foram selecionadas quanto a uniformidade de altura, número de folhas e estado fitossanitário e expostas a níveis tóxicos de Fe em solução nutritiva, no solo ou deposição de MSPFe sobre a superfície foliar. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa.

2.1 Efeito da aplicação de ferro em solução nutritiva

Um experimento em sistema hidropônico foi realizado para evidenciar os possíveis efeitos fitotóxicos e sua relação com o acúmulo de Fe em *Clusia hilariana*. Para isso, as plantas foram submetidas gradativamente a diferentes concentrações e diferentes formas de Fe na solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Aron, 1938) a meia força iônica, constantemente aerada. O Fe foi aplicado na forma de citrato de ferro III (0 e 2,0 mM) e de FeEDTA (0; 1,0 e 2,0 mM). O pH da solução foi ajustado a cada dois dias para 4,0 ou 5,5 em cada tratamento e as soluções renovadas semanalmente. O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com três repetições e uma planta por vaso como unidade experimental. O experimento teve duração de dois meses, de abril a junho de 2005.

2.2 Efeito da aplicação do material sólido particulado de ferro ao solo

Num segundo experimento, as plantas foram transferidas para vasos de cinco litros contendo substrato na proporção de 2:2:1 de terra:areia:esterco.

Após três meses de aclimação foram impostos os tratamentos, que consistiram em aplicações semanais de 17,5 e 52,5 g de material sólido particulado de ferro (MSPFe) distribuídos uniformemente sobre a superfície do solo, procurando-se simular a deposição do MSPFe que ocorre no entorno da usina de pelletização de minério de Fe no Espírito Santo. O tratamento com a aplicação semanal de 17,5 g de Fe corresponde aproximadamente à quantidade depositada na área da usina ($6 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) (Lopes et al., 2000) em relação à área superficial do vaso. O solo, nesse experimento, foi acidificado periodicamente (duas vezes por semana) pela adição de 200 ml de solução de H_2SO_4 em pH 3,0, volume suficiente para o umedecimento completo do solo sem encharcamento. Utilizou-se delineamento experimental em blocos ao acaso, com cinco repetições por tratamento (0; 6 e $18 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ de MSPFe), tendo uma planta por vaso como unidade experimental. O experimento teve duração de três meses, de agosto a novembro de 2005.

2.3 Efeito da aplicação do material sólido particulado de ferro na superfície foliar

Para aplicação do MSPFe sobre a superfície foliar de *C. hilariana*, utilizou-se uma câmara, que simula a deposição natural de MSP, conforme modelo proposto por Hirano et al. (1995) com algumas modificações (Figura 1).

Durante cada aplicação eram colocadas na câmara, juntamente com as plantas, cinco placas de Petri, com área conhecida, para estimar a quantidade depositada diariamente sobre as plantas. Com o auxílio de um radiômetro (LI-185B, LI-Cor) foi estimada a porcentagem da radiação luminosa bloqueada pelo MSPFe. Para isso, placas de Petri, de área conhecida foram expostas a diferentes níveis de deposição do MSPFe e, posteriormente, medida contra uma fonte luminosa a quantidade de luz que atravessou a placa. A irradiância bloqueada foi estimada por meio de uma curva padrão construída com esses dados.

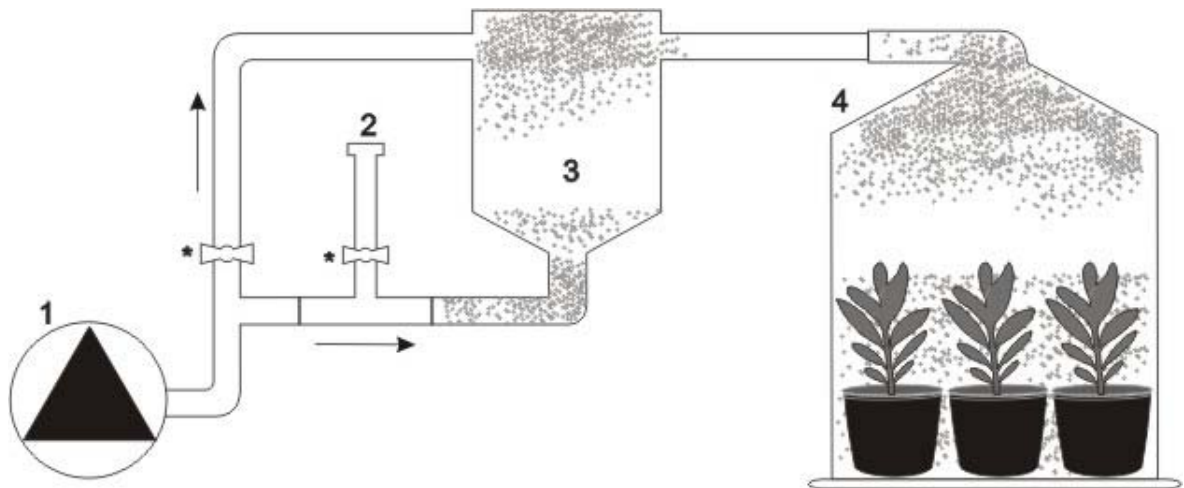


Figura 1: Diagrama da câmara utilizada na aplicação do MSPFe. O MSPFe foi introduzido através de uma coluna (2), suspenso pela bomba compressora (1) na câmara de homogeneização (3) e conduzido até a câmara de deposição (4), onde foi lançado sobre as plantas. As setas indicam a direção do fluxo e os asteriscos indicam reguladores de fluxo.

O experimento teve duração de 48 dias, de agosto a outubro de 2005 e seguiu o delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições por tratamento, que constavam da exposição das plantas ao MSPFe ($2,14 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ em média) e do controle, onde não houve exposição ao MSPFe. Antes da aplicação, o solo nos vasos foi coberto, deixando apenas a parte aérea exposta ao MSPFe. As aplicações de MSPFe foram feitas no início ou no final do período luminoso.

2.4 Parâmetros avaliados

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados, em folhas completamente expandidas, com auxílio de um analisador de gás no infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). O melhor horário para as medições foi determinado mediante curva diária. Com base nesses dados as medições foram realizadas entre 0:00 e 2:00 h. Os parâmetros avaliados foram: fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e calculadas a razão C_i/C_a (concentração interna/atmosférica de CO_2) e eficiência no uso da água (WUE). As medições foram feitas ao final do

experimento com solução nutritiva e aos 29, 44, 75, 93 e 110 dias após o início dos tratamentos com aplicação de MSPFe ao solo. No experimento com aplicação de MSPFe na superfície foliar as avaliações foram feitas aos 3, 8, 13, 28, 39 e 45 dias após a primeira aplicação. Nesse experimento, o MSPFe aplicado foi, horas antes de cada medição, removido periodicamente da superfície foliar a ser analisada, sem que ocorresse acumulação gradativa do MSPFe (MSPFe rem. per.). Em outra folha, da mesma idade, em que o MSPFe não foi removido, houve acúmulo do mesmo com o decorrer do experimento até a última medição (MSPFe rem. final). Aos 45 dias após o início do experimento foram realizadas, concomitantemente, medições de trocas gasosas nas duas folhas. Esse procedimento de remoção manual do MSPFe antes das medições foi necessário para evitar danos ao aparelho utilizado.

Ao final dos experimentos com aplicação de MSPFe ao solo e sobre a superfície foliar, foram realizadas medições de fotossíntese e condutância estomática ao longo do dia. Nesses mesmos experimentos, foram realizadas medições nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, com o auxílio de um fluorômetro modulado (Mini-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH). Foram avaliados a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos, rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F'_m$) e taxa de transporte de elétrons (ETR), por meio do programa de curva de luz do aparelho. As medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no início da manhã e ao final dos experimentos. As variações ao longo do dia na eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) e fluorescência mínima, ou inicial (F_0) foram determinadas ao final do experimento com aplicação de MSPFe sobre a superfície foliar, concomitantemente com as medições de fotossíntese e condutância estomática. Nessa ocasião, foram feitas medições da temperatura foliar com o auxílio de um termômetro infravermelho (AG42, Telatemp).

Os teores de pigmentos (Clorofila *a*, *b* e carotenóides) foram determinados conforme protocolo descrito por Wellburn (1994) com a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) como extrator. Dois discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em recipientes contendo 5 ml de DMSO saturado com carbonato de cálcio. Após 48 horas em banho-maria a 65°C as absorbâncias do extrato foram lidas e os teores dos pigmentos determinados e

expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Nos experimentos com aplicação de MSPFe ao solo e sobre a superfície foliar, os teores de pigmentos foram avaliados em folhas de diferentes idades, denominadas folha 1 (folhas jovens do primeiro nó), folha 2 (Folhas completamente expandidas, situadas no terceiro nó) e folha 3 (Folhas completamente expandidas, situadas no quinto nó).

A permeabilidade das membranas foi determinada em discos foliares, por meio do extravazamento de eletrólitos (Tarhanen et al., 1999). Dez discos foliares de 5 mm de diâmetro foram colocados em tubos de ensaio com tampa rosqueável, contendo 10 ml de água desionizada. Após 12 horas, a condutividade, denominada inicial (C_i), foi medida com auxílio de um condutivímetro (MacCann e Solomon, 2000). Os tubos foram, então, colocados em estufa a 90°C por duas horas e a condutividade, denominada final (C_f), foi medida novamente. A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $C_i/(C_i+C_f) \times 100$ (Tarhanen et al., 1999).

Para determinação da acidez titulável, discos de 1,7 cm de diâmetro, coletados no início (6:00 h) e final (18:00 h) do período luminoso, foram pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -75°C . As amostras, pesando cerca de 0,2 g, foram maceradas em 5 ml de água desionizada e o extrato resultante aquecido em estufa a 90° por duas horas. Após atingir a temperatura ambiente, o extrato foi centrifugado a 3.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante titulado com solução padrão de NaOH 0,1N até pH 7,0 (Eastmond et al., 1997). A acidez titulável foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca.

Discos foliares de 1,7 cm de diâmetro (aproximadamente 0,2 g de tecido foliar) foram homogeneizados em 0,2 ml do meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,3 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). O homogeneizado resultante foi centrifugado a 15.000 xg por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado nos testes enzimáticos. Todas as soluções foram mantidas entre 0 e 4°C .

Para determinação da atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6), 500 μl de extrato enzimático bruto foram adicionados a 2,9 ml do meio de reação

constituído de H₂O₂ 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 25°C (Havir e McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, no primeiro minuto de reação, utilizando-se para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹cm⁻¹ (Anderson et al., 1995).

A atividade da peroxidase total (POX; EC 1.11.1.7) foi determinada pela adição de 100 µl do extrato enzimático bruto a 2,9 ml da mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5,0 (Shevyakova et al., 2002), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância a 420 nm, no primeiro minuto de reação, à 25°C. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955).

Para determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), 50 µl do extrato enzimático bruto foram adicionados a 2,95 ml do meio de reação constituído de metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa recoberta com papel alumínio. A reação foi iniciada acendendo-se a lâmpada fluorescente e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma (Giannopolitis e Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação da absorvância a 560 nm, após subtração do “branco” no qual a mistura de reação foi mantida no escuro pelo mesmo tempo. A absorvância máxima, em decorrência da fotorredução do NBT, foi medida em meio de reação idêntico ao anterior, porém sem a adição do extrato enzimático bruto e mantido sob mesma iluminação. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

Para determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) o material vegetal foi macerado em 2 ml de um meio de extração constituído de ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM em tampão de fosfato de

potássio 50 mM, pH 7,0 (Nakano e Asada, 1981). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 xg por 15 min e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto. Aos 2,9 ml da mistura de reação constituída de ascorbato 0,8 mM e H₂O₂ 1,0 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, adicionou-se 100 µl do extrato enzimático bruto e determinou-se a atividade enzimática pelo decréscimo na absorbância a 290 nm à 25°C (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981).

A concentração de malonaldeído (MDA) acumulado, foi determinada em cerca de 200 mg de tecido vegetal, macerado em 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos, coletando-se o sobrenadante. A 500 µl do sobrenadante foi adicionado 1,5 ml da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% em TCA 20% e a mistura incubada à 95°C. Após 30 minutos a reação foi interrompida transferindo-se os tubos para banho de gelo e a absorbância medida a 532 e 600 nm. A absorbância de 600 nm foi subtraída da absorbância de 532 nm e a concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

Para determinação do teor de Fe, as plantas foram lavadas com água corrente, água desionizada e solução de EDTA (50 mM) para garantia da total remoção do material particulado depositado externamente. O material fresco foi colocado em estufa para secagem a 75°C até atingir peso constante e, então, reduzido a partículas com dimensões menores que 1 mm. Quinhentos miligramas do material seco e moído, foram digeridos em 10 ml de solução nítrico-perclórica (3:1) e o Fe no extrato mineral determinado por espectrofotometria de absorção atômica (Kampfenkel et al., 1995).

As modificações morfológicas das lâminas foliares, como aparecimento de necroses ou cloroses, foram registradas visualmente comparando-se os tratamentos.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e quando necessário foi realizada análise de regressão, para as análises foi utilizado o programa estatístico SAEG.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos da aplicação de ferro em solução nutritiva

O teor de Fe na parte aérea aumentou significativamente apenas nas plantas de *Clusia hilariana* expostas à maior concentração de FeEDTA em pH 4,0 (Quadro 1). Nesse pH, o teor de Fe foi cerca de 3 vezes maior do que em pH 5,5. Em todos os outros tratamentos o teor de Fe permaneceu baixo, em torno de 0,3 mg.g⁻¹MS, não sendo diferente para os tratamentos aplicados.

Quadro 1: Teor de ferro na parte aérea e sistema radicular em *C. hilariana* cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis e formas de ferro, em pH 4,0 e 5,5.

	pH	Controle	FeEDTA 1,0 mM	FeEDTA 2,0 mM	CitratoFe(III) 2,0 mM
Parte aérea	4,0	0,19 Ba	0,32 Ba	0,87 Aa	0,30 Ba
	5,5	0,20 Aa	0,30 Aa	0,29 Ab	0,28 Aa
Sistema radicular	4,0	0,16 Ca	2,83 Ba	6,93 Aa	7,65 Aa
	5,5	0,19 Ca	2,84 Ba	3,68 Bb	6,08 Ab

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os tratamentos com ferro e minúsculas entre os pH, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se aumento nos teores de Fe no sistema radicular com o aumento na concentração de Fe na solução nutritiva nos dois valores de pH. No sistema radicular, os teores de Fe nas plantas expostas ao citrato de ferro III e FeEDTA 2,0 mM em pH 4,0 foram significativamente maiores do que seus correspondentes no pH 5,5 (Quadro 1). O teor de ferro nas plantas expostas à concentração de FeEDTA 2,0 mM foi significativamente maior do que a 1,0 mM quando cultivadas em pH 4,0. Nas plantas tratadas com citrato de Fe, diferenças significativas em relação ao controle, somente foram observadas no sistema radicular. Tais plantas alcançaram os maiores teores de Fe na raiz em relação aos outros tratamentos. O acúmulo de Fe nas raízes foi cerca de 47 e 32 vezes maior que nas plantas controle, nos pH 4,0 e 5,5, respectivamente.

