



TAÍS TORRES

**METABOLISMOS DO NITROGÊNIO, DO CARBONO E
ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE IPÊ-FELPUDO
(*Zeyheria tuberculosa*) CULTIVADAS EM EXCESSO DE
FERRO E MANGANÊS**

**LAVRAS-MG
2021**

TAÍS TORRES

**METABOLISMOS DO NITROGÊNIO, DO CARBONO E ANTIOXIDANTE EM
PLANTAS JOVENS DE IPÊ-FELPUDO (*Zeyheria tuberculosa*) CULTIVADAS EM
EXCESSO DE FERRO E MANGANÊS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Monteze Bicalho
Coorientadora

**LAVRAS- MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Torres, Taís.

Metabolismos do nitrogênio, do carbono e antioxidante em plantas jovens de Ipê-Felpudo (*Zeyheria Tuberculosa*) cultivadas em excesso de ferro e manganês / Taís Torres. - 2021.

69 p. : il.

Orientador(a): Luiz Edson Mota de Oliveira.

Coorientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Elementos traço. 2. Toxidez. 3. Mineração. I. Oliveira, Luiz Edson Mota de. II. Bicalho, Elisa Monteze. III. Título.

TAÍS TORRES

METABOLISMOS DO NITROGÊNIO, DO CARBONO E ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE IPÊ-FELPUDO (*Zeyheria tuberculosa*) CULTIVADAS EM EXCESSO DE FERRO E MANGANÊS

NITROGEN, CARBON AND ANTIOXIDANT METABOLISMS IN YOUNG IPE-FELPUDO PLANTS (*Zeyheria tuberculosa*) CULTIVATED IN EXCESSIVE IRON AND MANGANESE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de junho de 2021.

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Elisa Monteze Bicalho

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

UFLA

UFLA

UNIFAL

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

Prof^a. Dr^a. Elisa Monteze Bicalho
Coorientadora

**LAVRAS –MG
2021**

Aos meus pais e irmãos

Aos meus amados avós Dorcelina e Genésio

DEDICO

A cada pessoa que de alguma forma contribuiu para realização desse trabalho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e por tornar tudo possível.

Agradeço aos meus pais por tanto amor, dedicação, apoio e suporte a cada escolha.

Aos meus irmãos, pessoas que tanto amo e admiro. Obrigada por terem me dado meus maiores presentes da vida que são meus sobrinhos. Vocês são meus heróis!

Aos meus avós por serem o meu maior tesouro e porto seguro.

A Lissa por tanto companheirismo e por ser a minha força, inspiração e incentivo diário.

Aos meus amigos mais antigos e aos mais novos que encontrei nessa caminhada da vida, obrigada por serem meus anjos aqui na terra.

A Val e Thaiara pelo trabalho duro, desde o início do experimento até o final das análises, obrigada meninas, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao professor Lucas Amaral pelo fornecimento das sementes utilizadas nesse experimento e por todo o suporte oferecido para a obtenção de mudas e pelas sugestões para a elaboração desse projeto.

Ao meu orientador e professor Luiz Edson, esse humano incrível com uma história de vida admirável. Obrigada por todo aprendizado e incentivo.

Agradeço a professora Elisa por toda ajuda, paciência, atenção e por ter estado presente em todas as etapas desse trabalho. Saiba que a senhora é um exemplo a ser seguido como pessoa e como profissional.

Agradeço a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico, CAPES, FAPEMIG e FAPES pelo apoio financeiro ao projeto de Revitalização da bacia hidrográfica do rio doce, do qual esse trabalho faz parte.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e a Universidade Federal de Lavras pela estrutura oferecida e oportunidade que me foi dada de fazer parte dessa instituição.

E ao setor de fisiologia vegetal pelo acolhimento.

OBRIGADA!

RESUMO

O setor de mineração apresenta uma importância incontestável para a economia brasileira. Todavia, essa atividade produz grande quantidade de resíduos potencialmente danosos ao meio ambiente. Exemplo disso foi o rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), em novembro de 2015, onde os rios e centenas de quilômetros de áreas adjacentes à bacia do Rio Doce foram contaminadas com o rejeito, composto por concentrações elevadas de elementos traço, dentre os quais, Fe e Mn que foram encontrados em maiores quantidades. Espécies como *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., mais conhecida como ipê-felpudo, apresentam-se como uma boa alternativa para revegetação de áreas contaminadas por mineração por se tratar de uma espécie nativa, secundária inicial em relação ao grupo de sucessão ecológica e com características ruderais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do excesso de Fe e Mn nos metabolismos do nitrogênio, do carbono e antioxidante em plantas jovens de ipê-felpudo. As plantas foram cultivadas em vasos preenchidos com areia, irrigada com solução nutritiva completa (BOLLE-JONES, 1957), – SNC (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), totalizando 4 tratamentos e 6 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de significância no software R®. Foram avaliadas as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio (RN, GS, GOGAT e GDH) e do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), parâmetros fotossintéticos, parâmetros de crescimento, concentrações de clorofilas e carotenoides, quantificação de carboidratos, proteínas e aminoácidos, além da quantificação dos teores de nitrogênio, ferro e manganês nas plantas. O excesso de ferro provocou sintomas de toxidez, evidenciados pela diminuição do comprimento radicular, redução no teor de pigmentos e da eficiência fotossintética, aumento de H₂O₂ nas folhas e redução de carboidratos nas raízes, o que não foi observado nos tratamentos com excesso de manganês. Em plantas sob altas concentrações tanto de ferro, quanto de manganês, foram observadas alterações no metabolismo do nitrogênio, degradação de proteínas e aumento de aminoácidos livres, redução dos teores de carboidratos solúveis e de reserva, aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e dano oxidativo nas folhas. O excesso de Mn se mostrou menos danoso, além de ter mitigado os efeitos tóxicos provocados pelo excesso ferro na maioria dos parâmetros fisiológicos avaliados, sugerindo que essa espécie tem potencial promissor para ser utilizada na recuperação de solos contaminados pelo rejeito contendo concomitantemente Fe e Mn nas concentrações anteriormente relatadas.

Palavras-chave: Elementos traço. Toxidez. Mineração. Mata Atlântica. Fotossíntese.

ABSTRACT

The mining sector has an undeniable importance for the Brazilian economy. However, this activity produces a large amount of waste potentially harmful to the environment. An example of this was the collapse of the Fundão dam (Mariana/MG) in November 2015, where rivers and hundreds of kilometers of areas adjacent to the Rio Doce basin were contaminated with tailings, composed of high concentrations of trace elements, among which, Fe and Mn were found in larger quantities. Species such as *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., better known as Ipê-felpudo, are a good alternative for revegetation of areas contaminated by mining because it is a native species, initial secondary to the succession group ecological and with ruderal characteristics. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of excess Fe and Mn on nitrogen, carbon and antioxidant metabolisms in young ipê-fery plants. Plants were grown in pots filled with sand, irrigated with complete nutrient solution (CNS) (BOLLE-JONES, 1957), – CNS (control), CNS with excess iron – 0.160 mM (+ Fe), CNS with excess manganese – 0.327 mM (+ Mn) and CNS with excess iron and manganese – 0.160 mM + 0.327 mM (+ Fe + Mn). The experimental design used was completely randomized, totaling 4 treatments and 6 replications. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at 5% significance in the R® software. The activities of enzymes involved in nitrogen metabolism (NR, GS, GOGAT and GDH) and the antioxidant system (SOD, CAT and APX), photosynthetic parameters, growth parameters, concentrations of chlorophylls and carotenoids, quantification of carbohydrates, proteins and amino acids, in addition to the quantification of nitrogen, iron and manganese contents in the plants, were evaluated. Excess iron caused symptoms of toxicity, evidenced by decreased root length, reduced pigment content and photosynthetic efficiency, increased H₂O₂ in leaves and reduced carbohydrates in roots, which were not observed in treatments with excess manganese. In plants under high concentrations of both iron and manganese, changes in nitrogen metabolism, protein degradation and increase in free amino acids, reduction in soluble and reserve carbohydrates, increased enzyme activity of the antioxidant system and damage oxidative in the leaves were observed. The excess of Mn proved to be less harmful, in addition to having mitigated the toxic effects caused by excess iron in most of the physiological parameters evaluated, suggesting that this species has promising potential to be used in the recovery of soils contaminated by tailings containing concomitantly Fe and Mn in the previously reported concentrations.

Keywords: Trace elements. Toxicity. Mining. Atlantic forest. Photosynthesis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Importância econômica do setor de mineração no Brasil	12
2.2	Rompimento da Barragem de Fundão e aspectos físico-químicos dos solos contaminados pelo rejeito	13
2.3	Disponibilidade de Ferro	14
2.4	Disponibilidade de Manganês	16
2.5	Metabolismo e assimilação de nitrogênio e carbono	17
2.6	Sistema antioxidante	19
2.7	Ipê-Felpudo [<i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bureau ex Verl.]	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Obtenção das mudas e condições de experimento	23
3.2	Preparo de solução nutritiva de cultivo	23
3.3	Tratamentos	24
3.4	Avaliações de crescimento	25
3.5	Avaliações de parâmetros fotossintéticos	25
3.6	Avaliações bioquímicas	26
3.6.1	Enzimas do sistema antioxidante	26
3.6.1.1	Dismutase do superóxido (SOD)	26
3.6.1.2	Catalase (CAT)	27
3.6.1.3	Peroxidase do ascorbato (APX)	27
3.6.2	Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	27
3.6.3	Peroxidação lipídica	28
3.6.4	Extração e quantificação de carboidratos, aminoácidos e proteínas totais	28
3.6.5	Extração e quantificação de amido	29
3.6.6	Quantificação de nitrogênio	30
3.6.7	Enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio	31
3.6.8	Quantificação de ferro e manganês	32
3.6.9	Determinação dos teores de Clorofilas e Carotenoides	33
3.7	Análise estatística	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Concentração de ferro e manganês	34

4.2	Efeito do excesso de Fe e Mn no crescimento das plantas de <i>Z. tuberculosa</i>	35
4.3	Clorofilas e Carotenoides.....	38
4.4	Parâmetros fotossintéticos.....	40
4.5	Conteúdo de nitrogênio Total.....	42
4.6	Atividade das enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio (GS, GDH, GOGAT e RN).....	43
4.7	Proteínas e aminoácidos.....	46
4.8	Carboidratos.....	48
4.9	Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica.....	51
4.10	Atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX).....	53
5.	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A mineração é uma das atividades econômicas de maior relevância para o Brasil. Porém, é responsável por produzir quantidade significativa de resíduos compostos por materiais químicos potencialmente tóxicos ao meio ambiente. A forma de descarte mais utilizada pelas mineradoras para depositar seus resíduos é através de barragens de contenção de rejeito, uma espécie de reservatório que serve para contenção e acúmulo do material líquido descartado, contendo substâncias químicas advindas do processo de beneficiamento de minérios (SOARES, 2010; KOSSOFF et al., 2014). Em novembro de 2015, ocorreu o rompimento da barragem de rejeitos de Fundão, localizada no distrito de Bento Rodrigues, município de Mariana, no estado de Minas Gerais. Este incidente lançou cerca de 68% de um total de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração na bacia hidrográfica do Rio Doce (IBAMA, 2015).

O rejeito impactou negativamente a vegetação nativa dos biomas mata atlântica e cerrado, incluindo áreas de preservação permanente (APP's), causou assoreamento dos cursos hídricos, acúmulo de sedimentos de natureza instável nas margens e impactou as condições físicas e a fertilidade dos solos (EMBRAPA, 2015; SAMARCO, 2016). Análises realizadas em solos de áreas atingidas pelo rejeito revelaram aumento na concentração de P, K, Ti, Mn, Fe, Zn, Rb, Sr, Zr e Pb, aumento do pH, baixa fertilidade e perda de matéria orgânica. Dentre esses elementos identificados, o ferro e o manganês foram os que apresentaram maiores concentrações (HATJE et al., 2017; SILVA et al., 2017; TRUGILHO, 2018).

Ferro e manganês são elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, sobretudo devido a capacidade redox desses metais. São requeridos em pequenas quantidades, por isso são considerados micronutrientes, pois a mesma função redox que os tornam importantes para as plantas, quando presentes em altas concentrações, podem provocar desequilíbrio metabólico gerando danos aos tecidos vegetais, principalmente pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a toxicidade causada por ferro e manganês compromete processos vitais das plantas, através dos distúrbios que provocam nos processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos, incluindo a absorção e assimilação de outros nutrientes essenciais como o nitrogênio (KROHLING et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

As áreas atingidas pelo rejeito de mineração depositado após o rompimento da barragem são passíveis de recuperação e o uso de espécies nativas é fundamental para esse processo, permitindo a devolução dos serviços ecossistêmicos à área degradada. Estudos

sobre o desenvolvimento inicial de espécies nativas, perante as mudanças em seu ambiente natural após o acidente com a finalidade de descobrir quais impactos o rejeito pode causar no metabolismo das plantas, e se as mesmas serão capazes de se reestabelecer novamente na região são importantes para a viabilização e restauração dessas áreas. Centenas de famílias de árvores nativas da Bacia do Rio Doce já foram identificadas e listadas em estudos de composição florística, como espécies com potencial uso para recuperação ambiental, por exemplo as espécies das famílias Rubiaceae, Fabaceae, Asteraceae e Myrtaceae entre outras (LOMBARDI; GONÇALVES, 2000; FRANÇA; STEHMANN, 2013). Para este estudo, foi selecionada a espécie *Zeyheria tuberculosa*, popularmente conhecida como Ipê-felpudo, pertencente à família Bignoniaceae, devido a sua ocorrência natural na região (LOMBARDI; GONÇALVES, 2000), por ser considerada uma espécie de sucessão secundária inicial a secundária tardia no processo de regeneração de áreas degradadas (BARBOSA; MACEDO, 1993; FERRETTI et al., 1995; LORENZI, 2002) e devido a disponibilidade de sementes para a realização de experimentos.