A taxa fotossintética sofreu redução significativa nos tratamentos com FeEDTA nas duas concentrações, mas apenas no pH 4,0 (Quadro 2). As

reduções foram da ordem de 80 e 83% nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM de FeEDTA, respectivamente. Ocorreu elevação significativa da relação Ci/Ca nas plantas tratadas com FeEDTA, também em pH 4,0, sendo o aumento médio de cerca de 93%, em relação ao controle de mesmo pH.

Nenhum dos parâmetros fisiológicos avaliados foi afetado pelos tratamentos aplicados, quando os pH das soluções nutritivas foram ajustados para 5,5 (Quadro 2). Os valores de condutância estomática e transpiração permaneceram invariáveis em resposta ao pH, doses ou fontes de ferro presente na solução nutritiva. No tratamento com citrato de ferro III 2,0 mM, as plantas apresentaram praticamente os mesmos valores do controle, independentemente do pH da solução nutritiva.

Os teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides, também, não sofreram alterações significativas em decorrência dos tratamentos com Fe (Quadro 3). A relação clorofila *a/b*, entretanto, sofreu redução nas plantas submetidas a pH 5,5, independentemente do tratamento com Fe.

Quadro 2: Taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (g_s), transpiração (*E*), Ci/Ca e eficiência do uso de água (WUE) em *C. hilariana* sob diferentes níveis e formas de ferro, em solução nutritiva nos pH 4,0 e 5,5.

	pH	<i>A</i> $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g_s $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	<i>E</i> $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Ci/Ca	WUE
Controle	4	5,4 Aa	0,038 Aa	0,30 Aa	0,41 Ba	18,60 ABa
	5,5	5,5 Aa	0,040 Aa	0,31 Aa	0,47 Ab	19,23 ABa
FeEDTA 1,0 mM	4	1,1 Bb	0,020 Aa	0,18 Aa	0,79 Aa	11,94 ABa
	5,5	4,9 Aa	0,031 Aa	0,25 Aa	0,36 Ab	20,28 ABa
FeEDTA 2,0 mM	4	0,9 Bb	0,016 Aa	0,13 Aa	0,78 Aa	12,24 Ba
	5,5	5,4 Aa	0,041 Aa	0,31 Aa	0,48 Ab	22,16 Ba
Citrato-Fe(III) 2,0 mM	4	5,1 Aa	0,031 Aa	0,25 Aa	0,38 Ba	24,53 Aa
	5,5	4,9 Aa	0,026 Aa	0,21 Aa	0,31 Aa	32,41 Aa

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, maiúsculas entre os tratamentos com ferro e minúsculas entre pH, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 3: Teores de clorofila *a*, *b*, carotenóides ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2} \times 10^{-3}$) e razão Clorofila *a/b* em *C. hilariana* sob diferentes níveis e formas de ferro, em solução nutritiva nos pH 4,0 e 5,5.

	pH	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a/b</i>
Controle	4,0	62,7 Aa	25,6 Aa	16,6 Aa	2,5 Aa
	5,5	53,2 Aa	30,6 Aa	14,5 Aa	1,7 Ab
FeEDTA 1,0 mM	4,0	46,2 Aa	26,0 Aa	20,5 Aa	1,8 Aa
	5,5	55,9 Aa	35,3 Aa	22,7 Aa	1,6 Ab
FeEDTA 2,0 mM	4,0	51,2 Aa	27,2 Aa	19,3 Aa	1,9 Aa
	5,5	43,8 Aa	29,9 Aa	19,1 Aa	1,5 Ab
CitratoFe(III) 2,0 mM	4,0	60,9 Aa	26,0 Aa	19,6 Aa	2,3 Aa
	5,5	43,6 Aa	25,7 Aa	17,4 Aa	1,7 Ab

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, maiúsculas entre os tratamento com ferro e minúsculas entre pH, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As plantas tratadas com FeEDTA em pH 4,0 apresentaram, no final do experimento, necroses pontuais em alguns indivíduos. Desde os primeiros dias de exposição, em todos os tratamentos com Fe, foi observado escurecimento do sistema radicular em decorrência da precipitação do Fe sobre as raízes.

3.2 Efeitos da aplicação de MSPFe ao solo

A aplicação de MSPFe ao solo não alterou significativamente a altura das plantas e nem o número de folhas ao final dos tratamentos (Figura 2). As plantas, no geral, apresentaram uniformes incrementos na altura e no número de folhas ao longo do tempo.

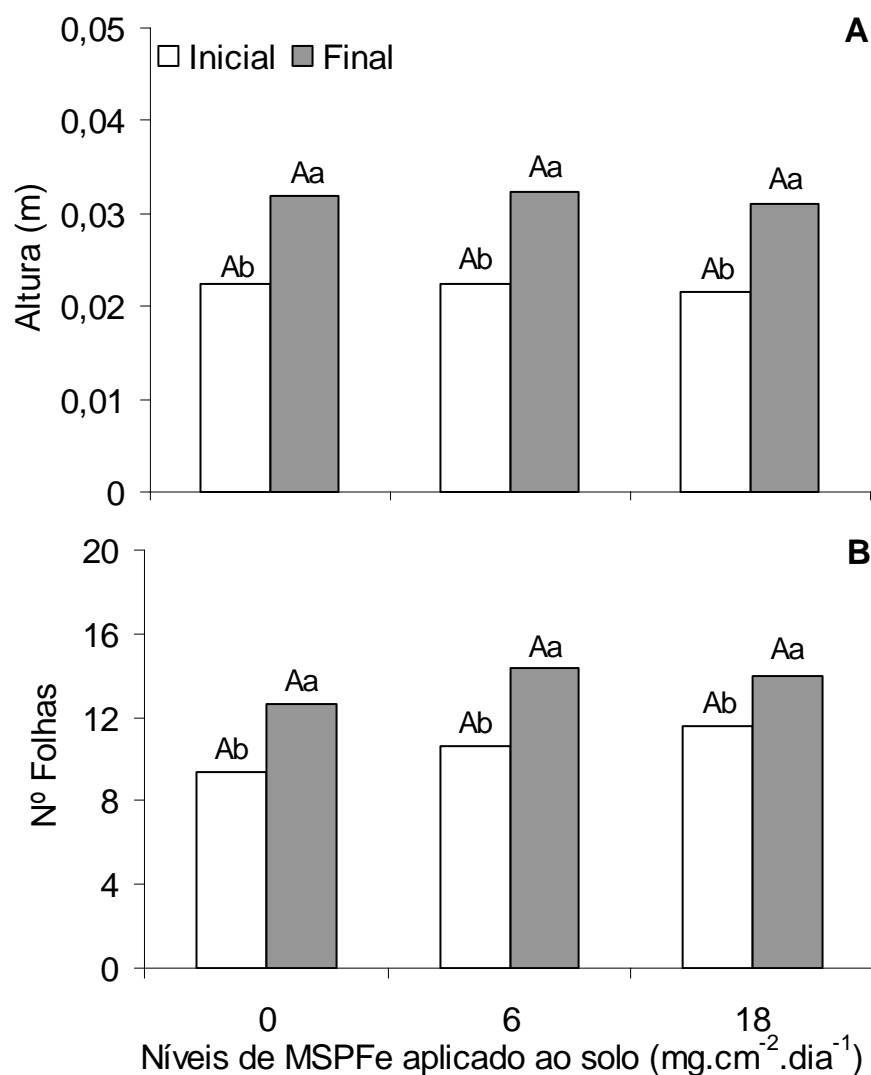


Figura 2: Altura (A) e número de folhas (B), no início e final do experimento, de plantas de *C. hilariana* submetidas a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os tratamentos com ferro e minúsculas entre as datas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores de Fe nas folhas e nas raízes atingiram valores significativamente maiores que no controle somente no nível de MSPFe aplicado de 18 e 6 mg.cm⁻².dia⁻¹, respectivamente (Quadro 4). Diferentemente de folhas e raízes, no caule esse aumento não chegou a ser significativo. As raízes apresentaram os teores mais elevados de Fe, seguida pelas folhas e caule (Quadro 4).

Não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros de trocas gasosas em *C. hilariana* em decorrência da exposição das plantas ao MSPFe aplicado ao solo (Quadro 5).

Quadro 4: Teor de ferro ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) nas folhas, caule e raízes em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento

MSPFe ($\text{mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$)	Raíz	Caule	Folhas
0	5,37 B	0,09 A	0,11 B
6	12,26 A	0,13 A	0,14 B
18	12,60 A	0,14 A	0,29 A

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 5: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), C_i/C_a e eficiência do uso de água (WUE) em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo, em função do tempo (dias) após o início dos tratamentos (DAIT).

DAIT	MSPFe $\text{mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$	A $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g_s $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	E $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	C_i/C_a	WUE
29	0	4,31	0,038	0,342	0,491	14,0
	6	4,33	0,050	0,439	0,634	10,1
	18	3,70	0,047	0,411	0,658	9,2
44	0	4,86	0,042	0,536	0,473	9,2
	6	4,77	0,043	0,533	0,493	9,0
	18	4,71	0,040	0,496	0,454	9,7
75	0	4,30	0,032	0,346	0,411	14,4
	6	4,19	0,029	0,301	0,402	15,1
	18	3,88	0,034	0,341	0,472	13,1
93	0	4,26	0,032	0,225	0,403	19,6
	6	3,86	0,026	0,189	0,350	21,1
	18	4,18	0,036	0,258	0,461	16,9
110	0	4,15	0,027	0,258	0,319	16,3
	6	3,91	0,024	0,232	0,302	17,1
	18	4,48	0,029	0,273	0,297	17,0

A variação diária da fotossíntese, observada ao final do experimento, também, não foi influenciada pela aplicação do MSPFe ao solo (Figura 3). A taxa fotossintética alcançou seus maiores valores por volta das 22:00 h. Com o início do dia houve redução nas taxas fotossintéticas. O valor de g_s , ao contrário, aumentou no início do período luminoso, havendo posteriormente o fechamento estomático. Tanto a A quanto a g_s mostraram aumentos em seus valores com a proximidade da noite.

A variação na acidez titulável do início para o final do período luminoso, em decorrência do metabolismo CAM, foi claramente evidenciada (Figura 4). Observou-se maior acúmulo de ácidos no início do período luminoso. Os tratamentos com aplicação de MSPFe ao solo, contudo, não tiveram efeito sobre a acidez titulável em nenhum período do dia (Figura 4)

Os teores de clorofila a , de carotenóides e razão clorofila a/b não foram influenciados pelos tratamentos com MSPFe aplicado ao solo. O teor de clorofila a e a razão clorofila a/b aumentaram com a idade das folhas (Quadro 6), já o teor de clorofila b apresentou redução significativa com o avanço da idade das folhas somente quando aplicados $18 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ de MSPFe. Nas folhas jovens (Folha 1) o teor de clorofila b aumentou significativamente com a aplicação do maior nível de MSPFe. O teor de carotenóides, contudo, não se modificou em resposta aos tratamentos com Fe ou em relação à idade das folhas (Quadro 6).

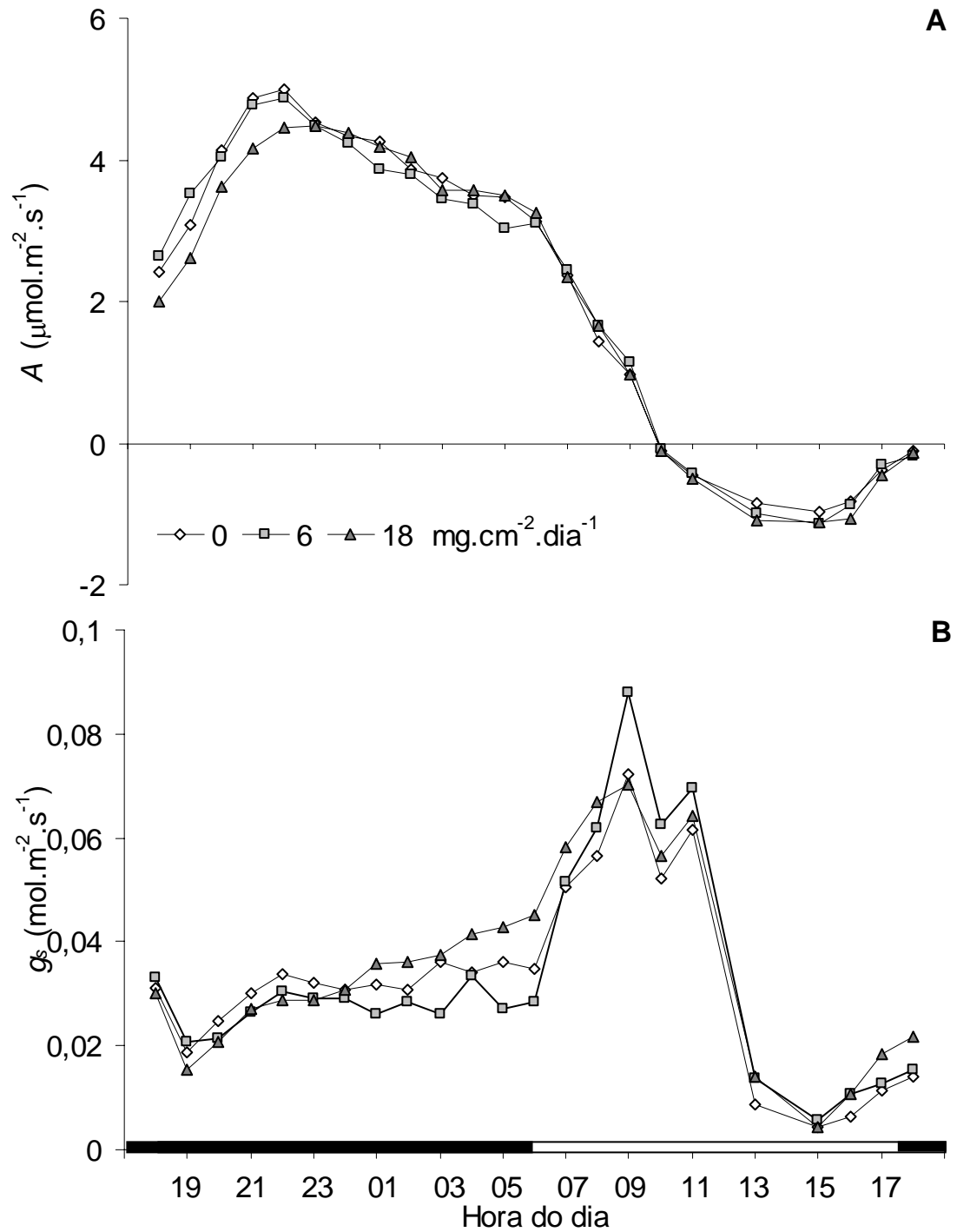


Figura 3: Variação diária de fotossíntese (A) e condutância estomática (B) em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento. As barras escuras, na parte inferior do gráfico, indicam o período noturno.