Ainda não existem trabalhos que contenham informações básicas sobre eventos relacionados a assimilação de nitrogênio, carbono e sistema antioxidante em plantas de Ipê-Felpudo. Tendo em vista a importância de estudos envolvendo os impactos ambientais causados por atividades antrópicas e o restabelecimento de espécies nativas para recuperação do meio ambiente degradado, aliada à escassez de pesquisas envolvendo essa temática, o objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis alterações nos metabolismos do nitrogênio, do carbono e antioxidante em plantas jovens de *Z. tuberculosa* expostas ao excesso de ferro e manganês.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do setor de mineração no Brasil

O Brasil é um país localizado em uma região geograficamente favorável no que diz respeito à disponibilidade de recursos naturais. Os solos brasileiros apresentam reservas expressivas de minérios com importância econômica, como ferro, manganês, ouro, alumínio, cobre, níquel, entre outros. Dessa forma, as empresas de mineração têm grande interesse em explorar esses recursos, o que acaba propiciando a movimentação da economia do país (BARCELOS; LAGE; CORDEIRO, 2020).

A mineração de ferro é importante para a economia brasileira, principalmente por fornecer insumos na produção de ferramentas, máquinas entre outros materiais essenciais em diferentes setores da economia. Segundo o BNDES (2014), as principais empresas de exploração mineral do Brasil são: Vale (84,52%), SAMARCO (6,29%), CSN (5,45%) e USIMINAS (2%), localizadas nos estados do Pará (Serra dos Carajás), Mato Grosso do Sul (Maciço do Urucum) e Minas Gerais (Quadrilátero Ferrífero) (GERMANI, 2002). Em Minas Gerais, recebe o nome de Quadrilátero Ferrífero, pois possui forma semelhante a um quadrado, com cerca de 7000 Km², que abrange as cidades de Itabira, Mariana, Rio Piracicaba, Itabirito e Barão de Cocais e seus respectivos distritos (GERMANI, 2002; ROESER; ROESER, 2010).

A atividade mineradora é composta por três fases, sendo elas a extração do minério das rochas, o beneficiamento do material para obtenção do produto de interesse, e por fim, o descarte das sobras desse beneficiamento, chamadas de rejeito. Essa terceira fase é o maior desafio para as mineradoras, que precisam descartar adequadamente esse material potencialmente danoso para o meio ambiente, pois podem causar degradações ambientais e paisagísticas (ARAÚJO, 2006).

A forma de descarte que as empresas de mineração consideram economicamente viável e a mais utilizada para a destinação dos rejeitos é através de barragens de contenção. Essas barragens consistem em uma espécie de reservatório que serve para depósito e acúmulo de material líquido descartado, o qual contém substâncias químicas advindas do processo de beneficiamento de minérios (SOARES, 2010; KOSSOFF et al., 2014). Contudo, diversos acidentes foram registrados ao decorrer dos últimos anos em mineradoras que utilizam esse tipo de estrutura, dentre eles, o rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG). Esse tipo de acidente envolvendo a dispersão de elementos traço se difere das demais atividades

antropogênicas devido à velocidade que a lama pode alcançar e aos estragos que ela pode causar à biota e aos corpos hídricos, ao cobrir solos, várzeas, sedimentos e margens de rios (HATJE et al, 2017).

2.2 Rompimento da Barragem de Fundão e aspectos físico-químicos dos solos contaminados pelo rejeito

No dia 05 de novembro de 2015 ocorreu o maior acidente ambiental no setor de mineração do Brasil e do mundo (CARMO et al., 2017), com o rompimento da barragem de rejeitos de Fundão. A barragem pertencia ao complexo minerário de Germano, localizada no distrito de Bento Rodrigues, município de Mariana/MG, propriedade da mineradora Samarco (IBAMA, 2015). De um total de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração contido na barragem, aproximadamente 35 milhões foram lançados no Rio Gualaxo do Norte e Rio Carmo, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Doce, chegando ao Oceano Atlântico em 22 de novembro de 2015. O rejeito percorreu 663,2 km de corpos hídricos diretamente impactados causando danos ambientais considerados graves. A fauna e a flora assim como espécies endêmicas foram afetadas severamente, além de ter provocado a morte de 19 pessoas e afetado direta e indiretamente milhares de outras pessoas em 39 municípios atingidos pela lama (IBAMA, 2015; SAMARCO, 2016).

A bacia hidrográfica do Rio Doce está localizada na região sudeste do Brasil, com 86% de sua área de drenagem localizada no estado de Minas Gerais e 14% no estado do Espírito Santo, totalizando 82.646 Km². O bioma da mata atlântica está presente em 98% da bacia do Rio Doce. Os 2% restantes fazem parte do bioma de Cerrado (VIEIRA, 2010; SILVA et al., 2013; IBAMA, 2015). Originalmente, a bacia era composta por Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa, com grandes matas ciliares. Hoje em dia, essa vegetação ocupa apenas 7% da área (ROMEIRO et al., 2012).

O rompimento da barragem de Fundão impactou cerca de 1.587 hectares de cobertura vegetal, sendo mais de um terço dessa área pertencente à Mata Atlântica, incluindo áreas de preservação permanente (APP) (SEDRU, 2016). Segundo relatórios e laudos técnicos publicados após o acidente (IBAMA, 2015; EMBRAPA, 2015; SAMARCO, 2016), o rejeito causou assoreamento dos cursos hídricos, acúmulo de sedimentos de natureza instável nas margens, impactos nos aspectos físicos do solo, na sua fertilidade e causando contaminação química por elementos utilizados no beneficiamento do minério de ferro, pelos metais: arsênio, ferro, manganês, cobre, chumbo, magnésio e alumínio. Além da contaminação pela deposição do rejeito, houve ainda a ressuspensão dos sedimentos que já estavam acomodados

no fundo dos rios, elevando a concentração de outros metais potencialmente tóxicos como o mercúrio (IBAMA, 2015; EMBRAPA, 2015; SAMARCO, 2016).

Em geral, as pesquisas mostraram que os solos contaminados por rejeito de mineração de ferro continham altas concentrações de elementos-traço. Por outro lado, esses solos apresentam baixo teor de matéria orgânica e baixa fertilidade mineral (HUDSON-EDWARDS, 2003; KOSSOFF et al., 2014). Cruz et al. (2020) encontraram, em amostras de rejeito, valores próximos a zero para os macronutrientes N, P, K e Mg e para a matéria orgânica. Em contrapartida, encontraram valores altos em relação a concentração de ferro e manganês disponíveis no solo ($\text{Fe} = 9,2 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Mn} = 18,5 \text{ mg L}^{-1}$). Segura et al. (2016) apontaram Fe e Mn como os elementos encontrados em maior concentração em solos atingidos pelo rejeito. Também foi observado o aumento do pH, valores baixos de matéria orgânica e diminuição da capacidade de troca catiônica (CTC) do solo (SILVA et al., 2017; TRUGILHO, 2018). Pinto-Coelho (2015) observou o aumento do pH em solos cobertos pela lama, para níveis acima do considerado ideal para o desenvolvimento de plantas. Esses resultados estão em concordância com o laudo divulgado pela EMBRAPA (2015).

2.3 Disponibilidade de Ferro

O Ferro (Fe) é um micronutriente e apresenta uma ampla faixa funcional no metabolismo das plantas. As formas biológicas mais abundantemente encontradas nas plantas estão em complexos de ferro-enxofre (Fe-S), proteínas contendo heme e ferro mononuclear, nas quais o ferro está envolvido como um cofator enzimático (BALK; SCHAEDLER, 2014). Por ser um componente importante de proteínas, principalmente em reações oxiredutoras, o ferro desempenha um papel fundamental em processos metabólicos, como a respiração, fotossíntese, síntese de clorofila, fixação do nitrogênio, síntese de DNA e hormônios (REEVES; BAKER, 2000; KIM; GUERINOT, 2007; DE OLIVEIRA JUCOSKI et al., 2013; BALK; SCHAEDLER, 2014).

Mesmo sendo considerado o segundo metal mais abundante (CHEN et al., 2019) e constituinte de aproximadamente 5% da crosta terrestre (MENGEL; KIRKBY, 1987), o ferro é o terceiro nutriente mais limitante no metabolismo e desenvolvimento vegetal (ZUO; ZHANG, 2011; SAMARANAYAKE; PEIRIS; DSSANAYAKE, 2012), pois a maior parte do ferro encontrado na natureza não está disponível na forma que pode ser absorvida pelas plantas (YI et al., 1994; JEONG; GUERINOT, 2009). A maneira mais comum de se encontrar o ferro em ambientes aeróbicos é na sua forma oxidada, chamado de ferro férrico (Fe^{3+}), como constituinte de polímeros de baixa solubilidade e, portanto, indisponível para as plantas.

Essa é a principal causa de deficiência de ferro em culturas (JEONG; GUERINOT, 2009; ZUO; ZHANG, 2011; SAMARANAYAKE; PEIRIS; DSSANAYAKE, 2012). Os sintomas causados devido à deficiência de ferro nas plantas são clorose internerval em folhas jovens, devido à sua pouca mobilidade no floema, e redução do crescimento e produtividade das plantas (SFREDO; BORKERT, 2004; JEONG; GUERINOT, 2009).

Entretanto, é comum em solos com pH ácido e com baixas concentrações de oxigênio ou totalmente alagados, que o ferro férrico (Fe^{3+}) sofra redução e seja convertido em ferro ferroso (Fe^{2+}), se tornando um íon solúvel e disponível para ser absorvido pelas plantas. Nessas condições ocorre um considerável aumento da concentração de ferro no solo e nos organismos vegetais (SCHMIDT, 1993). Esse aumento na concentração de ferro também ocorre em solos contaminados com rejeitos provenientes de atividades antrópicas (BAKER et al., 1994; BISINOTI; YABE; GIMENEZ, 2004), como por exemplo na região do “Quadrilátero Ferrífero” em Minas Gerais, cujas empresas de mineração produzem e emitem material particulado de ferro, contaminando solo, água e ar (KUKI et al., 2008; DE OLIVEIRA JUCOSKI et al, 2013). Sob essas condições, há uma absorção excessiva de ferro pelas plantas, o que pode causar toxicidade interferindo ou afetando o metabolismo e consequentemente o seu crescimento e desenvolvimento (CRICHTON et al., 2002).

Além dos danos diretos causados pelo excesso de absorção e acúmulo de ferro no organismo vegetal, os altos níveis desse elemento na solução do solo podem precipitar sobre as raízes e formar uma crosta de óxido de ferro, afetando diretamente na absorção de outros nutrientes importantes para as plantas (HANSEL et al., 2001). Em plantas superiores, a toxidez de ferro pode provocar sintomas como manchas necróticas nas folhas, escurecimento de raízes e inibição do crescimento (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000). Sendo assim, a homeostase de ferro deve ser mantida, pois tanto a toxidez quanto a deficiência desse elemento podem ser prejudiciais aos processos fisiológicos das plantas (WALKER; CONNOLLY, 2008).

Qualquer variação na drenagem, composição ou outras atividades promovidas pela biota do solo pode promover a solubilização de compostos formados por ferro e outros metais associados, apresentando um risco de contaminação crônica e toxidez em plantas (QUEIROZ et al., 2018). O rompimento da barragem de Fundão, por exemplo, promoveu o derramamento de milhões de toneladas de rejeito enriquecido com ferro e outros elementos como o manganês (EMBRAPA, 2015). A mineração, assim como outras atividades antropogênicas, por exemplo a queima de combustíveis fósseis, o descarte industrial e de resíduos municipais, fertilizantes, pesticidas, e alterações de lodo de esgoto são apontadas como principais

responsáveis pelo aumento da concentração de ferro no solo (JAYAWEERA et al., 2008; SARMA et al., 2012).

2.4 Disponibilidade de Manganês

O manganês (Mn) é um dos metais mais abundantes da Terra e assim como o ferro, também faz parte dos elementos essenciais para as plantas, importante em todas as fases do desenvolvimento (MARSCHNER, 1995). Além de participar de reações redox da célula, o Mn é um metal que atua como ativador de diversas enzimas, como por exemplo as descarboxilases e as desidrogenases envolvidas no ciclo de Krebs. Algumas enzimas são completamente dependentes de Mn para que se tornem ativas. Dentre elas, as mais conhecidas são a dismutase do superóxido (Mn-SOD), oxalato oxidase e aquelas do complexo mangânico presente no fotossistema II (PSII) no qual ocorre a fotólise da água (WALDRON et al., 2009; ZHU; RICHARDS, 2017).

A deficiência de Mn afeta diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois sua ausência prejudica o funcionamento das enzimas que está associado, impedindo reações importantes para o funcionamento e manutenção do metabolismo celular, como a germinação de sementes, eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), resistência a doenças fúngicas e principalmente a fotossíntese, devido ao seu papel fundamental no complexo de evolução do oxigênio (CEO) do PSII (UMENA et al., 2011; FERNANDO; LYNCH, 2015; SCHMIDT; HUSTED, 2019). Além disso, as plantas com deficiência de Mn apresentam clorose internerval nas folhas novas devido à baixa mobilidade desse elemento no floema (KIRKBY; ROMHELD, 2007; SCHMIDT; JENSEN; HUSTED, 2016).