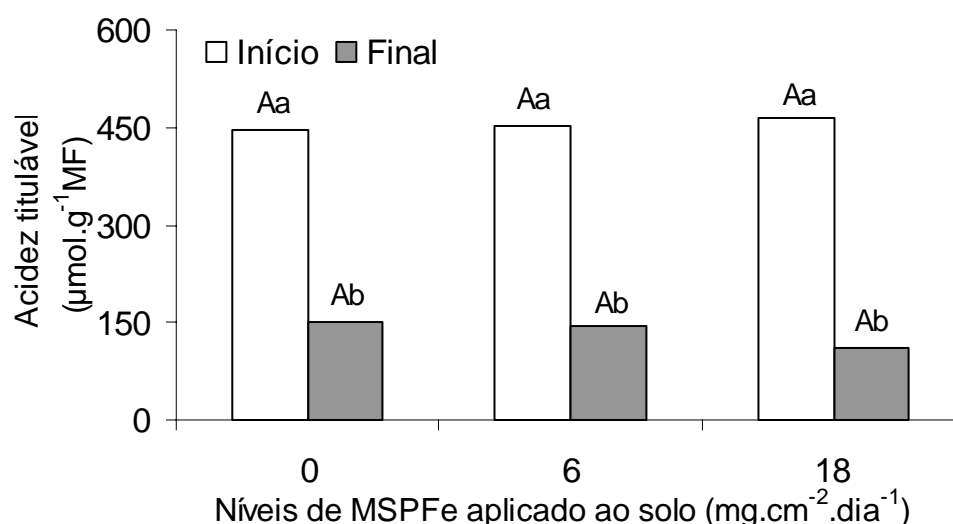


Figura 4: Acidez titulável no início e final do período luminoso em *C. hilariana* submetidas a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os níveis de ferro e minúsculas entre o início e final do período luminoso, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 6: Conteúdo de clorofila a, b, carotenóides ($\mu\text{g.m}^{-2} \times 10^{-3}$) e razão Clorofila a/b em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.

Folha	MSPFe mg.cm ⁻² .dia ⁻¹	Clorofila a	Clorofila b	Carotenóides	Razão Clorofila a/b
1	0	21,15 Ac	24,58 Ba	19,19 Aa	0,91 Ab
	6	23,88 Ac	24,92 Ba	17,07 Aa	0,97 Ab
	18	26,98 Ac	32,18 Aa	15,26 Aa	0,88 Ab
2	0	38,78 Ab	27,29 Aa	16,68 Aa	1,60 Aa
	6	41,79 Ab	27,49 Aa	18,95 Aa	1,59 Aa
	18	39,88 Ab	21,30 Ab	15,19 Aa	1,89 Aa
3	0	51,87 Aa	29,00 Aa	14,95 Aa	1,78 Aa
	6	42,47 Aa	24,84 Aa	16,18 Aa	1,71 Aa
	18	45,25 Aa	23,55 Ab	13,75 Aa	1,93 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os níveis de ferro e minúsculas entre idade das folhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a, ETR e $\Delta F/F'm$, não foram modificados pelos tratamentos com Fe. A taxa de transporte de elétrons aumentou até a PPFD de $2500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, independentemente dos

tratamentos com Fe (Figura 5). Os valores de Fv/Fm em folhas adaptadas ao escuro (na PPFD de 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), indicam a eficiência máxima de conversão de energia para a fotossíntese. Os resultados encontrados mostram a alta eficiência (por volta de 0,8) da atividade do fotossistema II (PSII) em folhas de *C. hilariana* independentemente da aplicação de MSPFe.

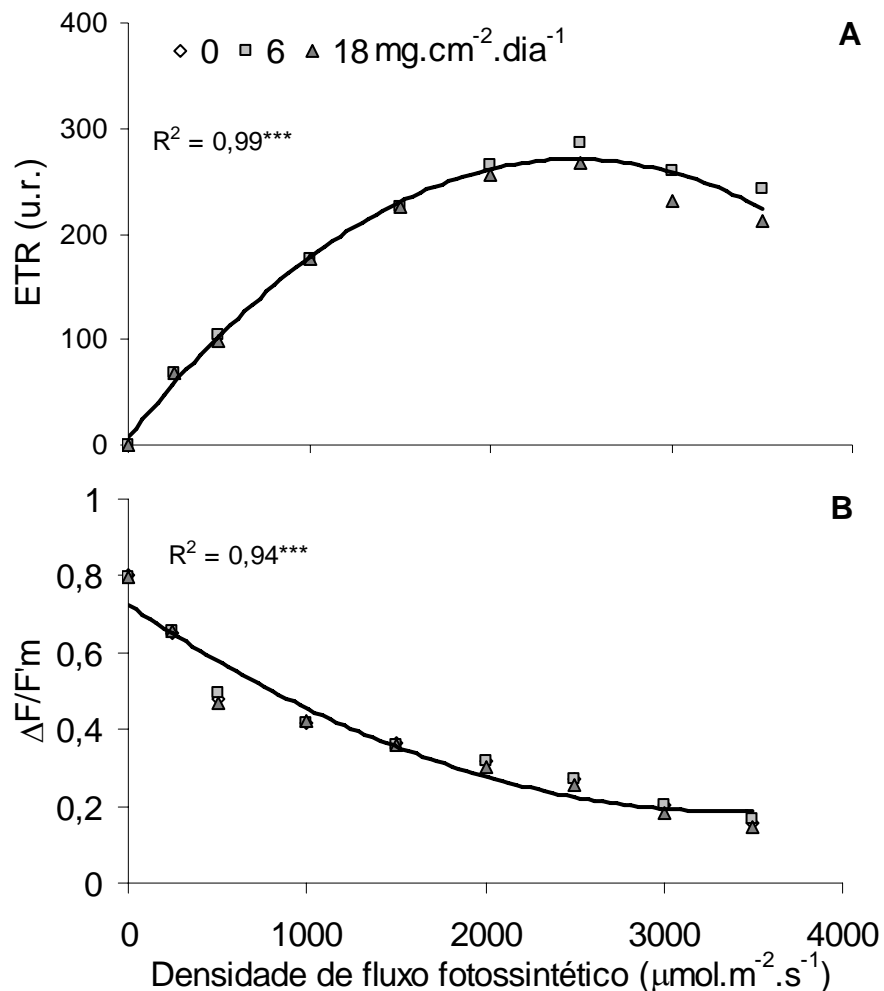


Figura 5: Taxa de transporte de elétrons (ETR; A) e rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$; B) em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, sob diferentes densidades de fluxo fotossintético. Os dados foram submetidos à análise de regressão apresentando modelo quadrático para ETR ($y = -4E-05x^2 + 0,2142x + 6,7923$) e raiz-quadrada para $\Delta F/F'm$ ($y = 5E-08x^2 - 0,0003x + 0,7251$). (***) : $p < 0,001$). Os dados foram agrupados dentro dos tratamentos com ferro de acordo com a análise de variância obtida (Quadro 4A).

A permeabilidade relativa de membranas, medida com base na perda de eletrólitos, não foi alterada significativamente em decorrência dos tratamentos com Fe (Figura 6).

As atividades das enzimas antioxidativas catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase não foram influenciadas pelos níveis de MSPFe aplicados ao solo (Quadro 7). A atividade da enzima superóxido dismutase, entretanto, aumentou significativamente, cerca de 28%, em decorrência da aplicação do MSPFe ao solo.

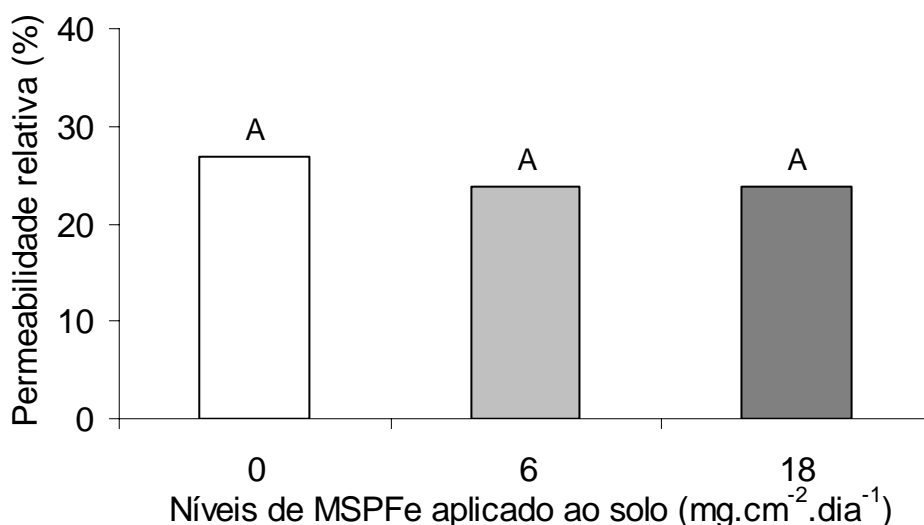


Figura 6: Permeabilidade relativa de membranas em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 7: Atividades das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em folhas de *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicado ao solo, após 3 meses do início do experimento.

MSPFe mg.cm ⁻² .dia ⁻¹	Catalase μmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ MF	Peroxidase μmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ MF	Ascorbato peroxidase μmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ MF	Superóxido dismutase μmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ MF
0	18,43 A	0,58 A	0,35 A	38,93 B
18	28,30 A	0,62 A	0,25 A	49,69 A

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Avaliação dos efeitos da aplicação do MSPFe na superfície foliar

A aplicação de MSPFe na superfície foliar de *C. hilariana* resultou no aparecimento de cloroses, seguido de necroses e senescência foliar. A altura e o número de folhas das plantas submetidas ao MSPFe foram significativamente menores que nas plantas controle (Figura 7).

Após a aplicação do MSPFe na superfície foliar observou-se acúmulo significativo do Fe nos tecidos da folha e do caule de *C. hilariana* (Quadro 8). Os teores de Fe no caule e nas folhas das plantas submetidas ao MSPFe foram cerca de 3 e de 5 vezes maiores do que nas plantas controle, respectivamente. As raízes apresentaram os maiores teores de Fe na planta, não sendo, entretanto, significativo entre os tratamentos (Quadro 8).

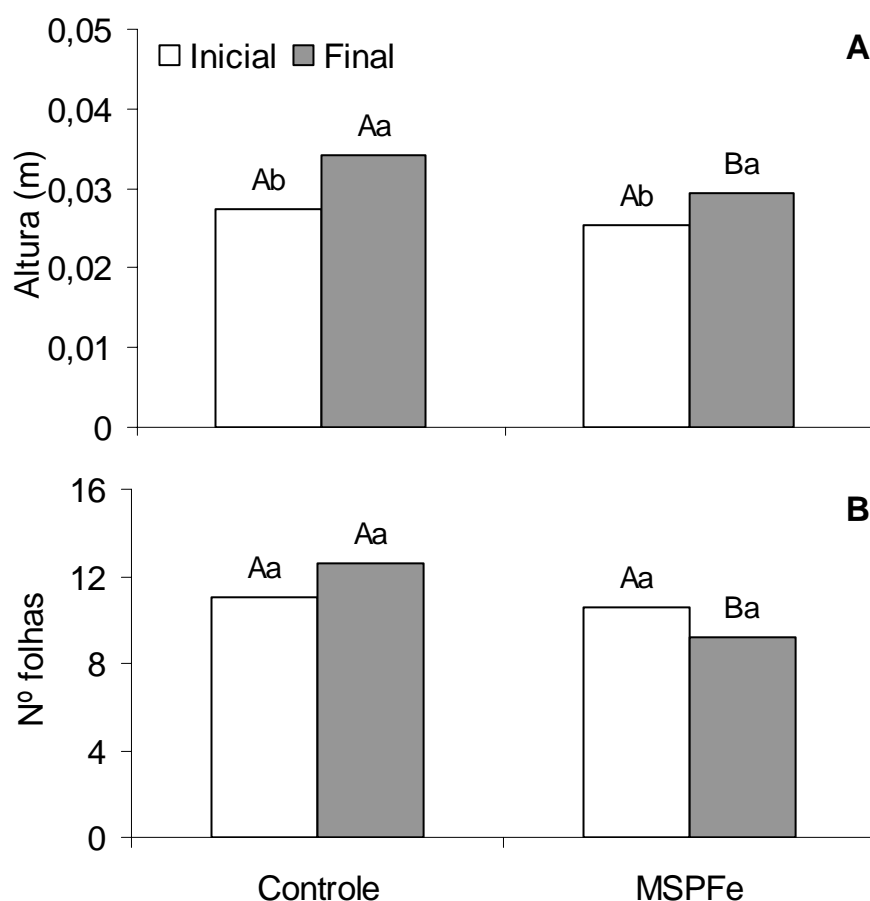


Figura 7: Altura (A) e número de folhas (B) de plantas de *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os tratamentos com MSPFe e minúsculas entre as datas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Já no terceiro dia após a aplicação do MSPFe na superfície foliar, observou-se alterações nos parâmetros de trocas gasosas avaliados. A fotossíntese, a condutância estomática e a transpiração nesse dia apresentaram decréscimo de aproximadamente 37, 40 e 45%, respectivamente (Quadro 9). Esse decréscimo acentuou-se até o 13º dia, quando se observou os menores valores para esses parâmetros. A razão C_i/C_a apresentou aumentos significativos, chegando a cerca de 37% no 28º dia, em relação ao controle. Nesse mesmo dia, houve uma redução de aproximadamente 33% na eficiência no uso da água (WUE), em relação ao controle.

Aos 45 dias após o início do experimento foram realizadas medições em diferentes folhas, verificando-se reduções significativas na taxa fotossintética, na condutância estomática, na transpiração e na eficiência no uso da água na seguinte ordem decrescente: controle; MSPFe rem. per. e MSPFe rem. final. No caso das folhas onde o MSPFe não foi removido periodicamente (MSPFe rem. final) as reduções em A , g_s , E e WUE chegaram a aproximadamente 100, 85, 83 e 91%, respectivamente, e a razão C_i/C_a chegou a ser cerca de 112% maior que o controle.

Quadro 8: Teor de ferro ($\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) nas folhas, caule e raízes em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.

	Raíz	Caule	Folhas
Controle	10,82 A	0,08 B	0,09 B
MSPFe	13,00 A	0,24 A	0,44 A

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 9: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), Ci/Ca e eficiência do uso de água (WUE) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, em função do tempo (dias) após o início dos tratamentos (DAIT).

DAIT		A $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	g_s $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	E $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Ci/Ca	WUE
3	Controle	4,27	0,040	0,350	0,607	12,89
	MSPFe	2,69	0,024	0,193	0,552	14,33
8	Controle	5,58	0,038	0,407	0,402	13,99
	MSPFe	2,58	0,019	0,212	0,450	12,69
13	Controle	4,27	0,046	0,373	0,609	11,66
	MSPFe	1,38	0,019	0,162	0,702	8,42
28	Controle	6,03	0,044	0,486	0,378	12,91
	MSPFe	2,38	0,021	0,261	0,517	8,63
39	Controle	5,12	0,038	0,432	0,428	12,68
	MSPFe	2,77	0,021	0,238	0,514	10,75
45	Controle	4,64 A	0,032 A	0,215 A	0,448 B	22,08 A
	MSPFe rem. per.	3,20 B	0,024 B	0,190 A	0,507 B	16,90 A
	MSPFe rem. final	-0,003 C	0,0049 C	0,036 B	0,952 A	1,966 B

Aos 45 dias foram feitas avaliações em folhas sem deposição (controle), em folhas onde o MSPFe foi removido periodicamente (MSPFe rem. per.) e nas folhas onde o MSPFe foi removido somente no último dia de avaliação (MSPFe rem. final). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A deposição do MSPFe na superfície foliar em *C. hilariana* acarretou alterações significativas ao longo do dia na taxa fotossintética e condutância estomática (Figura 8). Durante a noite, na medida em que g_s aumentou, observou-se aumento em A. Com o início do dia houve aumento da condutância estomática, com posterior redução, e diminuição da fotossíntese.