Nos solos, o Mn pode ser encontrado em três estados de oxidação (Mn^{2+} , Mn^{3+} e Mn^{4+}), entretanto só a forma bivalente Mn^{2+} é disponível para a absorção das plantas (SCHMIDT; HUSTED, 2019). Em rejeitos provenientes da atividade de mineração, este elemento é depositado na forma de óxidos (BRASIL, 2004). Solos ácidos (pH <5,5) propiciam o aumento da disponibilidade de Mn^{2+} , o que favorece o excesso desse elemento nas plantas (FAGERIA; STONE, 2008). Assim como a falta de Mn, o excesso também é prejudicial às plantas, pois pode causar toxidez. As concentrações que podem causar toxidez de Mn nas plantas variam de acordo com as espécies, sendo algumas mais tolerantes que outras (KOCHIAN et al., 2004; DUCIC; POLLE, 2005).

A toxidez de Mn nas plantas resulta na degradação de lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (FERNANDO et al., 2013). Também pode prejudicar a captação e redistribuição de outros nutrientes, como o ferro e o nitrogênio por exemplo, além de alterar

as atividades enzimáticas (LAVRES JUNIOR et al., 2010). Os sintomas de toxidez de Mn variam consideravelmente em relação às espécies vegetais, entretanto, folhas enrugadas, manchas marrons em folhas mais velhas cercadas por clorose, são os sintomas mais comuns causados por toxidez de manganês (EL-JAOUAL; COX, 1998; FERNANDO; LYNCH 2015).

2.5 Metabolismo e assimilação de nitrogênio e carbono

O nitrogênio está presente na biosfera predominantemente em sua forma molecular (N_2), com cerca de 78% por volume. Entretanto, as plantas não são capazes de absorver o N_2 , e, por isso, dependem da quebra da ligação tripla entre as moléculas de nitrogênio para que sejam produzidas moléculas de amônia (NH_3) e nitrato (NO_3^-) através de reações químicas sucessivas. Todas as moléculas complexas sintetizadas pelas plantas que contém nitrogênio, partem de simples compostos minerais como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) que são as principais formas de absorção.

O NO_3^- ao ser absorvido pelas plantas, pode ser assimilado tanto nas raízes quanto na parte aérea (FORDE, 2002). Para que isso aconteça, o NO_3^- precisa ser reduzido a NH_4^+ por meio de uma reação que acontece em duas etapas. A primeira ocorre no citosol, catalisada pela enzima redutase do nitrato (RN), que reduz o nitrato a nitrito (NO_2^-). E a segunda etapa é catalisada pela redutase do nitrito (RNi), que reduz nitrito a amônio (LI et al., 2013). O amônio obtido da redução do nitrato é incorporado aos aminoácidos envolvendo reações catalisadas pelas enzimas glutamina sintetase (GS) citosólica, GS plástica e glutamato sintase (GOGAT). A GS forma glutamina ligando o NH_4^+ ao glutamato (LEA; MIFLIN, 2011). Para que essa reação ocorra, é necessária a quebra de uma molécula de ATP (Adenosina Trifosfato) e de um cátion bivalente como cofator, como por exemplo o Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} . A GOGAT (glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase) transfere um N amídico da glutamina para o 2-oxoglutarato, formando duas moléculas de glutamato, configurando a rota GS/GOGAT, considerada a principal via de assimilação primária de NH_4^+ (LEA; MIFLIN, 2011).

Existe ainda uma rota alternativa que sintetiza ou desamina o 2-oxoglutarato, catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) (FONTAINE et al., 2012; TERCÉ-LAFORGUE et al., 2013). Contudo, a rota da GDH não é capaz de substituir a rota principal (GS/GOGAT) de assimilação de amônio e, segundo alguns estudos, está limitada apenas a desaminar o glutamato durante a realocação do nitrogênio, principalmente, quando a planta está sob condições ambientais adversas (SKOPELITIS et al., 2006).

Devido ao papel central do nitrogênio no metabolismo vegetal, sua interação com outros nutrientes pode influenciar o desenvolvimento das plantas (FAGERIA, 2001; WILKINSON, 1999). A interação entre o nitrogênio e os micronutrientes como o ferro e manganês pode ocorrer devido às alterações do pH do meio, dependendo também da forma como o N é absorvido (NH_4^+ ou NO_3^-), uma vez que, a disponibilidade de Fe e Mn para as plantas é altamente influenciada pelo pH presente no substrato. O aumento da absorção de NH_4^+ diminui o pH e aumenta a concentração de Fe disponível para as plantas. O contrário ocorre quando o N é absorvido majoritariamente na forma de NO_3^- (WALLACE; WOOD; SOUFI, 1976; AKTAS; VAN EGMOND, 1979). É importante citar que, a reação que reduz o nitrato a amônio envolve a transferência de elétrons da molécula de ferredoxina, uma proteína transportadora de elétrons constituída por átomos de ferro e enxofre (TORTOLERO, 1975). O crescimento estimulado pelo aumento da concentração de nitrogênio no organismo das plantas aumenta também a demanda por outros nutrientes, como o manganês, podendo levar a sua deficiência, tanto pela baixa concentração no solo, quanto pela competição catiônica com NH_4^+ (WILKINSON, 1999).

Cruz et al. (2020) encontraram valores muito baixos de nitrogênio em amostras de solos atingidos pelo rejeito oriundos do rompimento da Barragem do Fundão. Para qualquer tentativa de revegetação dessa área, haverá uma necessidade de gastos com aplicação de adubos compostos por este nutriente, devido ao seu papel essencial no desenvolvimento das plantas, juntamente com os demais macronutrientes. Altas concentrações de ferro e manganês causados pela deposição do rejeito após o rompimento da barragem, propiciam interações entre os mesmos e também interações com nitrogênio.

O carbono é um elemento fundamental na composição de moléculas orgânicas. Dentro das plantas, seu fluxo é controlado por três processos metabólicos principais, sendo eles a fotossíntese, fotorrespiração e respiração. Cada processo metabólico é composto por um conjunto de reações fisiológicas que podem ser influenciadas pelas condições ambientais nas quais as plantas são cultivadas. A primeira reação envolvida da assimilação de carbono pelas plantas é a fotossíntese, um processo que tem início através das reações luminosas, com a absorção de fótons de luz, que excitam uma clorofila especializada, chamada de P680, dando início ao transporte de elétrons para o acceptor final de elétrons (NADP^+), produzindo poder redutor (NADPH). Ao longo da cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese, um gradiente de prótons é criado através da membrana dos tilacoides e esse gradiente gera ATP a nível de substrato, por meio de uma proteína chamada ATP sintase.

A maior parte do ATP e NADPH gerados nesse processo, são consumidos no estroma do cloroplasto, no ciclo de Calvin-Benson, onde carbono é fixado, gerando trioses fosfato que, posteriormente serão utilizadas na formação de glicose, sacarose e outras moléculas compostas por carbono. A Rubisco, enzima responsável pela fixação do carbono durante as reações de carboxilação da fotossíntese, apresenta dupla função, devido à sua afinidade tanto com carbono quanto com oxigênio, ela pode carboxilar ou oxigenar molécula de ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A oxigenação da RuBP, por sua vez, produz uma molécula de 2-fosfoglicolato (PG) e uma de 3-fosfoglicerato (PGA), diferente do que acontece na carboxilação. Sendo o PG tóxico para o metabolismo vegetal, é rapidamente processado por fotorrespiração (ZELITCH et al., 2009). O processo de fotorrespiração recupera 75% do carbono a cada ciclo e os outros 25% restantes são perdidos para a atmosfera pela molécula de CO₂, em plantas C3, ou podem ser fixados nas plantas C4. Por fim, o processo de respiração promove a quebra da glicose formada por meio da fotossíntese para produzir uma quantidade de ATP suficiente para alimentar o metabolismo das plantas.

Quando as plantas são cultivadas em solos com excesso de ferro e manganês, o metabolismo do carbono pode ser afetado. O Mn, por exemplo, é um elemento essencial na quebra da molécula de água e liberação do oxigênio no fotossistema II (PSII), fornecendo os elétrons necessários para a fotossíntese (GOUSSIAS; BOUSSAC; RUTHERFORD, 2002; NICKELSEN; RENGSTL, 2013). Quantidades excessivas de Mn podem provocar toxidez às plantas e impedir, portanto, a biossíntese da clorofila e reduzir a eficiência fotossintética das plantas (MILLALEO et al., 2010). O ferro por sua vez, quando presente em excesso no meio de cultivo, pode acabar comprometendo o processo fotossintético, principalmente devido ao distúrbio nas reações de oxirredução que participa, promovendo estresse oxidativo, mudanças no pH e estado nutricional das plantas (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998). Os efeitos do excesso de Fe e Mn no metabolismo do carbono e do nitrogênio em espécies arbóreas nativas da região da Bacia do Rio Doce, como a *Z. tuberculosa* ainda são escassos na literatura.

2.6 Sistema antioxidante

A presença de Fe e Mn em excesso no solo ou solução nutritiva pode causar interferências nos processos metabólicos das plantas, como a redução na absorção de outros nutrientes ou a alteração do processo de transferência de elétrons nas organelas celulares, proporcionando condições favoráveis à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FARMER; MUELLER, 2013). Portanto, é essencial que as plantas expostas ao excesso

desses elementos tenham um sistema antioxidante eficiente, diminuindo, dessa maneira, os danos causados por essas moléculas instáveis. O sistema antioxidante vegetal é composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) estão entre as principais enzimas envolvidas no sistema antioxidante enzimático (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012) e agem por meio de mecanismos de prevenção, controlando ou muitas vezes impedindo a formação de EROs (SHARMA et al., 2012). O sistema antioxidante não enzimático inclui carotenoides, ascorbato, glutatona, α -tocoferóis, flavonoides e prolina (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

O ferro tem como característica, a capacidade de doar e receber elétrons, sendo esse um importante aspecto na sua função e participação nas reações vitais e estruturais importantes das plantas (WINTZ; FOX; VULPE, 2002). No entanto, quando há excesso desse elemento no organismo das plantas, pode ocorrer um desequilíbrio nas atividades redox nas células, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido formado pela ligação entre ferro e oxigênio ($O_2 + Fe^{2+} \rightarrow O_2^- + Fe^{3+}$) e radical hidroxila formado pela reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$), alterando as características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas dos vegetais (HELL; STEPHAN, 2003; BROADLEY et al., 2012; KROHLING et al., 2016). As EROs podem causar danos às células vegetais, como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos e pigmentos de cloroplasto, dentre outros (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação de lipídica nas membranas e, por isso, é utilizado como indicador do estresse oxidativo.

O manganês, por ser requerido em pequenas concentrações dentro das plantas, pode rapidamente causar estresse oxidativo nas mesmas quando presente em excesso no substrato (CLAIR; CARLSON; LYNCH, 2005; CLAIR; LYNCH, 2005). O estresse oxidativo ocorre, principalmente, devido à desorganização das lamelas do cloroplasto, lesão no sistema da membrana dos tilacoides e inibição do processo de fotofosforilação não cíclico provocados pelas altas concentrações de manganês (MILLALEO et al., 2010). A resposta do sistema antioxidante aos estresses causados pelo excesso desse elemento não segue um padrão, os resultados são variáveis e controversos. Isso se deve ao fato de que o Mn, assim como outros metais, promove diferentes mecanismos de indução de estresse, exigindo respostas diferentes. Essas respostas dependem da espécie, do tecido vegetal, do compartimento celular em que está ocorrendo o estresse, entre outros aspectos (SCHUTZENDUBEL; POLLE, 2002; GRATÃO et al., 2009; GILL; TUTEJA, 2010; SANTOS et al., 2017).

2.7 Ipê-Felpudo [*Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl.]

A *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., popularmente conhecida como ipê-felpudo, bolsa-de-pastor, bucho-de-boi, culhões-de-bode, ipê-bóia, ipê-preto, carobão entre outros, é uma espécie florestal nativa brasileira, que pertence à família Bignoniaceae, (GENTRY, 1992; CARVALHO, 2002). É uma árvore que pode variar de 6 a 35 metros de altura na fase adulta. Apresenta tronco reto e cilíndrico, com a copa colunar quando jovem e cônica a globosa quando adulta. A casca pode chegar à 5 cm de espessura, com coloração variando de cinza-clara a pardo-amarelada. As folhas são do tipo opostas, com cinco folíolos cartáceos, elípticos a obovais centrais, felpudos e pilosos, com pecíolo longo de até 30 cm de comprimento (LOHMANN; PIRANI, 1996; CARVALHO et al., 2000; CARVALHO, 2005).

As flores dessa espécie estão reunidas em uma inflorescência em tirso terminal, apresentam coloração variando de amarelada a creme e comprimento variando de 0,8 a 1,5 cm. O fruto apresenta formato de uma cápsula esférica achatada, lenhosa e deiscente com medidas variando de 13 a 20 cm de comprimento por 9 a 15 cm de largura. Apresenta uma cobertura densa de pelos pontiagudos, se assemelhando a uma bolsa de pastor (PICKEL, 1953). Cada fruto é composto por cerca de 100 sementes achatadas, com textura felpuda, aladas, com o núcleo cordiforme e diâmetro variando de 4 a 6,2 cm (CARVALHO, 2005).

De acordo com as regiões fitoecológicas de ocorrência natural, a *Z. tuberculosa* pode ser encontrada na Floresta Estacional Semidecidual, integrando as vegetações da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, no estado do Paraná e em vários estados do Sudeste e do Nordeste do Brasil (CARVALHO et al., 2000; SILVA; SOARES, 2002; CARVALHO, 2005). Em relação ao grupo ecológico ou sucessional, é considerada uma espécie pioneira a secundária inicial, apresentando capacidade de invadir pastagens e colonizar áreas degradadas e abandonadas (JESUS, 1997; SILVA; SOARES, 2002; CARVALHO, 2005).

Estudos mostram que o *Z. tuberculosa* ocorre naturalmente em variados tipos de solos, e seu desenvolvimento varia de acordo com as condições em que se encontra. Entretanto, esta espécie tem-se mostrado pouco exigente quanto à nutrição e à fertilidade do solo (JESUS; GARCIA, 1992; CARVALHO, 2005). O plantio é recomendado em sistemas agroflorestais para arborização de culturas ou em sistema silvipastoril, para arborização de pastagens (BAGGIO; CARPANEZZI, 1988; LOPES et al., 1996). Além disso, produz folhas de fácil decomposição, sendo indicada para utilização na recuperação de solos em áreas de reflorestamento para recuperação ambiental (BARROS; BRANDI, 1975; CARVALHO, 2005).

Pouco se sabe sobre a tolerância e a sobrevivência dessa espécie em substrato contaminado com rejeitos de mineração. Informações básicas sobre as respostas metabólicas de *Z. tuberculosa* às altas concentrações de ferro e manganês possibilita a obtenção de um diagnóstico sobre os efeitos da contaminação pelo rejeito na sobrevivência dessa planta e seu potencial uso como uma espécie recuperadora de áreas impactadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das mudas e condições de experimento

Os frutos de *Z. tuberculosa* foram coletados de matrizes nativas no município de Nepomuceno, no estado de Minas Gerais, situado a 843 metros de altitude (21°13'38.3"S 45°13'29.5"W), no dia 12 de agosto de 2020. Os frutos foram distribuídos em bandejas, e deixados para secar, à sombra. Posteriormente, foram expostos a pleno sol, por cerca de 2 dias, até sua abertura. A extração das sementes foi realizada manualmente e, as mesmas foram previamente semeadas em bandejas contendo areia lavada. Antes da semeadura, o envoltório celulósico fino da asa foi retirado. Após a germinação, as plântulas foram selecionadas de acordo com a uniformidade de tamanho, transplantadas em vasos com 5,5 litros de capacidade, contendo areia lavada e irrigada com solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), sendo essa, uma solução utilizada com sucesso nos cultivos em hidroponia com espécies arbóreas. O volume de solução nutritiva utilizado na irrigação dos vasos foi obtido através da diferença entre o peso do vaso completo com areia seca e areia encharcada. Foram colocados pratos em baixo dos vasos para impedir o vazamento de solução nutritiva após a irrigação. O volume de solução que ficou retida nos pratos após a primeira irrigação foi marcado (0,5 L) e todos os dias foram feitas reposições diretamente nos pratos até que a marca fosse atingida, promovendo a subirrigação das plantas.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. As plântulas passaram por um período de aclimatação de 21 dias, nos quais receberam concentrações crescentes da solução nutritiva completa (SNC), contendo todos os nutrientes. Vinte dias após a germinação das sementes, com o surgimento do par de folhas primárias, iniciou-se o processo de aclimatação das mudas à aplicação de solução nutritiva, que teve início com $\frac{1}{4}$ da força, durante sete dias, $\frac{1}{2}$ força por sete dias e força completa por sete dias. Posteriormente ao período de aclimatação, as mudas continuaram sendo irrigadas por solução nutritiva completa até a imposição dos tratamentos. Após 69 dias desde a semeadura, quando as plantas estavam com dois pares de folhas completamente expandidos, os tratamentos foram impostos, com duração de vinte dias até a coleta.

3.2 Preparo de solução nutritiva de cultivo

A solução nutritiva utilizada no experimento foi preparada segundo a recomendação de Bolle-Jones (1957). A quantidade de nutrientes recomendada em mmol L^{-1} para essa solução foi: N = 15 mM; P = 1 mM; K = 3 mM; Ca = 2 mM; Mg = 1,25 mM; S = 3,75 mM; B

= 0,06 mM; Cu = 0,009 mM; Cl = 0,03mM; Fe = 0,009 mM; Mn = 0,009 mM; Mo = 0,0003 mM e Zn = 0,009 mM. Seguindo esta recomendação, as soluções estoques foram individualmente preparadas, com a utilização de sais puros para análise (P.A.). Os sais foram pesados e dissolvidos com água destilada e o volume completado para 1 litro. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar e colocadas em local sem incidência direta de luz. Os sais utilizados no preparo das soluções e suas respectivas concentrações foram: KH_2PO_4 (1 M), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 M), NH_4NO_3 (2 M), K_2SO_4 (0,5 M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 M), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{EDTA}$ (9 mM), H_3BO_3 (64 mM), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (9 mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (9,20 mM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9,45 mM) e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (85% MoO_3) (0,30 mM). Os tratamentos que consistiram em superdosagem de ferro e manganês receberam uma quantidade mais elevada em mmol L^{-1} desses elementos (Fe = 0,009 + 0,151 mM e Mn = 0,009 + 0,318 mM).

3.3 Tratamentos

Com o objetivo de simular as condições dos solos que foram contaminados pelo rejeito oriundo do rompimento da Barragem de Fundão, as concentrações de Fe e Mn utilizadas nos tratamentos foram definidas com base nos resultados obtidos por Cruz et al., (2020) nas análises químicas do rejeito coletado em abril de 2017. O rejeito foi coletado em profundidade de 0-20 cm às margens do rio do Carmo, no município de Barra Longa (MG, Brasil). A quantificação das formas disponíveis de ferro e manganês no rejeito (extraídos com solução de DTPA-TEA a pH 7,3) foi realizada no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), sendo encontrados valores de 9 ppm de Fe (0,160 mM) e 18 ppm de manganês (0,327 mM), aproximadamente. O valor de pH adotado para este experimento foi pH = 6,5, baseado em teste de germinação prévio. Portanto, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos descritos na tabela abaixo:

Tabela 1 – Concentrações de ferro e manganês utilizadas nos tratamentos.

Tratamentos	Concentração Fe (mM)	Concentração de Mn (mM)
T1 – Controle	0,009	0,009
T2 – +Fe	0,160	0,009
T3 – +Mn	0,009	0,327
T4 – +Fe +Mn	0,160	0,327

Fonte: Do autor (2021).

O T1 consistiu no tratamento controle, com vasos preenchidos com areia, irrigados com SNC, sem excesso dos elementos ferro e manganês. Os tratamentos T2 e T3 consistiram em SNC com adição de concentrações elevadas de Fe (17,5 vezes maior que no tratamento controle) e Mn (35,5 vezes maior que no tratamento controle) respectivamente. No tratamento T4 houve superdosagem de Fe e Mn, simultaneamente (Tabela 1). Os tratamentos contaram com 6 repetições cada, sendo 4 plantas por repetição, divididas em 2 plantas destinadas para análises de matéria seca e 2 plantas destinadas para análises de matéria fresca.

As coletas foram realizadas 20 dias após a implementação dos tratamentos e todos os parâmetros avaliados nesse experimento foram realizados após este período. O pH das soluções preparadas para os tratamentos correspondentes foi ajustado com soluções de NaOH ou HCl 1 mol L⁻¹. A areia dos vasos foi lavada com água destilada e as soluções trocadas semanalmente, com o objetivo de manter a concentração dos sais minerais.

3.4 Avaliações de crescimento

As análises de crescimento foram realizadas no dia da coleta, vinte dias após a imposição dos tratamentos. Para isso, foram medidas a altura da parte aérea das plantas e comprimento das raízes, com o uso de régua graduada em centímetros (cm). Também foi medido o diâmetro do caule em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital. O número de folhas foi obtido através da contagem direta das folhas. A massa seca da parte aérea (caule e folhas) e das raízes foram obtidas através de balança de precisão, após secagem das amostras em estufa à 65°C com ventilação forçada até que o material atingisse peso constante. Medidas de alocação de biomassa foram mensuradas através da razão raiz/parte aérea. A mensuração de área foliar foi obtida diretamente por meio do programa Easy Leaf Area Free.

3.5 Avaliações de parâmetros fotossintéticos

Com o auxílio do equipamento portátil MultispeQ, conectado à plataforma PhotosynQ (KUHNGERT et al., 2016), foram obtidas a fluorescência inicial (F_0'), fluorescência máxima (F_m') e eficiência quântica do fotossistema II, dada pela razão F_v'/F_m' , sendo a fluorescência variável (F_v') obtida pela diferença entre F_0' e F_m' . Foram obtidas também a taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP Sintase (gH^+), taxa de transporte de elétrons (ETR) e o *quenching* não fotoquímico teórico (NPQt), com medições realizadas na presença de luz. As análises foram realizadas entre 8 e 10 horas da manhã, ao décimo sexto dia do mês de

dezembro de 2020, no segundo par de folhas completamente expandidas, antes da coleta no vigésimo dia de experimento. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) no interior da casa de vegetação obtida no dia das medições foi de 589 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor aproximadamente 70% menor que o lado externo.

3.6 Avaliações bioquímicas

As análises foram realizadas conforme protocolos de rotina do Laboratório de Bioquímica e Metabolismo de Plantas (LBMP) do setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. As repetições consistiram em um pool com as folhas ou raízes de todas as plantas da repetição contidas em cada vaso. As amostras de folhas e raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservação da matéria fresca (MF). Para as análises que utilizam matéria seca (MS), as amostras foram introduzidas em moinho do tipo Willey e armazenadas em tubos plásticos à temperatura ambiente.

3.6.1 Enzimas do sistema antioxidante

O extrato enzimático das enzimas do sistema antioxidante foi obtido após a maceração de 0,2 g de amostras de material fresco de folhas e raízes em nitrogênio líquido. Posteriormente foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 μL de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 μL de EDTA 10 mM, 75 μL de ácido ascórbico 200 mM, e 1035 μL de água. O extrato foi centrifugado à 13.000 g por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o período das análises. O sobrenadante coletado foi utilizado nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; NAKANO; ASADA, 1981; HAVIR; MCHALE, 1987).

3.6.1.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio de incubação composto por 100 μL de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, 40 μL de metionina 70 mM, 3 μL de EDTA 10 mM, 15 μL de NBT 1 mM, 2 μL de riboflavina 0,2 mM e 39 μL de água. Os tubos com o meio de reação e 2 μL de amostra receberam iluminação por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 15 W. O meio de reação sem amostras também foi submetido à iluminação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade da

SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.6.1.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada, segundo o método de Havir e McHale (1987), que consiste em utilizar uma alíquota de 5 μL do extrato enzimático adicionada a 180 μL do meio de incubação, contendo 90 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 76 μL de água e 9 μL de peróxido de hidrogênio 250 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância, com leitura em espectrofotômetro a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar para esta análise é 36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.6.1.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato, observada pela leitura espectrofotométrica a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Alíquotas do extrato enzimático foram previamente testadas e a escolhida (9 μL para raiz e 5 μL para folha) foi adicionada a 180 μL de tampão de incubação, composto por 90 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9 μL de ácido ascórbico 10 mM, 63 μL de água e 9 μL de peróxido de hidrogênio 4 mM (NAKANO; ASADA, 1981). Como a alíquota da folha foi reduzida, foi adicionado 4 μL de água para completar o volume final. O coeficiente de extinção molar para esta análise é 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.6.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O extrato utilizado para esta análise foi obtido através da maceração de 0,3 g de matéria fresca de folhas e raízes em nitrogênio líquido com polivinil polipirrolidona (PVPP), homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H_2O_2 foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo 45 μL do extrato quando foi analisado raiz ou 20 μL do extrato somado a 20 μL de água quando foi analisado folha, à 45 μL tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 e 90 μL de iodeto de potássio 1M (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000). A quantificação foi realizada, com base na curva padrão de peróxido de hidrogênio, com concentrações conhecidas.

3.6.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Para isso, 0,3 gramas de folhas e 0,3 gramas de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos. Alíquotas (125 μ L) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação, contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com o malondialdeído (MDA), que é um produto secundário do processo de peroxidação. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Esta análise também foi realizada em amostras de raiz, entretanto, foram encontrados valores negativos na leitura, impossibilitando a realização dos cálculos.

3.6.4 Extração e quantificação de carboidratos, aminoácidos e proteínas totais

A extração de carboidratos foi obtida a partir da massa seca de folhas completamente expandidas e raízes pela homogeneização de 0,2 g de massa seca em 10 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40 °C. Posteriormente, a solução homogeneizada foi centrifugada à 5.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante coletado. O pellet foi reservado para posterior quantificação do amido. Para a quantificação de açúcares solúveis totais (AST), foi utilizado o método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954), no qual a quantificação foi baseada em uma curva padrão, cujo padrão utilizado foi a glicose 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em volumes crescentes. Foram adicionados 2 mL do reagente antrona, tanto à curva quanto às alíquotas das amostras e o volume foi ajustado com água destilada para 3 mL. A solução foi preparada a partir de 40 mg de antrona, 1 mL de água e 20 mL de ácido sulfúrico (P.A.). Os tubos foram agitados e levados ao banho-maria à 100°C por 3 minutos. Posteriormente foram resfriados no gelo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm.