A deposição do MSPFe causou elevação significativa da temperatura foliar ao longo de todo o dia. Em ambos os tratamentos as maiores temperaturas foram observadas próximo às 13:00 h, alcançando valores de aproximadamente 38,5 e 40°C nas folhas sem e com deposição de MSPFe, respectivamente (Figura 9).

A acidez titulável, sofreu reduções de 46 e 35% no início e final do período luminoso, respectivamente, com a aplicação do MSPFe. A diferença dia *versus* noite na acidez titulável foi significativamente menor nas plantas que receberam a deposição do MSPFe (Figura 10).

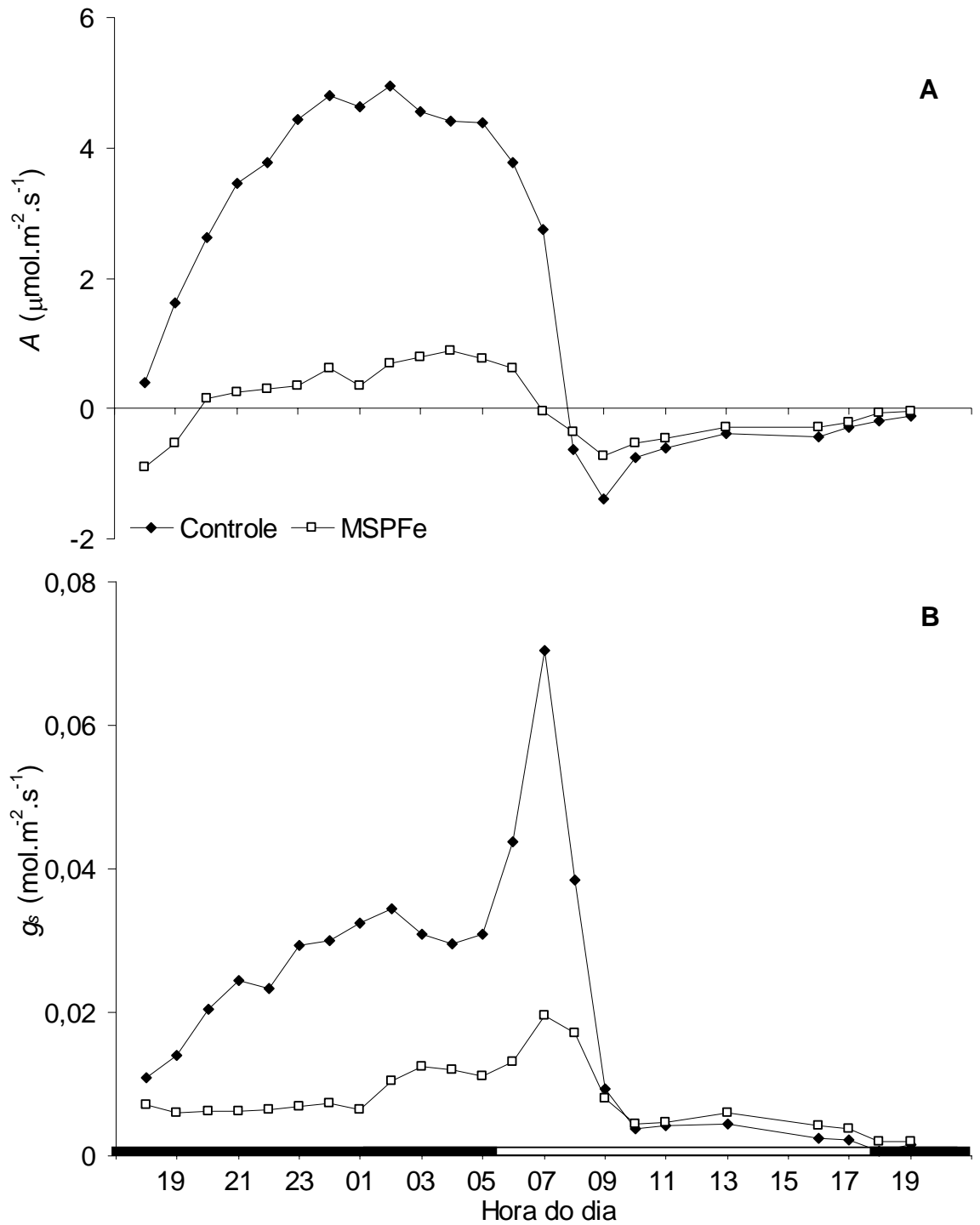


Figura 8: Variação diurna de fotossíntese (A) e condutância estomática (B) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento. As barras escuras, na parte inferior do gráfico, indicam o período noturno.

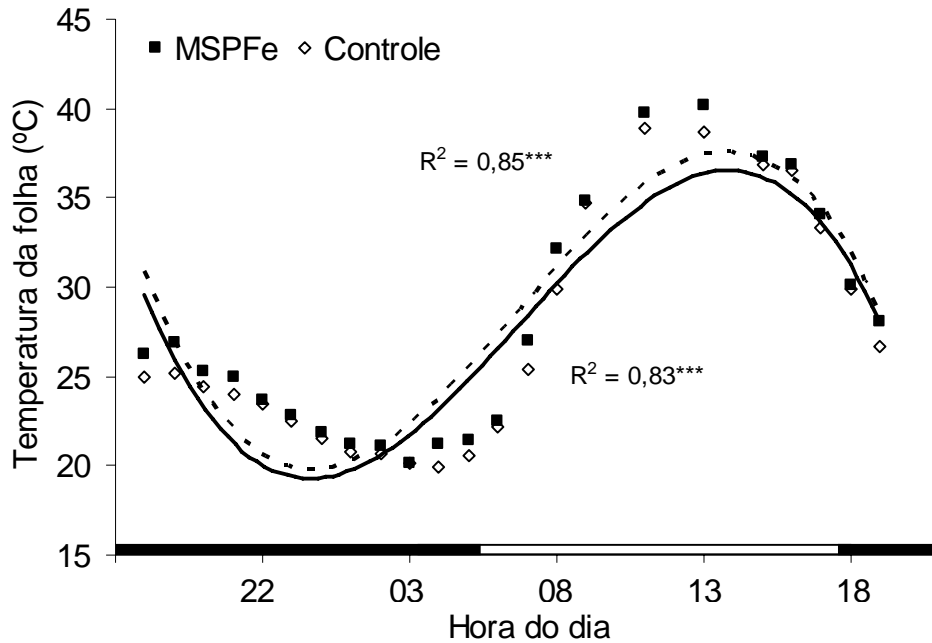


Figura 9. Temperatura foliar ao longo do dia em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, aos 45 dias após o início do experimento. Os dados foram submetidos à análise de regressão apresentando modelo cúbico ($y = -0,012x^3 + 0,495x^2 - 4,9789x + 34,049$ e $y = -0,0127x^3 + 0,522x^2 - 5,2871x + 35,646$, controle e MSPFe, respectivamente). (***) : $p < 0,001$). Linha contínua corresponde à regressão das plantas controle. As barras escuras na parte inferior do gráfico indicam o período noturno.

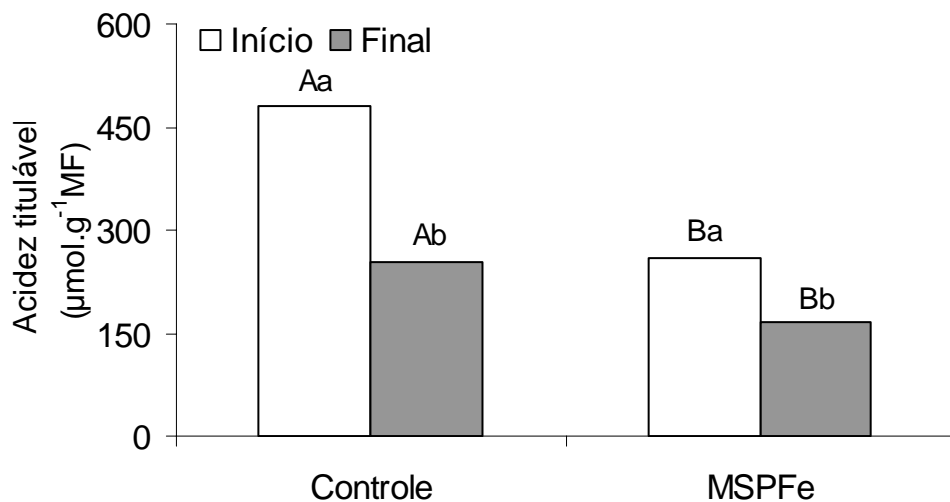


Figura 10: Acidez titulável no início e final do período luminoso em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os tratamentos com MSPFe e minúsculas entre o início e final do período luminoso, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os menores valores de clorofilas *a* e *b* foram encontrados para folhas jovens, independentemente dos tratamentos com MSPFe (Figura 11 A e B). O teor de clorofila *a* sofreu redução significativa nas folhas 2 e 3, mas foi maior nas folhas 1 submetidas a aplicação do MSPFe (Figura 11 A). Não houve diferenças significativas entre o teor de clorofila *a* e a idade das folhas para o tratamento com MSPFe. No controle as folhas jovens apresentaram menos clorofila *a* em relação às folhas completamente expandidas (folhas 2 e 3). O teor de clorofila *b* apresentou decréscimos significativos com a deposição do MSPFe independentemente da idade da folha (Figura 11 B).

O teor de carotenóides não se modificou com a idade das folhas, redução de aproximadamente 18% nas plantas que receberam a deposição do MSPFe (Figura 11 C). A razão clorofila *a/b* nas folhas sem deposição do MSPFe aumentou com o avanço da idade das folhas, o contrário ocorreu nas folhas expostas ao MSPFe, em que os menores valores foram observados em folhas mais velhas (folhas 3). A aplicação de MSPFe acarretou aumento da razão clorofila *a/b* nas folhas 1 e redução nas folhas 3 (Figura 11 D).

Mesmo em baixas irradiâncias, de $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, observou-se redução na taxa de transporte de elétrons (ETR) nas plantas expostas ao MSPFe (Figura 12 A). Em altas irradiâncias o decréscimo na ETR tornou-se mais acentuado, chegando a ser aproximadamente 56% menor nas plantas submetidas ao MSPFe na irradiância de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, em que ocorreu saturação na ETR nos dois tratamentos (Figura 12 A).

O rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$) em diferentes densidades de fluxo fotossintético (PPFD) foi significativamente afetada pela aplicação do MSPFe na superfície foliar (Figura 12 B). Observou-se forte fotoinibição, que chegou a 65% do valor da planta controle, como evidenciada pelos valores encontrados de F_v/F_m (eficiência quântica máxima do PSII; $\Delta F/F'm$ em $0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

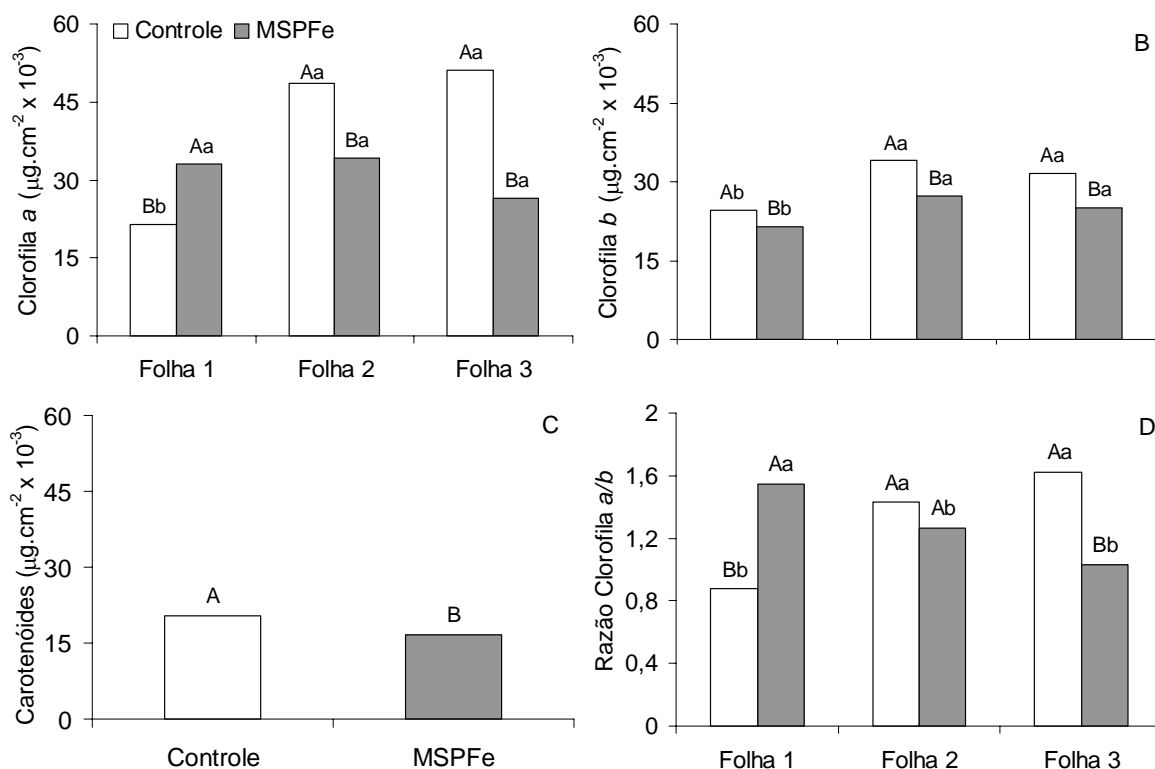


Figura 11: Teor de clorofila a (A), b (B), carotenóides (C) e razão Clorofila a/b (D) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento. Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas entre os tratamentos com MSPFe e minúsculas entre idade das folhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de carotenóides foram agrupados entre os tratamentos com ferro de acordo com a análise de variância obtida (Quadro 8A)

A fluorescência mínima ou inicial (F_0) das plantas que receberam a deposição do MSPFe na superfície foliar foi cerca de 2,5 vezes maior que as plantas controle no início do período luminoso (Figura 13 A). As diferenças entre os tratamentos com MSPFe foram significativas somente até as 13 horas, quando as plantas com e sem aplicação de MSPFe mostraram valores próximos. As plantas que não receberam deposição de MSPFe apresentaram baixos níveis de fluorescência inicial ao longo de todo o dia.

A eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) sofreu redução com a aplicação do MSPFe, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos ao longo de todo o dia (Figura 13 B). Ao final do período luminoso, os valores de F_v/F_m apresentam recuperação nos dois tratamentos, com total recuperação apenas das plantas sem deposição de MSPFe, indicando o nível de dano causado aos tecidos fotossintéticos pelo Fe.

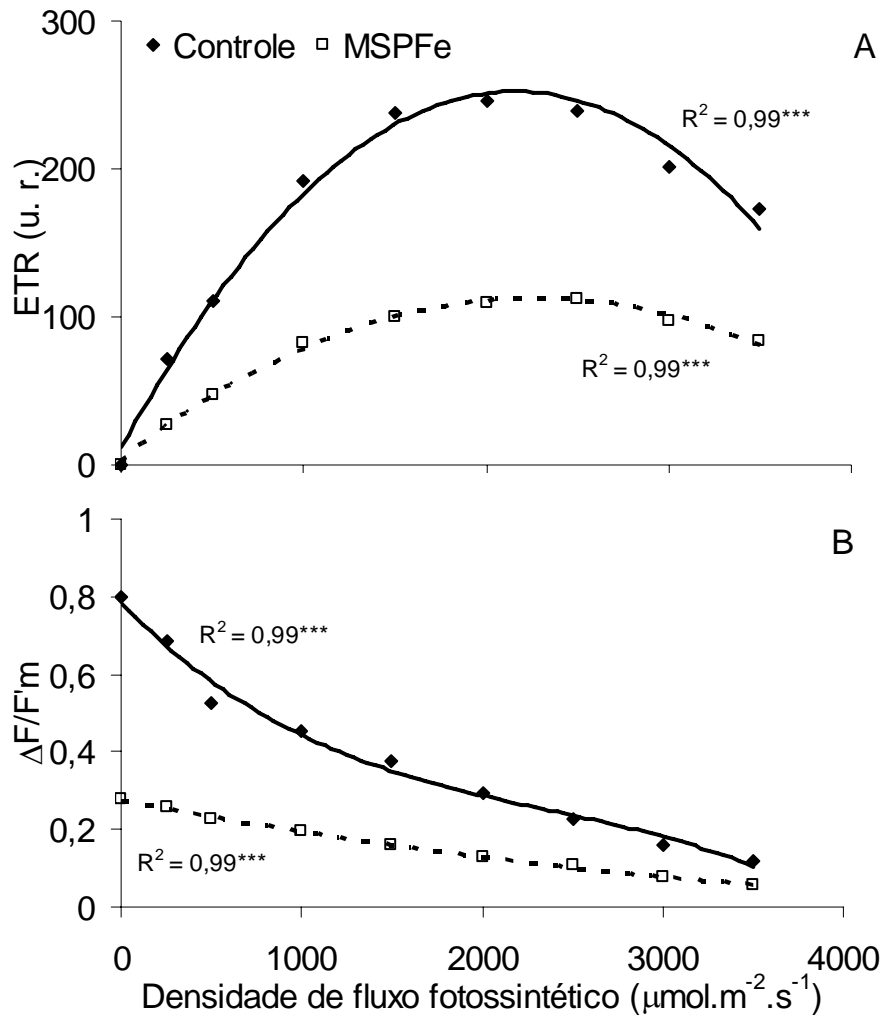


Figura 12: Taxa de transporte de elétrons (ETR; A) e rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$; B) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, sob diferentes densidades de fluxo fotossintético. Os dados foram submetidos à análise de regressão apresentando modelo quadrático para ETR ($y = -5E-05x^2 + 0,2226x + 12,012$ e $y = -2E-05x^2 + 0,0965x + 3,1927$, controle e MSPFe, respectivamente) e para $\Delta F/F'm$ nas plantas com MSPFe ($y = 7E-09x^2 - 9E-05x + 0,2756$), raiz-quadrada para $\Delta F/F'm$ nas plantas controle ($y = -2E-11x^3 + 2E-07x^2 - 0,0005x + 0,7834$). (***) : $p < 0,001$). Linhas contínuas correspondem às regressões das plantas controle.

A permeabilidade relativa das membranas de células de folha de *C. hilariana* foi significativamente afetada em decorrência da aplicação do MSPFe (Figura 14 A), com a deposição houve maior extravasamento de eletrólitos indicando menor seletividade das membranas. O dano decorrente do MSPFe foi de aproximadamente 18%. Apesar da significância encontrada para a permeabilidade de membrana, a peroxidação de lipídios de membrana não foi

significativamente alterada com a deposição do MSPFe na superfície foliar em *C. hilariana* (Figura 14 B).

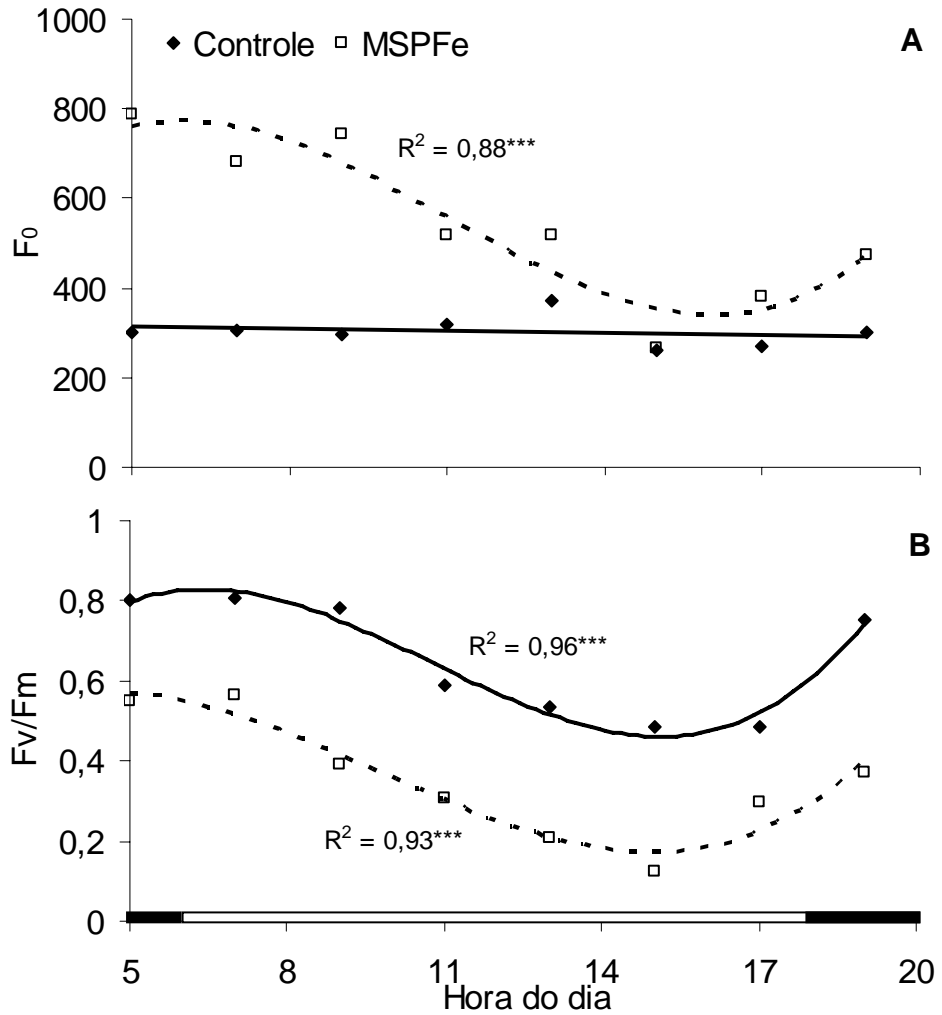


Figura 13: Fluorescência mínima ou inicial (F_0 ; A) e eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m ; B), ao longo do dia, em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar. Os dados foram submetidos à análise de regressão apresentando modelo cúbico para os valores de F_0 ($y = 0,8445x^3 - 27,877x^2 + 242,28x + 141,16$, MSPFe) e F_v/F_m ($y = 0,0011x^3 - 0,036x^2 + 0,3239x - 0,0629$ e $y = 0,0007x^3 - 0,0206x^2 + 0,1431x + 0,2819$, controle e MSPFe, respectivamente). (***) : $p < 0,001$). As linhas contínuas correspondem às regressões das plantas controle. As barras escuras na parte inferior do gráfico indicam o período noturno.

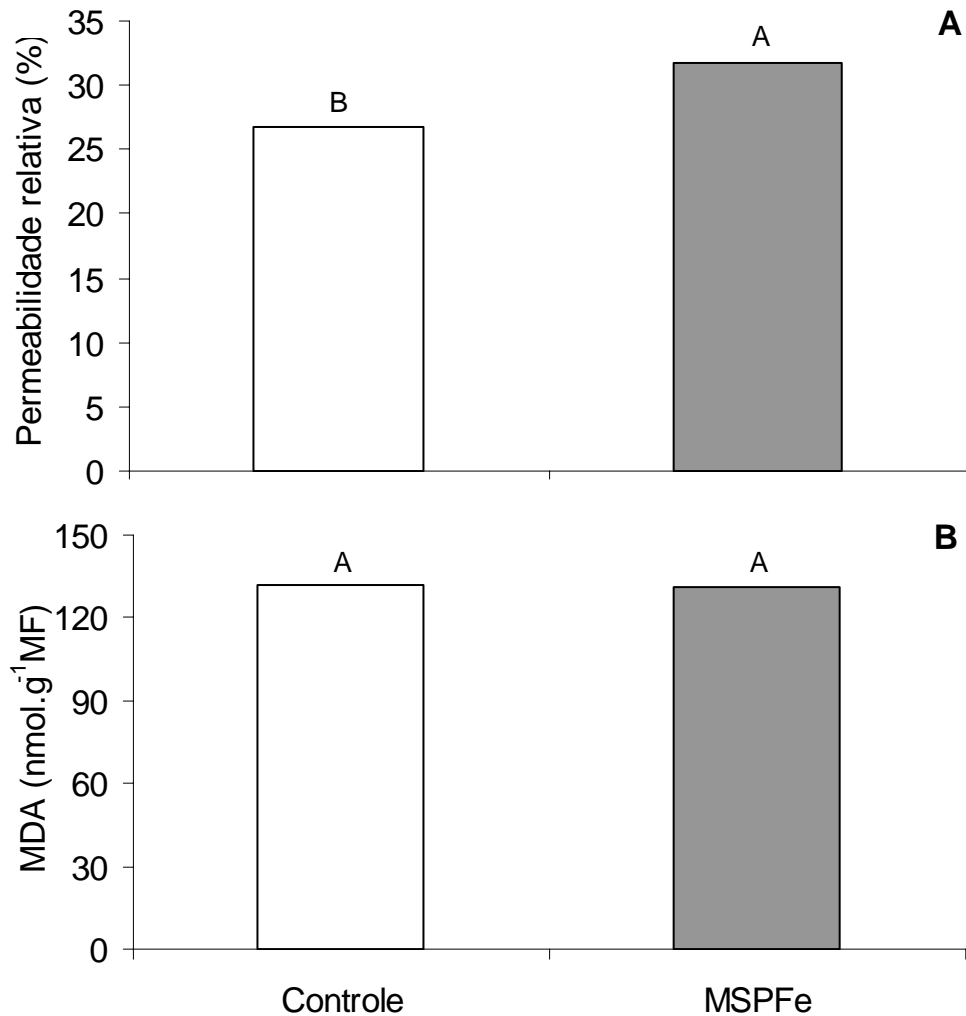


Figura 14: Permeabilidade relativa de membrana (A) e teor de MDA (B) em folhas de *C. hilariana* submetidas à aplicação de MSPFe na superfície foliar, aos 48 dias após o início do experimento. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Houve uma redução significativa na atividade da enzima catalase de aproximadamente 63% em folhas sujeitas à deposição do MSPFe (Quadro 10 A). Houve também uma tendência de aumento e redução nas atividades das enzimas ascorbato peroxidase e superóxido dismutase, respectivamente, entretanto sem diferenças ao nível de significância de 5% (Quadro 10 C e D). A atividade da enzima peroxidase permaneceu invariável com os tratamentos (Quadro 10 B).

Quadro 10: Atividades das enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em folhas de *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, após 48 dias do início do experimento.

	Catalase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$	Peroxidase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$	Ascorbato peroxidase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$	Superóxido dismutase $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$
Controle	47,24 A	1,78 A	0,39 A	54,07 A
MSPFe	17,63 B	1,80 A	0,54 A	37,90 A

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Absorção e acúmulo de ferro

As reduções nos parâmetros fisiológicos avaliados com a aplicação do Fe em solução nutritiva, observados nas plantas cultivadas em pH 4,0 na concentração de 2,0 mM de FeEDTA, parece estar relacionada ao maior acúmulo de Fe na parte aérea dessas plantas (Quadro 1). O Fe torna-se disponível para absorção em baixos pH (Becana et al., 1998; Hell e Stephan, 2003). Ou seja, mesmo as plantas expostas à maior concentração de FeEDTA (2,0 mM), porém em pH 5,5, não mostraram sintomas de toxidez por Fe.

O escurecimento do sistema radicular em decorrência da precipitação de Fe sobre as raízes das plantas cultivadas em solução nutritiva, pode com o tempo, originar a formação de uma crosta de Fe, impedindo a absorção de outros nutrientes (Howeler, 1973). Este fato, associado aos efeitos tóxicos específicos do Fe, podem explicar por que as plantas expostas aos tratamentos com FeEDTA no menor pH foram mais afetadas. Por outro lado, pode tratar-se do início de um processo de fitoestabilização, em que algumas plantas neutralizam os metais transformando-os em precipitados insolúveis nas suas superfícies radiculares, reduzindo os efeitos tóxicos para a planta (Horne, 2000).

Clusia hilariana pode apresentar diferentes mecanismos de controle homeostático do excesso de Fe, dependendo da fonte de Fe na solução nutritiva, como evidenciado nesse experimento pelo predominante acúmulo de Fe nas raízes, quando expostas ao citrato de ferro III, ou pelo maior acúmulo de Fe na parte aérea das plantas expostas ao tratamento com FeEDTA em

relação ao tratamento com citrato de ferro III. Provavelmente, ao evitar o acúmulo excessivo do Fe na parte aérea, as plantas expostas ao citrato de ferro III previnem de forma mais efetiva os efeitos prejudiciais do Fe, como comprovado pelos dados de fotossíntese, onde as plantas tratadas com FeEDTA mostraram-se mais sensíveis.

Geralmente, a toxicidade do Fe está associada com sua absorção, translocação e acúmulo na parte aérea das plantas (Rhoads, 1971). Ao contrário do observado no experimento em sistema hidropônico, o acúmulo de Fe não indicou maior toxidez das plantas expostas ao MSPFe aplicado ao solo. Já com a deposição do MSPFe nas folhas ocorreu, com o maior acúmulo de Fe em relação ao controle, alterações em diversas características avaliadas. Ou seja, o que determinou a resposta fisiológica em *C. hilariana* não foi o nível de Fe acumulado nos tecidos, mas sim a forma de deposição do MSPFe.