A quantificação dos açúcares redutores (AR) também foi baseada em uma curva padrão, segundo o protocolo descrito por Miller (1959), pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). O padrão utilizado foi glicose (10 mM) em volumes crescentes. Foram adicionados 0,5 mL do reagente DNS tanto à curva quanto às alíquotas das amostras e

o volume foi ajustado para 1,25 mL com água destilada. Para o preparo do reagente DNS, foram adicionados 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N a 2,5 g de DNS e aproximadamente 125 mL de água destilada que foram agitados até a total dissolução da solução. Posteriormente, foram adicionados 75g do sal de Rochelle e o volume da solução foi ajustado para 250 mL com água destilada. Os tubos foram agitados e em seguida levados ao banho-maria à 100 °C durante 5 minutos. Em seguida foram esfriados a temperatura ambiente e o volume foi ajustado para 5 mL com água destilada. A leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro. A diferença entre AST e AR foi utilizada para a mensuração da quantidade de sacarose.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o protocolo de Bradford (1976). Para a obtenção da curva, o padrão utilizado foi o BSA (Soro Albumina Bovina) (2,5 mg mL⁻¹), em volumes crescentes. Para isso, 100 gramas do reagente Comassie Blue G-250 foi dissolvido em 50 mL de etanol 95%. Em seguida, foram adicionados 100 mL de H₃PO₄ 85% e o volume foi ajustado para 1 litro com água destilada. A solução foi deixada em “overnight” com agitação constante e posteriormente filtrada. Foi adicionado 294 µL da solução de Comassie tanto à curva quanto às alíquotas das amostras e o volume foi ajustado com água destilada para 300 µL. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 595 nm.

A quantificação de aminoácidos foi realizada pelo método da ninhidrina, proposto por Yemm e Cocking (1955). Para isso, foram preparados previamente os reagentes: Tampão citrato de sódio 0,2M, pH = 5,0 (A), ninhidrina 5% em metil celosolve (Etileno glicol monometil éter) (B), KCN 2% em metil celosolve (2 mL de KCN 0,01M em 100 mL de metilcelosolve) (C), etanol 60% (v/v) e glicina (0,1µmol mL⁻¹), que foi a molécula utilizada na curva-padrão em volumes crescentes. Após a mistura dos reagentes, os tubos foram agitados e levados ao banho-maria à 100°C por 20 minutos. Posteriormente, o volume foi ajustado para 4 mL com etanol 60% e agitado novamente. Após o resfriamento a leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro.

3.6.5 Extração e quantificação de amido

Após o processo de homogeneização e centrifugação dos tecidos vegetais já descritos para a quantificação de carboidratos, aminoácidos e proteínas totais no tópico anterior (tópico 3.6.4), o pellet que sobrou foi ressuscitado com 4 mL do tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8. Foi adicionado 1 mL da solução da enzima amiloglicosidase (1 mg da enzima em 1 mL de tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8) por amostra. Posteriormente foi incubada em banho-maria a 40 °C por 2 horas e centrifugada à 5.000 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado, armazenado em tubos devidamente identificados à -20 °C. O amido foi quantificado pelo método da Antrona descrito por Yemm e Willis (1954).

3.6.6 Quantificação de nitrogênio

Os teores de N total foram determinados pelo método de Kjeldahl. Para realizar a digestão foi pesado 0,1 g de amostras secas e moídas de folhas e raízes, em tubos de vidro e adicionado a mistura digestora. O primeiro processo consistiu em adicionar a mistura digestora a cada amostra contendo 1,5 g de K₂SO₄, 0,3 g de CuSO₄ e 3 mL de H₂SO₄, sendo este último acrescentado cuidadosamente após os outros reagentes. Os tubos foram levados para o bloco digestor e submetidos à temperatura de 350 °C, partindo-se da temperatura ambiente e aumentando-se 50 °C a cada 30 minutos. A digestão ocorreu e foi caracterizada pela obtenção de um líquido incolor ou levemente esverdeado. Depois de esfriada, foi adicionado 30 mL de água destilada agitando até completa dissolução. Posteriormente, 1 frasco de Erlenmeyer de 100 mL foi preparado para cada amostra, adicionando-se 10 mL da solução ácido bórico indicador. Primeiro, para cada 10 mL de água destilada dissolveu-se 0,015 g de verde de bromocresol e 0,006 g de vermelho de metila. Em seguida, para cada 49,5 mL de água destilada, foi adicionado 1 g de H₃BO₃ e 0,5 mL da solução previamente preparada. Os frascos foram acoplados, um de cada vez ao destilador de Kjeldahl, e o processo de destilação ocorreu pela elevação da temperatura ao máximo até iniciar a ebulição e adicionando-se lentamente 10 mL de NaOH 13N a cada destilação. O processo foi finalizado quando o volume do destilado alcançou 75 mL. A titulação foi feita com HCl 0,07143N até mudança de cor (coloração verde para rosa). O volume de ácido gasto para mudança de coloração foi convertido em porcentagem de N na amostra (FEEMA, 1983), através da fórmula:

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times M \times f \times 0,014 \times 100}{P}$$

Sendo:

V = Volume de ácido gasto na titulação

M = molaridade do HCl

f = Fator de correção do HCl

P = Massa da amostra em gramas

Com a porcentagem de nitrogênio total, foi possível obter a quantidade de nitrogênio em gramas por parte da planta analisada. Para tanto, foi realizada uma regra de três simples em que para encontrar a quantidade absoluta de nitrogênio nas folhas e nas raízes, multiplicou-se a porcentagem de nitrogênio pelo peso seco das folhas e raízes respectivamente, e, esse valor foi dividido por 100.

3.6.7 Enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio

As atividades da redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH) foram avaliadas, *in vitro*. Foram maceradas 1,25 g de matéria fresca de folhas e raízes em nitrogênio líquido com adição de 10% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). O macerado foi adicionado a 5 mL da solução de extração constituída por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, contendo: 9,3 mg de EDTA, 1,5 mg de DTT e 0,8 mg de PMSF para a obtenção do extrato enzimático. Em seguida o meio de extração foi levado à centrifuga programada para 16000 g durante 20 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado em tubo Falcon de 15 mL e armazenado a -20 °C.

A atividade da RN foi realizada de acordo com o protocolo RN proposto por Berges e Harrison (1995). O meio de reação da enzima foi preparado em triplicata, no qual 14 µL da amostra foi pipetada em microplaca, seguido por 154 µL da solução de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 com 0,1818 mg de KNO₃. Depois o meio foi mantido em incubação no banho maria a 30°C por 3 minutos. Após o banho maria, foi pipetado 12 µL de β-NADH 3mM. Em seguida a leitura da placa foi realizada a 340 nm, de 1 em 1 min, durante 10 min, tendo sido observado o decaimento pela oxidação do NADH. O coeficiente de extinção molar para essa análise é 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da GS foi avaliada como proposto por Ratajczak, Ratajczak e Mazurowa (1981). O ensaio da GS foi realizado tomando-se uma alíquota de 75 µL do extrato bruto, ao qual foram adicionados 175 µL de um meio reacional contendo 50 µL de tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; 25 µL de mercaptoetanol 0,1 M; 12,5 µL de MgSO₄.7H₂O 0,4 M; 37,5 µL de NH₂OHCl 0,1 M; 25 µL de glutamato monossódico, 0,5 M e 25 µL de ATP 0,1 M. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 250 µL de uma solução composta de FeCl₃ 1,2 M, HCl 1,7 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,7 mM. Em seguida, houve centrifugação a 16.000 g a 4 °C por 5 minutos e o quelato Fe-L-glutamylhidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm. Para determinação dos teores foi realizada uma curva padrão cujo padrão utilizado foi o gama-glutamyl-hidroxamato na concentração de 20 µmol mL⁻¹.

A atividade da GOGAT foi determinada a partir da adição do meio de reação contendo 132 μL de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, 12 μL de 2-oxoglutarato 135 mM e 12 μL de L-glutamina 135 mM a uma alíquota de 14 μL do extrato. A mistura foi incubada a 35 °C por 5 minutos e após a retirada das amostras do banho maria, foi adicionado 10 μL de β -NADH 3,6 mM. Em seguida a leitura da placa foi realizada a 340 nm, de 1 em 1 min, durante 10 min, tendo sido observado o decaimento pela oxidação do NADH. O coeficiente de extinção molar é 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (PIMENTA et. al., 1989 com modificações).

A atividade da GDH foi determinada pela adição de 96 μL de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8, 20 μL de 2-oxoglutarato 90 mM, 20 μL de CaCl_2 36 mM e 20 μL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 900 mM a uma alíquota de 14 μL do extrato enzimático. A mistura foi incubada a 30 °C por 3 minutos e após a retirada das amostras do banho maria, foi adicionado 10 μL de β -NADH 3,6 mM. Em seguida a leitura da placa foi realizada a 340 nm, de 1 em 1 min, durante 10 min, tendo sido observado o decaimento pela oxidação do NADH. O coeficiente de extinção molar é 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (GROAT; VANCE, 1981).

3.6.8 Quantificação de ferro e manganês

A quantificação de ferro e manganês foi realizada em amostras compostas por um compilado de folhas e raízes, com o objetivo de representar a planta inteira. Inicialmente, as plantas foram lavadas em água corrente e com água deionizada, para que houvesse remoção dos sedimentos associados aos órgãos vegetais. As plantas utilizadas na quantificação de manganês tiveram as raízes lavadas em solução extratora composta por HCl (0,1%) e as plantas utilizadas na quantificação de ferro foram deixadas de molho por duas horas em solução ditionito-citratobicarbonato (DCB), seguindo o método de Taylor e Crowder (1983), composta por citrato de sódio (0,03 M), bicarbonato de sódio (0,125 M) e 1 grama de ditionito de sódio a cada 50 mL de solução utilizada na lavagem, e, por fim, foram enxaguadas 3 vezes com água deionizada. Esse procedimento de lavagem de raízes foi realizado com o objetivo de remover vestígios de ferro e manganês que pudessem estar associados à superfície das raízes formando placas.

Em seguida, as plantas foram colocadas na estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, até atingirem peso constante. Após o processo de secagem, amostras de folhas e raízes foram trituradas, pesadas e mescladas. Posteriormente, as amostras foram inseridas em sacos plásticos, devidamente identificados e enviados para análise e quantificação no laboratório do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Para determinação dos teores de ferro e manganês, primeiro foi feita uma digestão Nítricoperclórica (SARRUGE; HAAG,

1974) e posteriormente os minerais foram quantificados utilizando espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP- OES; Perkin Elmer Modelo Optima 8300 DV).

3.6.9 Determinação dos teores de Clorofilas e Carotenoides

Para a determinação das concentrações de carotenoides e clorofilas “a” e “b”, foram macerados 0,1 g de tecido foliar fresco do primeiro par de folhas completamente expandido transferidos para um tubo Falcon contendo 10 mL de acetona 80%. Os tubos foram armazenados na geladeira, protegidos do escuro com papel alumínio, por 7 dias. O volume final foi completado para 10 mL, e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 440 nm para carotenoides e a 645 e 663 nm, para os teores de clorofilas, segundo a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001).

3.7 Análise estatística

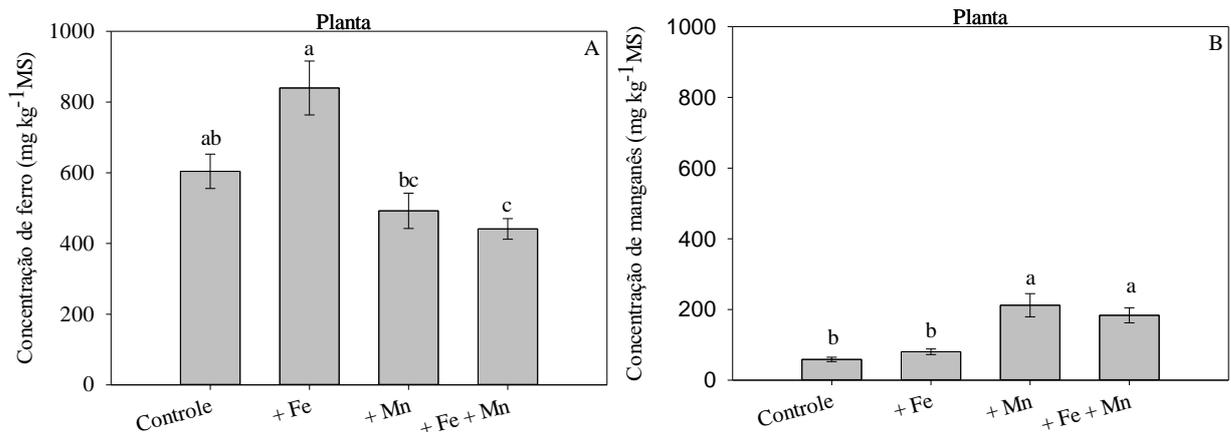
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), composto por 4 tratamentos e 6 repetições. Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P \geq 0,05$) e homogeneidade das variâncias Bartlett ($P > 0,05$). Dados considerados dentro da normalidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos (teste F, $P < 0,05$) e ao teste de Tukey a 5% de significância no software R®, utilizando a plataforma RStudio com os pacotes ‘ExpDes.pt’ (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2020) e ‘fpp’ (HYNDMAN, 2013). Os dados de variáveis que não seguiram distribuição normal, sofreram transformações de Box-cox para que se adequassem a normalidade e, novamente, foram submetidos a ANOVA e teste de medias (Tukey, $P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração de ferro e manganês

A quantificação dos micronutrientes ferro e manganês em plantas de *Z. tuberculosa* mostraram que as maiores concentrações de Fe ocorreram em plantas submetidas ao T2 (FIGURA 1A), com uma média de 839,9 mg Kg⁻¹ por planta. As maiores concentrações de manganês ocorreram no T3, com uma média de 212,2 mg L⁻¹ por planta (FIGURA 1B), seguido pelo T4, no qual houve excesso simultâneo de manganês e ferro, com uma média de 183,7 mg Kg⁻¹ por planta. A concentração de ferro encontrada nas plantas foi 12 vezes maior que a concentração encontrada de manganês.