O acúmulo de Fe nas folhas das plantas expostas ao MSPFe foi expressivamente maior do que os valores requeridos para suprir as necessidades normais (Larcher, 2004), chegando a cerca de 3 e 4 vezes maior nas plantas expostas ao MSPFe aplicado no solo e nas folhas, respectivamente. Atingindo valores muito próximos do nível de $0,5 \text{ mg.g}^{-1}\text{MS}$ considerado fitotóxico para a maioria das plantas (Marschner, 1995; Levy et al., 1999).

Excesso de ferro e aspectos fisiológicos

Mais de 90% do total do Fe presente nas folhas localiza-se nos cloroplastos (Terry e Abadia, 1986). O incremento na disponibilidade de Fe no meio radicular ou sobre a superfície foliar aumentou significativamente o conteúdo de clorofilas nas folhas jovens (Folha 1) de *C. hilariana*, que se desenvolveram durante a imposição dos tratamentos, esse aumento foi mais expressivo para os teores de clorofila *a*, quando a aplicação do MSPFe foi sobre a folha, e para os teores de clorofila *b* quando o MSPFe foi aplicado sobre o solo. Contudo, nas folhas completamente expandidas sujeitas à deposição de MSPFe na superfície foliar houve, de forma geral, decréscimo no conteúdo de pigmentos em relação às plantas controle, já com a deposição do MSPFe no solo os teores de clorofila aumentaram em resposta ao maior teor de Fe nas folhas. Dessa forma, pode-se inferir que o aumento na concentração

de Fe nos tecidos fotossintetizantes de *C. hilariana* nesse experimento, ocasionou redução ou aumento nos teores de clorofila, dependendo do órgão da planta sujeito à deposição. Kampfenkel et al. (1995) também relatam aumento no conteúdo de clorofilas com elevados teores de Fe, entretanto, com diversos danos causados pelo excesso de Fe.

Reduções nos teores de pigmentos devido à deposição de diversas formas de materiais particulados, também, têm sido relatadas por alguns autores (Borka, 1980; Borka, 1984; Monni et al., 2001). Os menores teores de pigmentos encontrados com a deposição do MSPFe pode ser resultante dos efeitos da cobertura da superfície fotossintetizante, ou dos efeitos causados diretamente pela concentração elevada de Fe, ou mesmo pela ação conjunta desses fatores.

Os valores de fotossíntese, discutidos a seguir, corroboram com os resultados encontrados para o teor de pigmentos das plantas sujeitas aos dois modos de exposição ao MSPFe. O metabolismo fotossintético pode ser considerado como a principal característica que difere plantas C_3 de plantas CAM. Diversos fatores, como alta irradiância, temperatura, níveis de O_2 e CO_2 , desenvolvimento vegetal, estresse salino ou hídrico, podem causar alterações na fixação noturna de CO_2 e conseqüentemente no acúmulo de ácidos orgânicos como o malato (Black e Osmond, 2003). Nas plantas cultivadas em solução nutritiva ocorreram reduções significativas da fotossíntese quando tratadas com FeEDTA. Isso, provavelmente, não se deve somente ao fechamento estomático, como visto pela grande tendência a diminuição da g_s e pelo aumento da razão C_i/C_a , mas também a alterações desencadeadas pela toxidez do Fe, como por exemplo, reduzindo a disponibilidade de poder redutor (NADPH e ATP) ou causando desequilíbrio nas enzimas envolvidas na fixação do CO_2 atmosférico. Tendo em vista que os outros parâmetros como transpiração e eficiência no uso da água (WUE) não sofreram alterações significativas em decorrência dos tratamentos (Quadro 2).

A fonte de Fe e o pH da solução nutritiva foram fatores cruciais para a ocorrência ou não do estresse. As plantas tratadas com citrato de ferro III na mesma concentração que o FeEDTA (2,0 mM) não apresentaram comportamento fotossintético semelhante, mesmo aquelas mantidas em pH 4,0. O citrato é naturalmente o principal quelante de Fe no xilema (Tiffin, 1966)

e desta forma, é translocado pela planta de uma forma não tóxica. Mesmo em altas concentrações de citrato de ferro III, como nas condições do presente experimento, essa fonte de Fe disponível não representou uma forma tóxica para a planta. Provavelmente o Fe quelado na forma de FeEDTA, precisa ser descomplexado pelo meio radicular para que ocorra sua absorção, e conseqüentemente ocorrendo a formação do Fe²⁺ em excesso.

A deposição do MSPFe sobre as folhas causou reduções da taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e eficiência no uso da água e incremento da razão Ci/Ca desde os primeiros dias de tratamento (Quadro 9). Até mesmo deposições de materiais inertes afetam as trocas gasosas quando se acumulam sobre as folhas (Hirano et al., 1995). Uma série de eventos como cobertura e penetração da poeira nos estômatos (Beasley, 1942; Ricks e Williams, 1974), sombreamento (Thompson et al., 1984; Sharifi et al., 1997), aumento na temperatura foliar (Eller, 1977; Borcka, 1984) ou remoção da cera epicuticular (Eveling e Bataille, 1984), são conhecidos efeitos físicos da deposição de materiais particulados. Esses efeitos do MSP dependem da espécie química depositada, da topografia, do regime de precipitação e mesmo das características próprias da superfície foliar (Grantz et al., 2003).

Em um estudo comparativo, Silva (2003) mostrou que plantas de *Clusia hilariana* apresentaram menor deposição e absorção de Fe particulado do que a espécie C₃ *Eugenia uniflora*, na área da usina de pelotização do minério de Fe no Espírito Santo. Isso provavelmente ocorreu pelo fato de que a espécie CAM apresenta folhas com revestimento cuticular espesso e ausência de tricomas o que diminuiria a aderência do Fe depositado, sendo retirado com maior facilidade pela ação do vento ou chuva, no entanto, a fração mais fina do MSPFe não é retirada facilmente e permanece aderida nas plantas no entorno da usina.

No presente experimento, conduzido em condições semi-controladas da casa de vegetação, a ação excessiva do vento ou da chuva foi impedida, contudo, o ato de remover o MSPFe sobre as folhas, horas antes das medições pode, grosseiramente, simular a ação das intempéries climáticas em uma única folha. Embora uma comparação com o que normalmente ocorre nas áreas ao entorno da usina seja de difícil obtenção com esse experimento, uma vez que a média diária de MSPFe depositado sobre as folhas de *C. hilariana* (2,14

mg.cm⁻².dia⁻¹) foi quase 3 vezes menor do que a encontrada nas áreas ao redor da usina (6 mg.cm⁻².dia⁻¹) (Lopes et al., 2000). Outro agravante, que ocorre no entorno da usina de pelotização de minério de ferro, é a constante exposição da vegetação ao aerosol marinho, que facilita a adesão do ferro nas folhas, não sendo, esse aspecto, simulado no presente experimento.

Houve marcante diferença nos parâmetros de trocas gasosas em decorrência da contínua deposição do óxido de MSPFe na superfície foliar de *C. hilariana*. Nas folhas onde o MSPFe foi removido periodicamente antes das avaliações, é possível notar uma fraca tendência de recuperação sob essas condições, quanto à taxa fotossintética, após o 13º dia a partir do início do experimento (Quadro 9), entretanto, essa possível recomposição nos valores de fotossíntese não atingiu o nível das plantas que não receberam a deposição do MSPFe.

Deposições de vários materiais particulados em folhas de diversas espécies vegetais, causam complicações em uma série de aspectos do crescimento e metabolismo vegetal (Farmer, 1993), principalmente devido aos efeitos físicos dos componentes que são depositados (Hirano et al., 1995). Dessa forma, mesmo em plantas com metabolismo diferencial do carbono, como *C. hilariana*, que apresentam resistência a uma grande variedade de estresses ambientais (Black e Osmond, 2003), fatores que afetam primariamente o ganho energético do vegetal são consideráveis.

O principal efeito do MSPFe nas folhas de *C. hilariana* deve-se, provavelmente, a dois fatores: à obstrução da abertura estomática (Quadro 9; Figura 8) e ao aumento na temperatura da folha (Figura 9), como consequência do próprio comportamento estomático e, principalmente, pela maior absorção de radiação nas folhas cobertas pelo metal, sendo que a temperatura foliar atingiu os maiores valores no período do dia em que a irradiância chegou a 1550 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As alterações nos outros parâmetros como transpiração, eficiência no uso da água, razão C_i/C_a e até mesmo a taxa fotossintética, apresentaram respostas em função desses fatores. Com os valores de g_s permanentemente baixos, prevalecendo altas temperaturas na folha, ocorreu, naturalmente, uma queda nos valores de fotossíntese e consequentemente na WUE. Como a respiração é mantida ou mesmo elevada com as altas temperaturas e havendo redução na fixação de CO₂ pelo processo

fotossintético, os valores de C_i/C_a tendem a aumentar, chegando a atingir, nas folhas com deposição acumulada de MSPFe, o dobro dos valores observados nas folhas sem deposição (Quadro 9).

As aplicações de MSPFe em *C. hilariana* foram realizadas no início ou no final do dia, período em que geralmente ocorrem as fases II e IV do metabolismo ácido, respectivamente (Osmond, 1978). Ou seja, quando os estômatos se encontram moderadamente abertos, permitindo, desta forma, a entrada do MSPFe e conseqüente obstrução do ostíolo, o que explica também a grande quantidade de Fe nos tecidos foliares expostos ao MSPFe (Quadro 8). Talvez com a aplicação do MSPFe na fase III do CAM, em que os estômatos se encontram fechados, haveria uma mudança nos resultados apresentados. Redução de 31% na condutância estomática em folhas de pepino sob aplicação de poeira industrial foi encontrada por Hirano et al. (1995). Esse resultado foi obtido com aplicação do material particulado enquanto os estômatos permaneciam abertos, a deposição do mesmo dejetto industrial, com os estômatos fechados durante a aplicação, não causou grandes efeitos sobre a condutância estomática (Hirano et al., 1995).

Outros trabalhos também relatam aumento na temperatura foliar em decorrência de absorção adicional da radiação incidente, pela camada de material particulado depositado (Eller, 1997; Borcka, 1984). Em folhas de pepino o aumento na temperatura apresentou variações devido à natureza da substância depositada, com a deposição de partículas escuras a temperatura apresentou valores elevados em relação à deposição do material particulado de cor clara (Hirano et al., 1995).

O fechamento estomático causado pela obstrução do ostíolo devido à aplicação do Fe provocou queda dos níveis de transpiração de aproximadamente 83% em relação às plantas controle no último dia do experimento (Quadro 9). Outros trabalhos descrevem aumento nas taxas de transpiração de folhas submetidas à deposição de uma série de materiais particulados (Beasley, 1942; Farmer, 1993; Hirano et al., 1995).

A alta temperatura foliar provoca aumento da umidade absoluta nos espaços intercelulares, fazendo com que aumente a diferença entre a umidade dentro da folha e no ambiente externo, ocasionando maior perda de água, mesmo quando os estômatos se encontram parcialmente bloqueados pela

deposição, através da cutícula foliar. Por possuir folhas com cutículas espessas impregnadas de cutina (Silva et al., 2005) a transpiração não-estomática em *C. hilariana* é reduzida, o que explica a menor transpiração das plantas submetidas à deposição do MSPFe, uma vez que a abertura estomática mostrou-se comprometida. Devido à deposição de material cimentante ou mesmo de minério de Fe, cobrindo a superfície foliar, plantas de *Hellianthus annuus* e de *Triticum aestivum* também mostraram redução na taxa transpiratória com aumento da temperatura foliar (Borka, 1980; Borka, 1984).

A redução na taxa fotossintética das plantas expostas ao MSPFe pode estar relacionada ao bloqueio da radiação luminosa, como observado por outros autores (Hirano et al., 1995; Sharifi et al., 1997), sendo relatado que o efeito do sombreamento em conjunto com o aumento de temperatura e redução na condutância estomática contribuíram significativamente para a redução na fotossíntese. Houve deposição diária de 2,14 mg.cm⁻² de MSPFe no presente experimento o que corresponde, de acordo com a equação obtida através da curva de bloqueio da radiação luminosa ao bloqueio de aproximadamente 55% da radiação luminosa incidente por dia. Ao final do experimento, para as folhas onde o MSPFe não foi removido periodicamente, o acúmulo de óxido de Fe III bloqueia totalmente a radiação solar, comprometendo de forma drástica parâmetros de fotossíntese e fluorescência.

Assim como descrito por Franco et al. (1996), *C. hilariana* apresentou comportamento característico de planta com metabolismo ácido das crassuláceas, com fixação do CO₂ atmosférico, e conseqüentemente o acúmulo de ácidos orgânicos, predominantemente durante a noite (fase I do CAM; Osmond, 1978), situação em que estômatos encontram-se abertos e a perda de água pela transpiração é baixa. Ao amanhecer ocorrem elevados valores de condutância estomática, como resposta dos estômatos à radiação luminosa (Sharkey e Raschke, 1981), sendo possível a fixação direta do CO₂ atmosférico concomitantemente pela fosfoenol piruvato carboxilase (PEPCase) e pela Rubisco (fase II). O CO₂ liberado durante o dia pela descarboxilação dos ácidos orgânicos, preferencialmente malato e citrato, promove fechamento estomático (fase III) e concentração de CO₂ em torno da Rubisco, suprimindo sua atividade de oxigenase e, por meio disso, minimizando a fotorrespiração (Cushman e Bohnert, 1999; Cushman, 2001; Lüttge, 2002). No final do período

luminoso (fase IV) ocorre o início da abertura estomática e o esgotamento da reserva de ácidos orgânicos, sendo observado novamente, em algumas espécies e sob algumas condições ambientais, a fixação do CO₂ atmosférico pela PEPCase e Rubisco (Black e Osmond, 2003).

As plantas de *C. hilariana* submetidas à aplicação do MSPFe ao solo não apresentaram nenhuma diferença em seu comportamento fotossintético ao longo do dia em relação às plantas controle (Figura 3). Entretanto, com a deposição do Fe sobre a superfície foliar (Figura 8) houve alterações nos valores de fotossíntese e condutância estomática. Durante a noite a condutância estomática dessas plantas permaneceu em baixos níveis apresentando relação com os valores de fotossíntese no mesmo período. O repentino aumento na condutância estomática no início do dia foi menos expressivo nas plantas que receberam deposição de MSPFe indicando forte obstrução dos estômatos pelo MSPFe.

Os ácidos orgânicos, como o malato, que são acumulados durante a noite nos vacúolos e descarboxilados durante o dia, representam uma fonte de CO₂ enquanto os estômatos estão fechados e quando geralmente prevalecem as altas irradiâncias (Franco et al., 1999). Com a deposição do MSPFe na superfície foliar de *C. hilariana* a acumulação de ácidos orgânicos foi comprometida (Figura 10), a redução de 46% na acidez titulável ao início do dia está relacionada com a menor taxa fotossintética apresentada pelas plantas sujeitas à deposição, o que pode ter influenciado nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

Altas taxas de acumulação de citrato, preferencialmente, ou adicionalmente ao malato parece ser uma característica das espécies de *Clusia* (Pop et al., 1987; Franco et al., 1994; Mattos et al., 1997), aumentando a proteção contra fotoinibição. Sob forte irradiâncias ocorre a produção de espécies intermediárias de oxigênio que podem causar diversos danos ao aparato fotossintético (Foyer et al., 1994). Em condições não estressantes o sistema de defesa antioxidante dos vegetais, como enzimas e metabólitos, constituem adequada proteção contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres (Foyer et al., 1994). O alto teor de citrato, também considerado um potente antioxidante (Mante e Tepper, 1983; Panaia et al., 2000), comum no gênero *Clusia*, pode contribuir para o controle das espécies reativas de

oxigênio, embora, devido ao próprio metabolismo CAM, a produção desses radicais seja reduzida (Lüttge, 2002).