Figura 1 – Concentração de ferro (A) e manganês (B) em plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Como foi relatado em estudos anteriores, os elementos ferro e manganês são antagonísticos, pois há inibição competitiva entre eles, uma vez que, ambos são cátions bivalentes, que competem pelos mesmos sítios ativos nos transportadores dentro das plantas (ECKHARDT; MARQUES; BUCKHOUT, 2001; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2004; ZAITSEV; DUBROVINA; SHAINUROV, 2020). A relação antagonística entre esses elementos ficou evidente com a diferença entre a concentração de Fe em T2 e T4, quando houve uma redução significativa de Fe na presença de Mn (FIGURA 1A).

Quando analisamos a absorção de Mn, podemos observar que não houve redução significativa na absorção desse metal no T4 quando comparado com ao T3 onde havia excesso apenas de manganês. Esse resultado sugere que em T4, a concentração de Fe pode não ter sido suficiente para que esse elemento se sobressaísse na competição com Mn, mantendo a absorção de Mn elevada (ZAITSEV; DUBROVINA; SHAINUROV, 2020). O Fe adicional também não reduziu o acúmulo de Mn, em estudo realizado por Rossini-Oliva, Abreu e Leidi (2021) em espécies de *Erica andevalensis*, cultivadas em solução hidropônica sob crescentes concentrações de manganês.

O nível crítico da concentração de ferro e manganês que pode causar toxicidade às plantas depende da espécie, da idade e estado nutricional das mesmas. Há uma grande variação na literatura em relação aos valores de concentrações de ferro no tecido vegetal que podem ser considerados tóxicos, variando de 300 a 2000 mg kg⁻¹ MS (BECKER; ASCH, 2005). Dobermann e Fairhurst (2000) observaram sintomas visíveis de toxicidade causada por ferro e, conseqüentemente a redução do crescimento em arroz e gramíneas anuais, onde foram encontradas concentração entre 300 e 500 mg kg⁻¹ MS de Fe nas folhas. Em relação ao manganês, estudos mostraram que quando suas concentrações nos tecidos das plantas passam dos 150 mg kg⁻¹ MS, esse metal pode causar toxicidade (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991; MILLALEO et al., 2010), mas isso varia consideravelmente a cada espécie (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2003).

4.2 Crescimento das plantas

Não houve diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos nos seguintes parâmetros de crescimento da parte aérea avaliados: altura, diâmetro de caule, número de folhas e área foliar (TABELA 2). Entretanto, em relação ao comprimento das raízes, no tratamento com excesso de ferro (T2) foram observadas as menores médias de comprimento (7,1 cm), seguido pelo T3, composto pelo excesso de manganês (8,9 cm). Mas no T4, onde foram aplicadas altas concentrações simultâneas de ferro e manganês, foi observado um aumento de 19,87% no tamanho das raízes em comparação com o controle (TABELA 2 e FIGURA 2). Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a massa seca das folhas e raízes (TABELA 2).

Tabela 2 – Altura, comprimento de raiz (CR), diâmetro do caule (DC), número de folhas, área foliar, massa seca de folhas (MS folha), massa seca de raízes (MS raízes) e alocação de biomassa (RPA: razão raiz/parte aérea) em plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).

	Tratamentos			
	Controle	+ Fe	+ Mn	+ Fe + Mn
Altura (cm)	5,2 ± 0,23 a	5,4 ± 0,08 a	4,9 ± 0,15 a	5,0 ± 0,07 a
CR (cm)	10,2 ± 0,88 ab	7,1 ± 0,73 c	8,9 ± 0,67 bc	12,2 ± 0,48 a
DC (mm)	2,9 ± 0,12 a	2,8 ± 0,07 a	2,6 ± 0,14 a	2,6 ± 0,17 a
Nº de folhas	5,6 ± 0,08 a	5,2 ± 0,29 a	5,4 ± 0,20 a	5,2 ± 0,26 a
Área Foliar (cm²)	71,5 ± 5,25 a	63,7 ± 6,12 a	70,3 ± 5,39 a	65,5 ± 4,24 a
MS Folha (g)	0,5 ± 0,03 a	0,4 ± 0,04 a	0,5 ± 0,03 a	0,5 ± 0,04 a
MS Raiz (g)	0,1 ± 0,01 a	0,1 ± 0,01 a	0,1 ± 0,01 a	0,1 ± 0,01 a
Razão RPA	0,2 ± 0,01 a	0,2 ± 0,02 a	0,2 ± 0,01 a	0,2 ± 0,02 a

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Por *Zeyheria tuberculosa* se tratar de uma espécie arbórea, com crescimento lento, os tratamentos podem não ter sido suficientes para observar diferenças significativas em relação aos parâmetros de crescimento referentes à altura das plantas, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, massa seca de folhas, massa seca de raízes e alocação de biomassa (razão raiz/parte aérea). Porém, foi observada uma redução no comprimento das raízes sob excesso de ferro. Onyango et al. (2019) também verificaram que houve redução no comprimento de raízes das quatro variedades de arroz estudadas e concluíram que esse efeito negativo foi causado pela toxidez causada pelo ferro adicionado aos tratamentos. O ferro quando presente em altas concentrações, provoca o desbalanceamento redox das células, originando uma série de sintomas típicos de toxidez, dentre eles, a redução no crescimento de raízes, que ademais podem apresentar textura áspera e mudança de coloração (GENON et al., 1994; HELL; STEPHAN, 2003; DE OLIVEIRA JUCOSKI et al., 2013).

O excesso de manganês no T3 também provocou redução no comprimento das raízes em comparação ao controle, mas com médias de crescimento maiores do que no T2, com excesso de ferro. A oxidação do manganês no apoplasto foi apontada como principal reação que causa toxidez e limita o crescimento das plantas cultivadas sob excesso de manganês (HORST, 1988). Contudo, no T4, quando houve a aplicação em excesso de ferro e manganês

conjuntamente, foi observado um valor médio do comprimento de raiz significativamente maior do que em todos os outros tratamentos (12,2 cm). Esse resultado, pode induzir que a inibição competitiva entre Fe e Mn possa ter causado uma anulação do efeito tóxico, no crescimento radicular (TABELA 2 e FIGURA 2).

Figura 2 – Disposição dos vasos utilizados no cultivo de plantas de *Z. tuberculosa* submetidas aos tratamentos (A e B). Plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., utilizadas na medição de comprimento de raiz e altura de parte aérea – T1 (Controle), T2 (+Fe), T3 (+Mn) e T4 (+Fe + Mn) no dia da coleta (C).

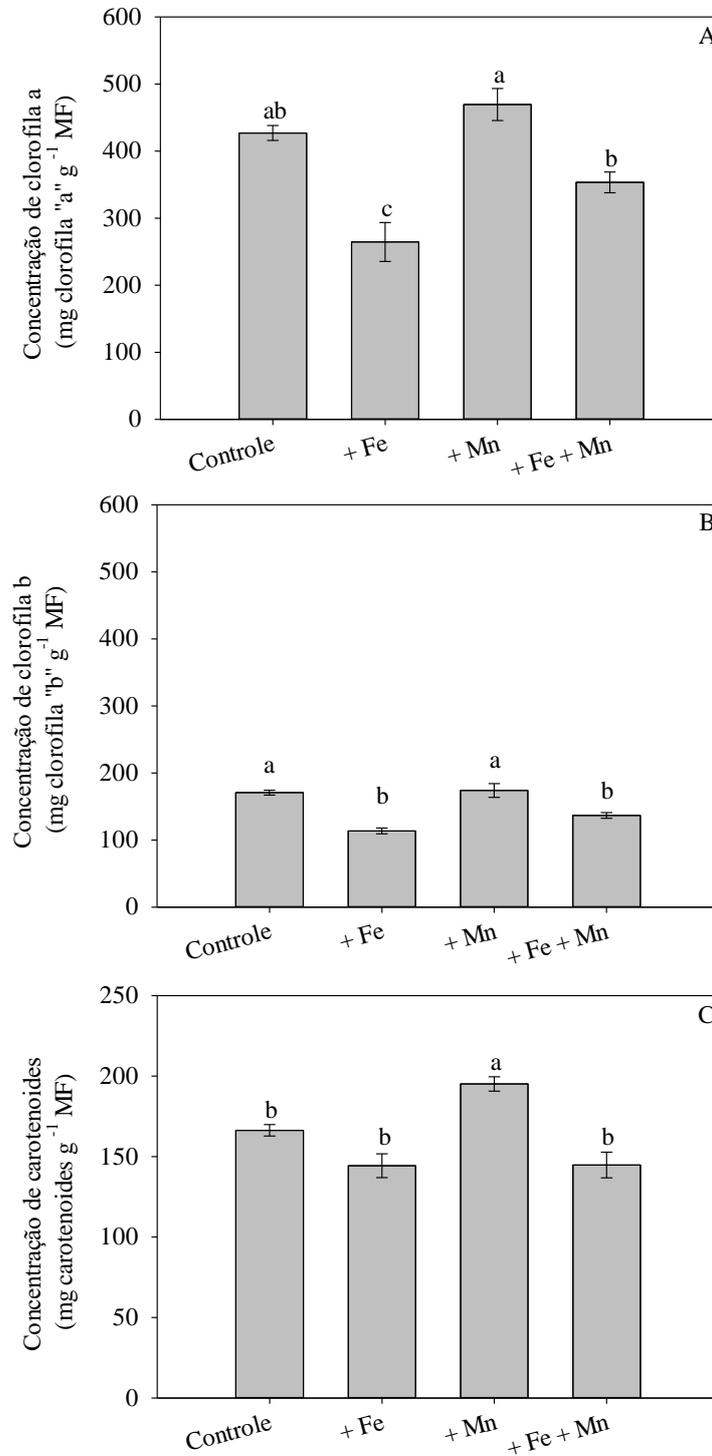


Fonte: Do autor (2021).

4.2 Clorofilas e Carotenoides

No tratamento com excesso de manganês (T3), as concentrações de clorofila *a* (FIGURA 3A) foram estatisticamente iguais ao controle. Contudo, sob excesso de ferro houve uma diminuição significativa desses valores, correspondendo a uma queda de 38% no T2 em relação ao controle. Nas análises de clorofila *b* (FIGURA 3B) o tratamento com excesso de manganês também não diferiu estatisticamente do controle, mas houve um decréscimo desse pigmento no T2 (33,46%) e T4 (19,86%). Houve um aumento significativo nos teores de carotenoides no T3 (17,32%), porém, com a aplicação de Fe e Mn concomitantemente no T4, esse aumento foi anulado, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao controle (FIGURA 3C), assim como no T2.

Figura 3 – Concentrações de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C) em folhas de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Alguns trabalhos realizados anteriormente apresentaram resultados semelhantes, com a redução nos teores de clorofilas e carotenoides a medida em que aumentava a concentração de ferro nos tratamentos (MEHRABAN et al., 2008; VERMA; PANDEY, 2015). O manganês tem influência no aumento do teor de clorofilas das plantas, pois também atua na síntese das mesmas (SCHMIDT; JENSEN; HUSTED, 2016).

Nesse trabalho, os resultados mostraram que o excesso de manganês estimulou o aumento de clorofila *a* e *b* e, também dos carotenoides. Porém, em estudo desenvolvido por Rossini-Oliva, Abreu e Leidi (2021), foi observado a diminuição de clorofilas e carotenoides com o aumento das concentrações de Mn em plantas de *Erica andevalensis*, o que mostra que diferentes espécies apresentam respostas distintas quando submetidas à altas concentrações de manganês. No T4, o efeito da alta concentração de manganês no aumento dos teores dos pigmentos nas folhas foi inibido na presença de ferro.

O excesso de Fe provocou a degradação dos pigmentos das plantas expostas ao T2. Além da diminuição da concentração de clorofilas e carotenoides nas folhas, o excesso de ferro pode ter comprometido também parâmetros do sistema fotossintético das plantas de *Z. tuberculosa*, verificado pela redução da eficiência quântica potencial do PS II e redução das taxas de transporte de elétrons e fluxo de prótons que passam através da ATP Sintase. A mesma função redox do ferro que é essencial na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese e na síntese de pigmentos, quando esse elemento está presente em excesso no meio de cultivo, pode ser responsável por efeitos tóxicos e redução da eficiência fotossintética e degradação de clorofilas e carotenoides, principalmente devido a superprodução de espécies reativas de oxigênio (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012).

4.3 Parâmetros fotossintéticos

Em relação aos parâmetros fotossintéticos avaliados (TABELA 3), foi observado que no T2, foram obtidos os menores valores médios para fluorescência máxima na luz (F_m'), eficiência quântica potencial do fotossistema II (F_v'/F_m'), taxa de transporte de elétrons (ETR) e a taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP Sintase (gH^+). Contudo, nesse mesmo tratamento, a estimativa do *quenching* não fotoquímico (NPQt) foi aproximadamente duas vezes maior que o controle. A fluorescência mínima na luz (F_0') da clorofila *a*, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Também não houve diferença significativa em relação aos tratamentos com excesso de Mn quando comparado ao tratamento controle nos parâmetros avaliados, exceto em relação à taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP Sintase, que diminuiu no T4, quando o Fe foi adicionado

simultaneamente ao Mn e também em relação à estimativa do *quenching* não fotoquímico que aumentou no T4.