Medidas de fluorescência da clorofila *a* constituem uma importante ferramenta na detecção de múltiplos efeitos ambientais, uma vez que o funcionamento do PSII é um dos mais sensíveis indicadores de estresse nas plantas (Ball et al., 1995). A utilização da curva de resposta à luz proporciona uma análise profunda de características que não são possíveis de quantificação com medições momentâneas em luz ambiente, como por exemplo, a plasticidade fisiológica apresentada pela planta com a manipulação de altas irradiâncias (Rascher et al., 2000).

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F'm$), eficiência quântica máxima (F_v/F_m), fluorescência inicial (F_0) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) nos experimentos com aplicação de MSPFe ao solo e nas folhas, são consistentes com os valores encontrados para trocas gasosas e acidez titulável. Os parâmetros de fluorescência em plantas com metabolismo ácido das crassuláceas são alterados em diversas situações, como níveis de O_2 , radiação luminosa, estresse hídrico, estágio de crescimento (Adams e Osmond, 1988; Franco et al., 1996; Mattos et al., 1999; Mattos e Lüttge, 2001; Berg et al., 2004).

A eficiência quântica da etapa fotoquímica da fotossíntese em plantas CAM é dependente dos processos de fixação de carbono durante a noite e, conseqüentemente, da descarboxilação dos ácidos orgânicos durante o dia. Dessa forma, tais plantas são incapazes de manter altas taxas de transporte de elétrons sob condições em que o suprimento endógeno de CO_2 é comprometido. Outro fator que influencia a eficiência quântica do PSII é a magnitude do fluxo de fótons absorvidos em um determinado período do dia em relação às quatro fases do metabolismo ácido das crassuláceas (Adams et al., 1989).

A descarboxilação dos ácidos orgânicos pode aparentemente proteger de forma adequada os tecidos fotossintéticos das plantas CAM contra a fotoinibição (Adams e Osmond, 1988; Adams et al. 1989; Franco et al., 1996), principalmente por volta do meio dia, quando prevalecem altas irradiâncias e quando a reserva de ácidos orgânicos ainda não foi exaurida. Dessa forma, plantas CAM são mais susceptíveis à fotoinibição durante a fase IV, onde os

menores teores de malato e citrato são evidentes (Adams et al., 1989; Franco et al., 1996; Mattos et al., 1997). Entretanto, recentemente essa visão tem sido fortemente modificada e está claro que plantas CAM podem ser fotoinibidas mesmo na fase III (Lüttge, 2000). As medições da curva de luz no presente experimento foram feitas no início do dia (fase II do CAM), quando os níveis de CO₂ são elevados, mantendo alta taxa de transporte de elétrons e permitindo que grande porcentagem da energia absorvida seja utilizada nos processos fotossintéticos.

Cerca de 80% da luz absorvida pôde potencialmente ser utilizada nos processos fotossintéticos das plantas sem aplicação do MSPFe, como apresentado nas figuras 12 e 13, o que é consistente com os valores referidos para plantas saudáveis (Björkman e Demmig, 1987). A conseqüente redução nos valores de $\Delta F/F'm$ e F_v/F_m , ocorreu com o aumento da dissipação térmica da energia luminosa, consistindo apenas em um ajuste do PSII às diferentes frações de energia luminosa absorvida, que pode ser utilizada nas reações da cadeia de transporte de elétrons, sendo mais correta sua denominação como “regulação diurna do PSII” em vez de fotoinibição (Demmig-Adams et al., 1996).

Com a deposição do MSPFe na superfície foliar, ocorreu fotoinibição crônica ou outro tipo de dano aos complexos coletores de luz, como degradação da proteína D1 (Suh et al., 2002). Ao contrário da fotoinibição aguda (ou dinâmica), reversível em poucos minutos no escuro, a fotoinibição crônica não é reversível durante a noite, como mostrado pelos valores de F_v/F_m (Figura 13). As plantas apresentaram redução na eficiência quântica do PSII, no período do dia em que a intensidade luminosa atingiu os maiores valores ($1550 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), devido à dissipação não fotoquímica do excesso de energia. Em ambientes de alta irradiância as folhas normalmente absorvem mais fótons do que a capacidade de utilização nos processos fotossintéticos. Em situações de estresse a utilização da energia de excitação através da cadeia de transporte de elétrons é limitada e a redução na eficiência quântica do PSII torna-se mais expressiva por um longo período do dia (Demmig-Adams et al., 1996).

Clusia hilariana é encontrada naturalmente em áreas litorâneas, sujeitas a altas irradiância e temperatura. Os valores da taxa máxima de transporte de

elétrons (ETR_{max}) e de densidade de fluxo fotossintético saturante ($PPFD_{sat}$) obtidas nesse experimento para as plantas que não sofreram estresse pela deposição do Fe na folha (cerca de 250 e 2000 para ETR_{max} e $PPFD_{sat}$, respectivamente; Figura 12) demonstram a grande adaptação dessas plantas às condições ambientais extremas (Liebig et al., 2001). Mesmo plantas C_3 consideradas adaptadas a altas irradiâncias (plantas de sol) e outras espécies CAM não alcançam os valores obtidos nesse experimento com *C. hilariana* (Rascher et al., 2000; Ralph e Gademann, 2005). Valores semelhantes de ETR foram relatados por Franco et al. (1999) em plantas adultas de *C. hilariana* no campo, durante a fase III, em que numa $PPFD$ de $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o valor de ETR chegou a 237 u. r., não alcançando o ponto de saturação. A continuidade na taxa de transporte de elétrons sob irradiâncias potencialmente danosas pode ser resultante da grande demanda energética requerida para o metabolismo CAM (Skillman e Winter, 1997; Maxwell e Johnson, 2000). A deposição do MSPFe na superfície foliar de *C. hilariana* reduziu drasticamente a ETR_{max} , provavelmente devido ao dano causado pelo Fe nos complexos fotossintéticos, incluindo degradação da proteína D1 (Suh et al., 2002), como evidenciado pelos reduzidos valores da eficiência quântica do PSII. Reduções nos valores de F_v/F_m e ETR foram encontradas por Naidoo e Chirkoot (2004) para plantas de mangue sujeitas à deposição particulada.

A fluorescência mínima ou inicial (F_0), significativamente maior nas plantas expostas ao MSPFe (Figura 13 A), apresenta relação com os outros parâmetros de fluorescência avaliados, apesar do valor de F_0 ser independente dos eventos fotoquímicos, representando a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas *a* excitadas, antes da energia ser dissipada para o centro de reação do PSII (Osmond e Grace, 1995). A F_0 pode aumentar caso os centros de reação do PSII estejam comprometidos, ou se a transferência da energia de excitação da antena para os centros de reação for prejudicada (Bolhár-Nordenkampf et al., 1989). O valor de F_0 é alterado por estresses que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII. O estresse por temperaturas elevadas, por exemplo, é caracterizado por incrementar drasticamente a F_0 (Krause e Santarius, 1975; Schreiber e Berry, 1977; Smillie e Nott, 1979). A F_0 das plantas controle permaneceu em níveis basais durante todo o curso do dia, em torno de 300, com pequeno aumento por volta do meio

dia (Figura 13 A), comportamento também relatado por Liebig et al. (2001) em indivíduos adultos de *C. hilariana* na restinga.

Excesso de ferro e sistema de resposta antioxidativo

As atividades de algumas enzimas antioxidantes na presença de altos níveis de Fe, em tecidos de *C. hilariana*, não indicaram a ocorrência de estresse oxidativo significativo. Entretanto, elevados níveis de Fe nas células vegetais podem causar sérios danos devido à potencialização de estresse oxidativo (Sinha et al., 1997; Souza-Santos et al., 2001; Fang et al., 2001; Eaton e Qian, 2002), principalmente pela indução à produção de radicais hidroxila (HO^{*}), através da reação de Fenton (Becana et al., 1998).

A atividade das enzimas CAT e SOD aumentaram nas plantas que receberam o MSPFe no solo, mas diminuíram naquelas em que o MSPFe foi aplicado na superfície foliar, em relação aos respectivos controles, mostrando a importância do modo de aplicação do estresse.

O aumento na atividade da SOD nas plantas expostas ao MSPFe no solo, pode ser um indício de tolerância aos altos teores de Fe nos tecidos, sendo capazes de controlar, pelo aumento na expressão do sistema de resposta antioxidante (Lüttge, 2002), as EROs produzidas pelo excesso de Fe, como suportado pelo comportamento semelhante dessas plantas, em relação ao controle, nos diversos parâmetros fisiológicos, incluindo a integridade das membranas (Figura 6). Aumentos na atividade da SOD devido à exposição ao Fe também foram documentados por outros autores (Hendry e Brocklebank, 1985; Sinha et al., 1997).

A deposição de MSPFe sobre as folhas de *C. hilariana* pode ter comprometido a atividade de algumas enzimas do sistema de resposta antioxidante, principalmente a CAT, que apresentou maior sensibilidade (Quadro 10). Redução na atividade da CAT foi relatada com a deposição de material particulado cimentante em *Helianthus annuus* (Borka, 1980). Alta temperatura foliar provocada pelo material particulado pode ter contribuído para essa redução. A principal causa da redução na atividade dessas enzimas pode não ter sido devido aos efeitos tóxicos do Fe na geração de estresse oxidativo. A determinação das atividades enzimáticas foi feita ao final do experimento, quando as plantas já aparentavam bastante comprometidas, podendo haver,

nesse caso, redução na atividade de algumas enzimas, como a catalase, com o avanço da senescência foliar (Parish, 1968; Kar e Mishra, 1976). Além disso, o maior extravasamento de eletrólitos, evidência de danos às membranas, não corresponde a uma maior peroxidação de lipídios dessa membrana (Figura 14). A peroxidação de lipídios é um processo mediado exclusivamente pela ação dos radicais livres (Thompson et al., 1987), sendo relatado em vários trabalhos a ocorrência de peroxidação lipídica com exposição de diversas espécies vegetais ao Fe (Gallego et al., 1996; Sinha et al., 1997; Fang et al., 2001; Souza-Santos et al., 2001).

A atividade da enzima APX não apresentou aumentos significativos em resposta aos tratamentos com Fe. Entretanto, Inzé e Montagu (1995) relatam que a expressão genética de *APX* é rapidamente induzida por várias condições de estresse, como seca, choque térmico, resposta ao paraquat e etileno.

5. CONCLUSÕES

As plantas de *Clusia hilariana* utilizadas neste experimento apresentaram respostas diferentes com a forma de aplicação do MSPFe. Ocorreram reduções significativas em vários parâmetros avaliados nas plantas com aplicação de MSPFe na folha, como os parâmetros de fotossíntese e fluorescência da clorofila *a*, teor de pigmentos, crescimento, acidez titulável, integridade de membranas, entre outros. Já as plantas expostas ao MSPFe no solo não tiveram, no geral, suas respostas fisiológicas alteradas em decorrência do potencial fator estressante, que resultou da capacidade dessas plantas em suportar os altos níveis de Fe aplicados.

Todas as plantas que receberam a aplicação do MSPFe, sobre o solo ou na folha, apresentaram maior teor de Fe nos tecidos. Entretanto, os maiores prejuízos observados nas plantas com deposição de MSPFe nas folhas, não parece ser consequência dos efeitos reativos do Fe, mas sim em resposta aos efeitos físicos causados pela deposição, como aumento de temperatura foliar e bloqueio da abertura estomática.

O incremento na atividade de algumas enzimas do sistema de resposta antioxidante, nas plantas sujeitas ao MSPFe no solo, reflete a capacidade do

controle de espécies reativas de oxigênio, originadas do excesso de Fe na planta, uma vez que as características fisiológicas avaliadas, como fotossíntese e fluorescência da clorofila *a*, permaneceram invariáveis.

O nível de tolerância a altas doses de Fe no solo apresentado por *C. hilariana* nesse experimento, e seu acúmulo nos tecidos, fornece um forte indício do potencial dessa planta em processos de fitoextração do metal em ambientes contaminados. Dessa forma, a continuidade de pesquisas envolvendo essa planta, com objetivos específicos de fitorremediação, torna-se promissora, podendo contribuir na elucidação de outros processos fisiológicos que permitem à planta tolerar níveis tóxicos de Fe no ambiente, como por exemplo, a produção de fitoquelatinas ou ferritinas.

Por outro lado, *C. hilariana* mostrou-se sensível à deposição do MSPFe na superfície foliar. Nesse caso, o órgão com maior exposição ao metal é o responsável por todo processo de entrada de energia para a planta, processos que atingem diretamente essa função são potencialmente prejudiciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams WW III, Díaz M, Winter K (1989) Diurnal changes in photochemical efficiency, the reduction state of Q, radiationless energy dissipation, and non-photochemical fluorescence quenching in cacti exposed to natural sunlight in northern Venezuela. *Oecologia* **80**: 553-561

Adams WW III, Osmond CB (1988) Internal CO₂ supply during photosynthesis of sun and shade grown CAM plants in relation to photoinhibition. *Plant Physiology* **86**: 117-123

Anderson, MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profile of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**: 1247-1257

Ball MC, Butterworth JA, Roden JS, Cristian R, Egerton JJG (1995) Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 311-319

Beasley EW (1942) Effects of some chemically inert dusts upon the transpiration rate of yellow coleus plants. *Plant Physiology* **17**: 101-108

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

- Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I** (1998) Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* **201**: 137-147
- Berg A, Orthen B, Mattos EA, Duarte HM, Lüttge U** (2004) Expression of crassulacean acid metabolism in *Clusia hilariana* Schlechtendal in different stages of development in the field. *Trees - Structure and Function* **18**: 553-558
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K amongst vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489-504
- Black CC, Osmond CB** (2003) Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'. *Photosynthesis Research* **76**: 329-341
- Bolhàr-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreibers U, Lechner EG** (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* **3**: 497-514
- Borka G** (1980) The effect of cement dust pollution on growth and metabolism of *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution (Series A)* **22**: 75-79
- Borka G** (1984) Effect of metalliferous dusts from dressing works on the growth, development, main metabolic processes and yields of winter wheat in situ under controlled conditions. *Environmental Pollution (Series A)* **35**: 67-73
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, Wirén NV, Wuytswinkel OV** (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Cell Biology* **84**: 69-81
- Briat JF, Lobréaux S** (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* **2**:187-193
- Briat JF, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G** (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 155-166
- Chance B, Maehley AC** (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* **2**: 764-775
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science* **7**: 309-315
- Curie C, Briat JF** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 183-206
- Cushman JC, Bohnert HJ** (1999) Crassulacean acid metabolism: Molecular genetics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**:305-32
- Cushman, JC** (2001) Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology* **127**: 1439-1448
- Del Longo OT, Gonzales CA, Pastori GM, Trippi VS** (1993) Antioxidant defenses under hypergenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology* **34**: 1023-1028

Demmig-Adams B, Adams WWIII, Barker DH, Logan BA, Bowling DR e Verhoeven AS (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* **98**: 253-264

Drennan PM, Nobel PS (2000) Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Cell Environment* **23**: 767–781

Eastmond PJ, Ross JD (1997) Evidence that the induction of Crassulacean acid metabolism by water stress in *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) involves root signalling. *Plant Cell Environment* **20**: 1559-1565

Eaton JW, Qian M (2002) Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, **32**: 833-840

Eller BM (1977) Road dust induced increase of leaf temperature. *Environmental Pollution* **13**: 99-107

EPA (1998) **A Citizen's Guide to Phytoremediation**. publication 542–F-98–011

Eveling DW, Bataille A (1984) The effect of deposits of small particles on the resistance of leaves and petals to water loss. *Environmental Pollution Serie A* **36**: 229-238

Fageria NK, Baligar VC, Wright RJ (1990) Iron nutrition of plants: an overview on the chemistry an physiology of its deficiency and toxicity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **25**: 553-570

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

Farmer AM (1993) The effects of dust on vegetation a review. *Environmental Pollution* **79**: 63-75

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**: 696-717

Franco AC, Haag-Kerwer A, Herzog B, Grams TEE, Ball E, Mattos de EA, Scarano FR, Barreto S, Garcia MA, Mantovani A, Lüttge U (1996) The effect of light levels on daily patterns of chlorophyll fluorescence and organic acid accumulation in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees* **10**: 359-365

Franco AC, Herzog B, Hübner C, Mattos de EA, Scarano FR, Ball E, Lüttge U (1999) Diurnal changes in chlorophyll a fluorescence, CO₂-exchange and organic acid decarboxylation in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Tree Physiology* **19**: 635-644

Franco AC, Olivares E, Ball E, Lüttge U, Haag-Kerwer A (1994) In situ studies of Crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of the genus *Clusia*. *New Phytologist* **126**: 203-211

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

- Giannopolitis CN, Ries SK** (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309-314
- Grantz DA, Garnerb JHB, Johnson DW** (2003) Ecological effects of particulate matter. *Environment International* **29**: 213-239
- Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* **84**: 450-455
- Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189-198
- Hell R, Stephan UW** (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**: 541-551
- Hendry GAF, Brocklebank KJ** (1985) Iron-induced oxygen radical metabolism in waterlogged plants. *New Phytology* **101**: 199-206
- Hirano T, Kiyota M, Aiga I** (1995) Physical effects of dust on leaf physiology of cucumber and kidney bean plants. *Environmental Pollution* **89**: 255-261
- Hoagland DR; Arnon DI** (1938) **The method for growing plants without soil: water-culture**. Berkeley: Univ. of California, 32p. Circular of the Agricultural Experimentation Station
- Horne, AJ** (2000) Phytoremediation by constructed wetlands. In: Terry N, Bañuelos G (Eds). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Lewis, Boca Raton, Florida, p.13–40
- Howeler RH** (1973) Iron- induced orange disease of rice in relation to physico-chemical changes in flooded soil. *Soil Science Society of American Proceedings*, **37**: 898-903
- Inzé D, Montagu MV** (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 153-158
- Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D** (1995) Effects of Iron Excess on *Nicotiana glauca* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology* **107**: 725-735
- Kar M, Mishra D** (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**: 315-319
- Koshiba T** (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology* **34**: 713-721
- Krause GH, Santarius KA** (1975) Relative thermostability of the chloroplast envelope. *Planta* **127**: 285-299
- Larcher W** (2004) **Ecofisiologia vegetal**. RiMa Artes e Textos, São Carlos, 531p.
- Levin AS** (1998) Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. *Ecosystems* **1**: 431-436

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

Liebig M, Scarano FR, Mattos de EA, Zaluar HLT, Lüttge U (2001) Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious neotropical CAM tree *Clusia hilariana* Schlttdl. *Trees* **15**: 278-288

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

Lüttge U (2000) Light-stress and crassulacean acid metabolism. *Phyton* **40**:65-82

Lüttge U (2002) CO₂-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2131-2142

MacCann JH, Solomon KR (2000) The Effect of creosote on membrane ion leakage in *Myriophyllum spicatum* L. *Aquatic Toxicology* **50**: 274-284

Mante S, Tepper HB (1983) Production of *Musa textilis* Nee plants from apical meristem slices in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2**: 151-159

Marschner H (1995) **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, London. Second ed. 889p

Mattos de EA, Grams TEE, Ball E, Franco AC, Haag-Kerwer A, Herzog B, Scarano FR, Lüttge U (1997) Diurnal patterns of chlorophyll a fluorescence and stomatal conductance in species of two types of coastal tree vegetation in southeastern Brazil. *Trees* **11**: 363-369

Mattos de EA, Lüttge U (2001) Chlorophyll fluorescence and organic acid oscillations during transition from CAM to C3-photosynthesis in *Clusia minor* L. (Clusiaceae). *Annals of Botany* **88**: 457-463

Mattos de EA, Herzog B, Lüttge U (1999) Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L., under drought stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 253-261

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668

Monni S, Uhlig C, Hansen E, Magel E (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution* **112**: 121-129

Naidoo G, Chirkoot D (2004) The effects of coal dust on photosynthetic performance of the mangrove, *Avicennia marina* in Richards Bay, South Africa. *Environmental Pollution* **127**: 359–366

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

Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* **29**: 379-414

Osmond CB, Grace SC (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* **46**: 1351-1362

Panaia M, Senaratna T, Bunn E, Dixon KW, Sivasithamparam K (2000) Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**: 23-29

Parish RW (1968) Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I. The effects of cutting and inhibition of nucleic acid and protein synthesis. *Planta* **82**: 1-13

Popp M, Kramer D, Lee H, Diaz M, Ziegler H, Lüttge U (1987) Crassulacean acid metabolism in tropical dicotyledonous trees of the genus *Clusia*. *Trees, Structure and Function* **1**: 238-247.

Ralph PJ, Gademan R (2005) Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* **82**: 222-237

Rascher U, Liebig M, Lüttge U (2000) Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll-fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell & Environment* **23**: 1397-1405

Rhoads FM (1971) Relations between Fe in irrigation water and leaf quality of cigar wrapper tobacco. *Agronomy Journal* **63**: 938-940

Ricks GR, Williams RJH (1974) Effects of atmospheric pollution on deciduous woodland, Part 2: Effects of particulate matter upon stomatal diffusion resistance in leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Leibl.. *Environment Pollution* **6**: 87-109

Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 643-668

Schreiber U, Berry JA (1977) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta* **136**: 233-238

Sharifi MR, Gibson AC, Rundel PW (1997) Surface dust impacts on gas exchange in Mojave Desert shrubs. *Journal of Applied Ecology* **34**: 837-846

Sharkey TD, Raschke K (1981) Separation and Measurement of Direct and Indirect Effects of Light on Stomata. *Plant Physiology* **68**: 33-40

Shevyakova NI, Stetsenko LA, Meshcheryakov AB, Kuznetsov VV (2002) The activity of the peroxidase system in the course of stress-induced CAM development. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**: 598-604

Silva LC (2003) **Avaliações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas dos efeitos de poluentes atmosféricos sobre espécies vegetais de restinga**. Tese de doutorado em Fisiologia Vegetal, UFV, 109pg.

- Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, Araújo JM, Aguiar RM** (2005) Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water, Air, and Soil Pollution* **168**: 129-143
- Sinha S, Gupta M, Chandra P** (1997) Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**: 286-291
- Skillman JB, Winter K** (1997) High photosynthetic capacity in a shade-tolerant CAM plant. Implications for sunfleck use, nonphotochemical energy dissipation, and susceptibility to photoinhibition. *Plant Physiology* **113**: 441-450
- Smillie RM, Nott R** (1979) Heat injury in leaves of alpine, temperate and tropical plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **6**: 135-141
- Souza-Santos P, Ramos RS, Ferreira ST, Carvalho-Alves PC** (2001) Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1512**: 357-366
- Suh H, Kim CS, Lee J, Jung J** (2002) Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochemistry and Photobiology* **75**: 513-518
- Tarhanen S, Metsärinne S, Holopainen T, Oksanen J** (1999) Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental Pollution* **104**: 121-129
- Terry N, Abadia J** (1986) Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* **9**: 609-646
- Thompson JE, Legge RL, Barber RF** (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* **105**: 317-344
- Thompson JR, Mueller PW, Fliickigert W e Rutter AJ** (1984) The effect of dust on photosynthesis and its significance for roadside plants. *Environmental Pollution (Series A)* **34**: 171-190
- Tiffin LO** (1966) Iron Translocation: I. Plant Culture, Exudate Sampling. Iron-Citrate Analysis. *Plant Physiology* **41**: 510-514
- Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, Briat JF, Fourcroy P** (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Letter* **410**: 1195-1200
- Wellburn, AR** (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307-313.
- Zaluar HLT, Scarano FR** (2000) Facilitação em restingas de moitas: um século de buscas por espécies focais. In: Esteves FA, Lacerda LD (eds). **Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras**. NUPEM-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 1–21

7. APÊNDICE

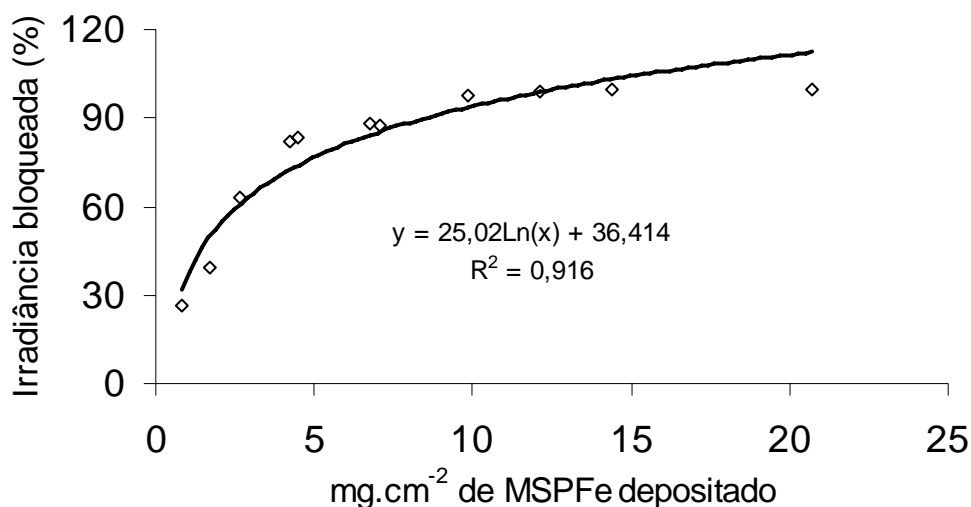


Figura 1A: Curva de bloqueio da radiação luminosa (%) em relação à deposição do MSPFe em placas de Petri.

Quadro 1A: Significância da anova para trocas gasosas em *C. hilariana* submetida a níveis de MSPFe aplicados ao solo (FERRO) aos 29, 44, 75, 93 e 110 dias após a imposição dos tratamentos (DAIT).

Fonte de Variação	A	g_s	E	Ci/Ca	WUE
DAIT	*	***	***	***	***
FERRO	ns	ns	ns	ns	ns
DAIT*FERRO	ns	ns	ns	ns	ns

A (taxa fotossintética - $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), g_s (condutância estomática - $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), E (transpiração - $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), Ci/Ca (Razão entre a concentração interna e atmosférica de CO_2), WUE (Eficiência do uso de água). (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 2A: Significância da anova para variação diurna de fotossíntese (A) e condutância estomática (g_s) em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo (FERRO) ao longo do dia (HORA).

Fonte de Variação	A	g_s
HORA	***	***
FERRO	ns	ns
HORA*FERRO	ns	ns

(* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 3A: Significância da anova para teor de clorofila a, b, carotenóides e razão clorofila a/b em *C. hilariana* submetida a diferentes níveis de MSPFe aplicados ao solo (FERRO) em folhas de diferentes idades.

Fonte de Variação	Clorofila a	Clorofila b	Carotenóides	Clorofila a/b
FOLHA	***	ns	ns	***
FERRO	ns	ns	ns	ns
FOLHA*FERRO	ns	*	ns	ns

(* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 4A: Significância da anova para taxa de transporte de elétrons (ETR) e $\Delta F/F'm$ em *C. hilariana* submetida níveis de MSPFe aplicados ao solo (FERRO) sob diferentes PPFD (densidade de fluxo fotossintético).

Fonte de Variação	ETR	$\Delta F/F'm$
PPFD	***	***
FERRO	ns	ns
PPFD*FERRO	ns	ns

(*** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 5A: Significância da anova para trocas gasosas em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar aos 3, 8, 13, 28, 39 e 45 dias após a imposição dos tratamentos (DAIT).

Fonte de Variação	A	g_s	E	Ci/Ca	WUE
DAIT	**	ns	***	***	***
MSPFe	***	***	***	*	**
DAIT*MSPFe	*	ns	ns	ns	ns

A (taxa fotossintética - $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), g_s (condutância estomática - $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), E (transpiração - $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), Ci/Ca (Razão entre a concentração interna e atmosférica de CO_2), WUE (Eficiência do uso de água). (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 6A: Significância da anova para variação diurna de fotossíntese (A) e condutância estomática (g_s) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar ao longo do dia (HORA).

Fonte de Variação	A	g_s
HORA	***	***
MSPFe	***	***
HORA*MSPFe	***	***

(*** : $p < 0,001$).

Quadro 7A: Significância da anova para temperatura foliar ao longo do dia (HORA) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar.

Fonte de Variação	Temperatura foliar
HORA	***
MSPFe	***
HORA*MSPFe	ns

(*** : $p < 0,001$).

Quadro 8A: Significância da anova para teor de clorofila a, b, carotenóides e razão clorofila a/b em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície de folhas de diferentes idades.

Fonte de Variação	Clorofila a	Clorofila b	Carotenóides	Clorofila a/b
FOLHA	***	**	ns	ns
MSPFe	**	**	**	ns
FOLHA*MSPFe	***	ns	ns	***

(* : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 9A: Significância da anova para taxa de transporte de elétrons (ETR) e rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar, sob diferentes PPFD (densidade de fluxo fotossintético).

Fonte de Variação	ETR	$\Delta F/F'm$
PPFD	***	***
MSPFe	***	***
PPFD*MSPFe	***	***

(*** : $p < 0,001$; ns : não significativo).

Quadro 10A: Significância da anova para fluorescência mínima ou inicial (F_0 ; A) e eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m ; B) em *C. hilariana* submetida à aplicação de MSPFe na superfície foliar ao longo do dia (HORA).

Fonte de Variação	F_0	F_v/F_m
HORA	***	***
MSPFe	***	***
HORA*MSPFe	***	ns

(*** : $p < 0,001$; ns : não significativo).