Tabela 3 – Parâmetros fotossintéticos de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).

	Tratamentos			
	Controle	+ Fe	+ Mn	+ Fe + Mn
Fm'	415,4 ± 31,98 a	264,9 ± 22,95 b	356,7 ± 40,06 ab	298,8 ± 26,30 ab
F0'	149,6 ± 11,51 a	131,3 ± 5,25 a	140,3 ± 10,04 a	133,6 ± 7,12 a
Fv'/Fm'	0,6 ± 0,01 a	0,5 ± 0,04 b	0,6 ± 0,02 a	0,5 ± 0,02 ab
NPQt	1,8 ± 0,12 c	4,9 ± 1,27 a	2,5 ± 0,36 bc	3,2 ± 0,35 ab
ETR	145,9 ± 8,25 a	103,9 ± 8,29 b	146,7 ± 7,62 a	119,6 ± 8,83 ab
gH+	200,9 ± 4,70 a	128,2 ± 8,89 b	167,4 ± 14,19 ab	151,8 ± 12,46 b

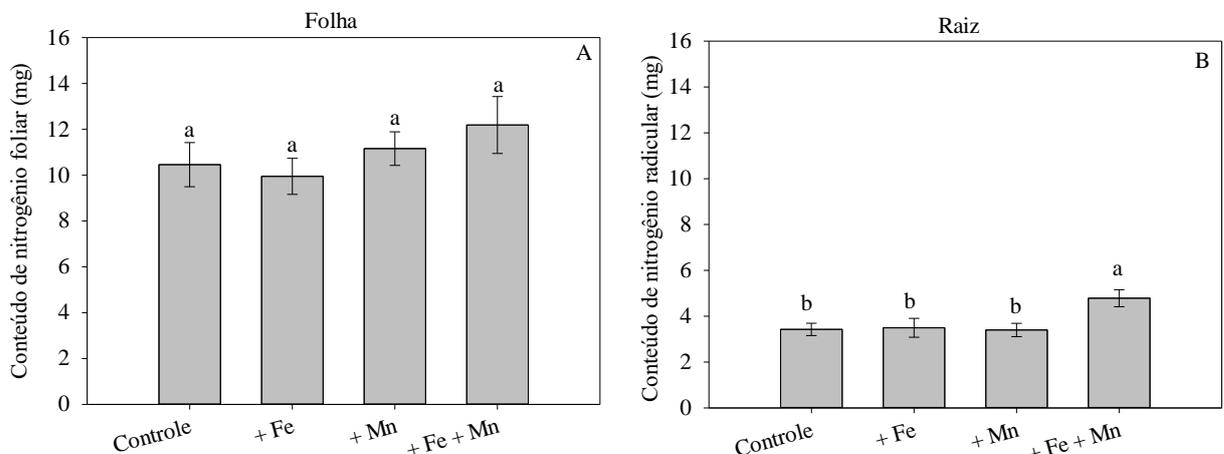
Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Abreviaturas: Fm' = Fluorescência máxima na luz; F0' = Fluorescência mínima na luz; Fv'/Fm' = eficiência quântica potencial do PS II; NPQt = estimativa do *quenching* não fotoquímico; ETR = taxa de transporte de elétrons; gH+ = taxa de fluxo de prótons que passam através da ATP Sintase. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

No tratamento com excesso de Fe houve aumento do *quenching* não fotoquímico (NPQt) nas folhas. O NPQt é um parâmetro que estima a taxa constante de perda de energia na forma de calor pelo PSII, mas também está ligado a fotoproteção do sistema fotossintético. (MURCHIE; RUBAN, 2020). O aumento desse parâmetro em T2, mostra que houve uma maior perda de energia absorvida que não foi aproveitada em eventos fotoquímicos por essas plantas em comparação com as que foram cultivadas no tratamento controle e no tratamento sob excesso de manganês. A adição de Mn não estimulou o aumento significativo do NPQt em T3, e, além disso acabou amenizando a perda de energia provocada pelo excesso de ferro no T4. Esses resultados sugerem que a concentração de manganês presente nos tratamentos pode não ter sido suficiente para causar danos às reações fotoquímicas, ao contrário do que foi observado por Li et al. (2010).

4.4 Conteúdo de nitrogênio Total

O conteúdo de nitrogênio total aumentou cerca de 40% nas raízes (FIGURA 4B) no T4 quando as plantas foram expostas ao excesso de Fe e Mn simultaneamente, enquanto em folhas (FIGURA 4A) não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 4 – Conteúdo de nitrogênio total em folhas (A) e raízes (B) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



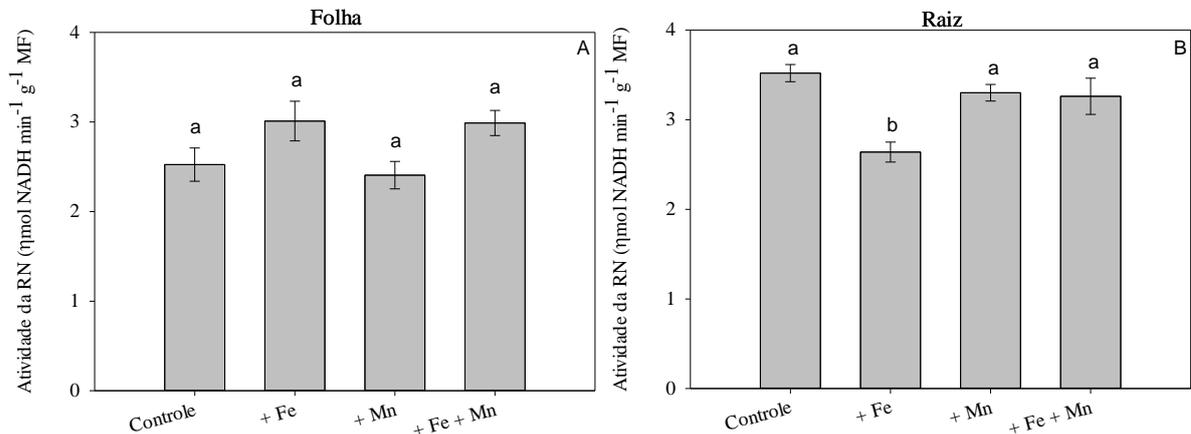
Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Tanto em folhas, quanto em raízes, a adição de Fe e Mn isoladamente nos tratamentos T2 e T3, não causaram diferenças no conteúdo de nitrogênio quando comparadas ao controle (FIGURAS 3A e 3B), não corroborando com os resultados encontrados por outros autores, que observaram a redução de N causada pelo excesso de Fe (LUO et al., 1997; FAGERIA, 2001; ZAHRA et al., 2021) e também pelo excesso de Mn (LAVRES JUNIOR et al., 2010; SANTOS et al., 2017). Entretanto, no T4, a aplicação simultânea de Fe e Mn induziu aumento significativo no conteúdo de nitrogênio em raízes (4,8 mg planta⁻¹). Concentrações excessivas de Fe e Mn nos tecidos vegetais podem alterar diversos processos, desde atividades enzimáticas até absorção e alocação de outros nutrientes, como o nitrogênio (LAVRES JUNIOR et al., 2010; ZAHRA et al., 2021). Esses resultados sugerem que, possivelmente houve uma inibição competitiva entre os metais Fe e Mn (MALAVOLTA et al., 1997; ZAITSEV; DUBROVINA; SHAINUROV, 2020), o que acabou impedindo os possíveis danos causados pelas altas concentrações de ambos.

4.5 Atividade das enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio (GS, GDH, GOGAT e RN)

Não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos nas análises realizadas em folhas de *Z. tuberculosa* em relação a atividade da redutase do nitrato (RN) (FIGURA 5A). Entretanto, em raízes (FIGURA 5B) foi possível observar que o excesso de ferro no T2 reduziu a atividade de RN em aproximadamente 21,45%, diferenciando estatisticamente das médias dos demais tratamentos.

Figura 5 – Atividade da enzima redutase do nitrato (RN) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).

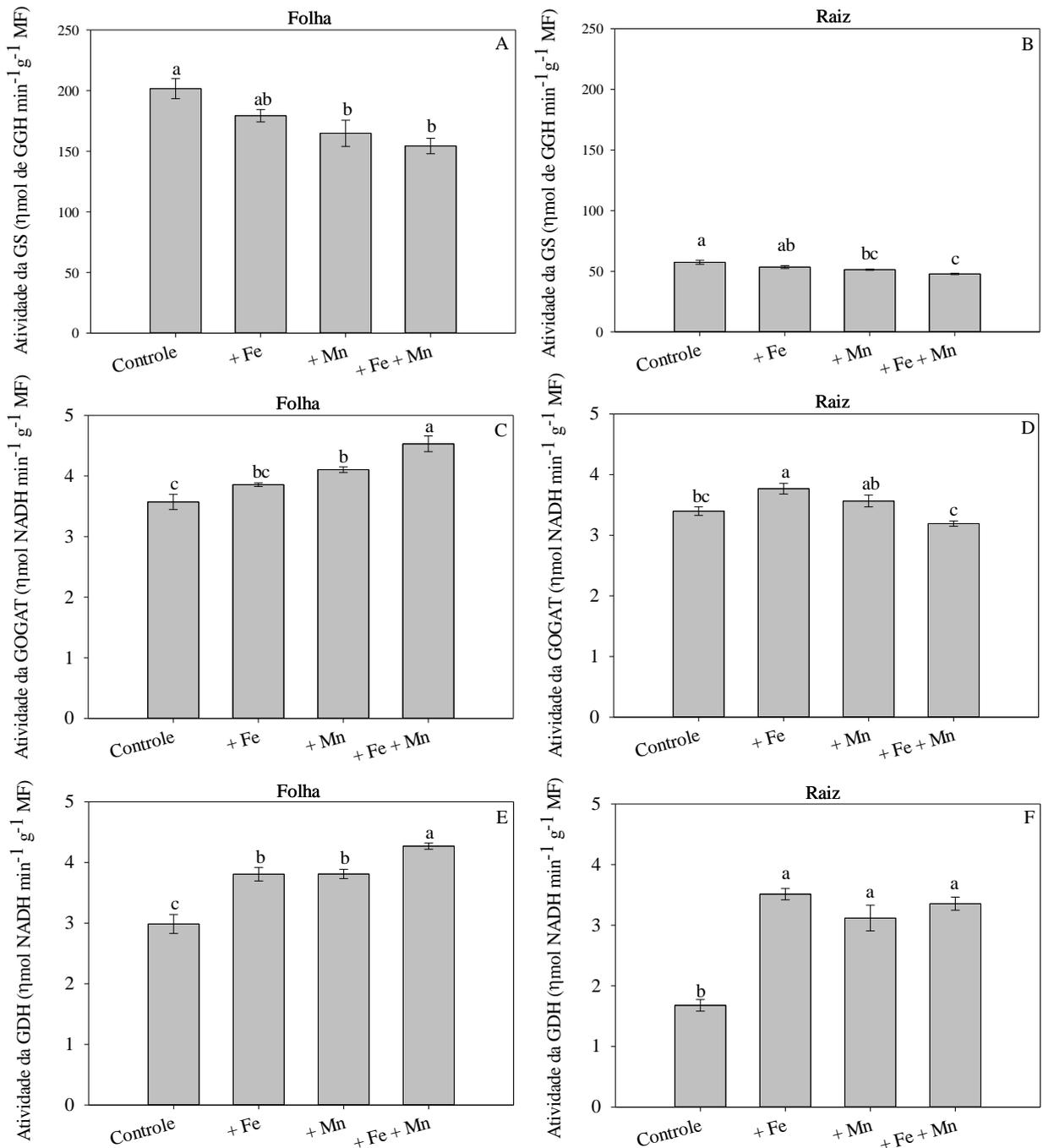


Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

A atividade da GS, tanto em folhas (FIGURA 6A), quanto em raízes (FIGURA 6B), foi reduzida sob altas concentrações de Fe e Mn. Porém, a atividade da GS no tratamento controle foi quase 4 vezes maior nas folhas ($200 \mu\text{mol de GGH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) que nas raízes ($55 \mu\text{mol de GGH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$). A atividade da GOGAT nas folhas (FIGURA 6C), aumentou com a imposição dos tratamentos quando comparada ao controle, apresentando um aumento de 28,81% no T4. Já em raízes de *Z. tuberculosa* (FIGURA 6D) o aumento da atividade da GOGAT foi no T2, quando submetida a superdosagem de ferro. A atividade da GOGAT em folhas e raízes no tratamento controle foram semelhantes (cerca de $3,5 \mu\text{mol de NADH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$). Ao contrário do que foi observado nas análises de atividade da enzima GS, a atividade da enzima GDH aumentou significativamente com a imposição dos tratamentos, em comparação com o controle, nas folhas (FIGURA 6E) e raízes (FIGURA 6F).

Contudo, a atividade de GDH observada nas folhas ($3,0 \mu\text{mol de NADH min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) foi quase o dobro do que observado em raízes (aproximadamente $1,5 \mu\text{mol de NADH min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

Figura 6 – Atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) em folhas (A) e raízes (B), glutamato sintase (GOGAT) em folhas (C) e raízes (D) e glutamato desidrogenase (GDH) em folhas (E) e raízes (F) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

O conteúdo de nitrogênio assimilado pelas plantas depende diretamente da disponibilidade de energia necessária para tais processos e da atividade das enzimas envolvidas em seu metabolismo (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). A atividade da RN foi significativamente menor no T2 ($P < 0,05$), nas análises realizadas em raízes. O excesso de Fe afetou a ação da RN, assim como afetou negativamente comprimento das raízes e os parâmetros fotossintéticos, sugerindo que a concentração utilizada no T2 foi tóxica para as plantas de *Z. tuberculosa*. Esses sintomas de toxidez causados por ferro não foram observados no T4, com adição de ferro e manganês simultaneamente. As atividades da RN observada no tratamento controle em folhas ($2,5 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) e raízes ($3,5 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) sugere que essa espécie tem capacidade muito semelhante de assimilação de NO_3 nesses órgãos.

Enquanto a atividade da GS diminuiu em folhas e raízes de *Z. tuberculosa* com a imposição dos tratamentos compostos por altas concentrações de Fe e Mn, a atividade da GDH aumentou sob as mesmas condições. Uma vez que, a via principal de assimilação de amônio em plantas superiores acontece através do ciclo GS/GOGAT (MIFLIN; HABASH, 2002) e essa via não pode ser substituída pela rota alternativa da GDH, os resultados sugerem que o aumento da atividade de GDH possa ter ocorrido devido à necessidade da planta em promover a desaminação do glutamato para obtenção de α -cetoglutarato, por meio da reação reversa dessa enzima. Quando a planta está sob limitação de carbono provocado por algum tipo de estresse, a atividade catabólica da GDH ajuda a reabastecer o ciclo de Krebs com o fornecimento de 2-oxoglutarato, promovendo, portanto, a ligação entre metabolismo do carbono e do nitrogênio (MELO-OLIVEIRA et al., 1996). Shan et al. (2012) em estudos com seringueira, observaram valores para atividade da GDH quatro vezes maiores que da enzima GS sob condições de estresse causado pela limitação de nitrogênio. A redução da atividade da GS sob altas concentrações de Fe e Mn infere que houve um distúrbio na via primária do metabolismo do nitrogênio. A formação de α -cetoglutarato pela GDH também pode estar envolvida no reabastecimento da via primária de assimilação de nitrogênio, fornecendo substrato para a atividade da GOGAT na formação de glutamato (AUBERT et al., 2001).

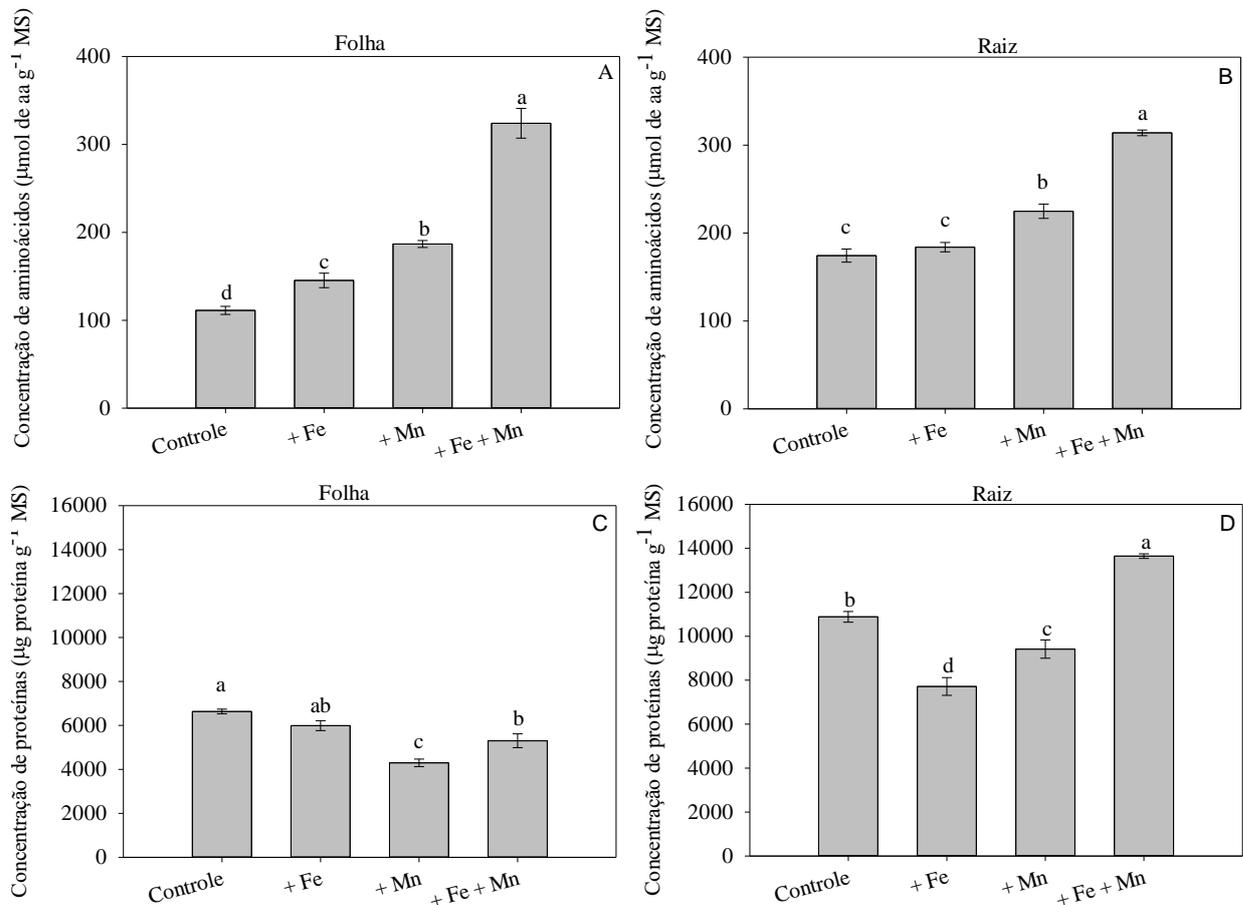
4.6 Proteínas e aminoácidos

As concentrações de aminoácidos aumentaram nas folhas (FIGURA 7A) com a imposição dos tratamentos, e esse aumento foi potencializado quando Fe e Mn foram adicionados simultaneamente. Nas raízes houve aumento em T3 e T4, quando Mn foi

adicionado (FIGURA 7B), sendo que no T4, esse aumento foi potencializado com a adição simultânea de Fe e Mn. No T1 foi possível observar que as raízes apresentaram concentrações superiores de aminoácidos quando comparadas as folhas.

A concentração de proteínas nas folhas (FIGURA 7C) foi mais baixa nos tratamentos com excesso de manganês. Nas raízes, os tratamentos com excesso de Fe e Mn aplicados isoladamente diminuíram significativamente a concentração dessas moléculas nesse órgão (FIGURA 7D). Em contrapartida, no T4 com excesso de Fe e Mn adicionados simultaneamente, houve um aumento de 25,39% na concentração de proteínas em relação ao controle. As raízes do T1 apresentaram concentrações de proteínas aproximadamente duas vezes maiores que nas folhas de *Z. tuberculosa*.

Figura 7 – Concentração de aminoácidos em folhas (A) e raízes (B) e concentração de proteínas em folhas (C) e raízes (D) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

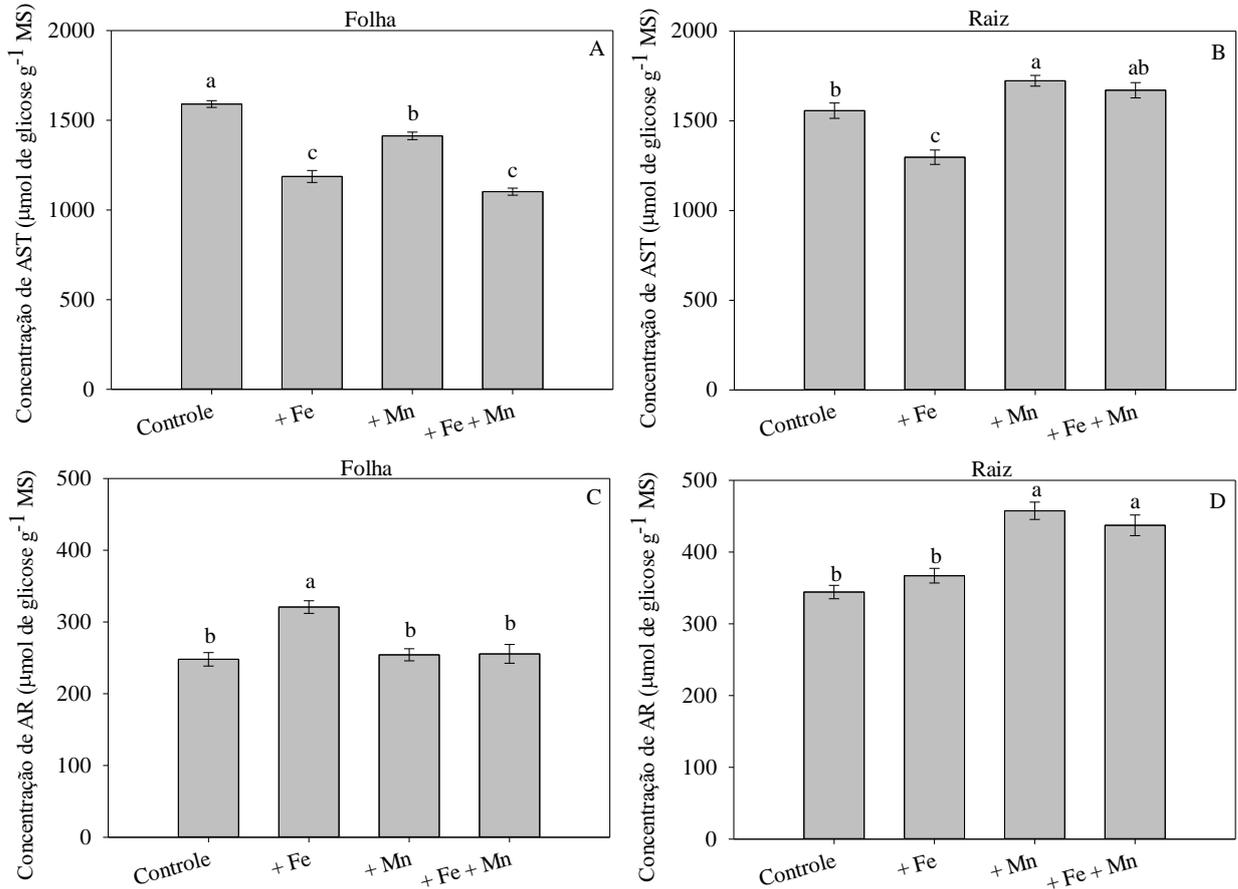
Com esses resultados, entende-se que o aumento dos níveis de aminoácidos dentro das células seja consequência da degradação das proteínas. As proteínas são moléculas que podem ser mobilizadas dentro das plantas durante seu desenvolvimento e utilizadas conforme a demanda dos tecidos vegetais, seja para o crescimento, manutenção ou até mesmo defesa. Elas são importantes fontes de armazenamento de nitrogênio, que uma vez gerados pela degradação proteica, podem ser remobilizados e reutilizados conforme a necessidade da planta (MÜNTZ, 1998; CÂNDIDO et al., 2011). Araújo et al. (2011) associaram a proteólise com o aumento dos níveis de aminoácidos a serem utilizados como substratos na síntese de ATP e também na remobilização de nitrogênio reduzido em plantas sob estresse abiótico. O trabalho de revisão realizado por Obata e Fernie (2012) mostra que vários estudos relataram mudanças nos níveis de aminoácidos em plantas sob diferentes tipos de estresses abióticos e a função regulatória dessas moléculas dentro do metabolismo em condições de estresse.

4.7 Carboidratos

Nas análises de açúcares solúveis totais, em folhas, os tratamentos com presença de ferro (T2 e T4) apresentaram os menores teores (FIGURA 8A), com uma redução de 25,39% no T2 e 30,71% no T4 em relação ao tratamento controle. Por outro lado, nas raízes de *Z. tuberculosa* (FIGURA 8B), os tratamentos com manganês (T3 e T4) apresentaram os maiores teores, com um aumento de 10,69% no T3 e 7,3% no T4, no qual o manganês parece ter mitigado os efeitos do ferro sobre os teores dessas moléculas nesse órgão da planta, uma vez que o T2 apresentou uma queda de 16,67% no acúmulo de AST. Quando comparadas folhas e raízes do T1, foi possível observar que a concentração de AST foi semelhante nos dois órgãos (aproximadamente 1600 μmol de glicose g^{-1} MS).

Quando submetida ao excesso de ferro, *Z. tuberculosa* apresentou um aumento de 29,37% nos teores de AR em folhas (FIGURA 8C). Em contrapartida, nas raízes (FIGURA 8D) os tratamentos com excesso de manganês apresentaram os maiores teores de AR, com um aumento de 32,93% e 27,04%, em T3 e T4, respectivamente. Houve um aumento discreto em relação a concentração de AR nas raízes (350 μmol de glicose g^{-1} MS) das plantas do tratamento controle em relação às folhas (250 μmol de glicose g^{-1} MS).

Figura 8 – Concentração de açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A) e raízes (B) e concentração de açúcares redutores (AR) em folhas (C) e raízes (D) de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



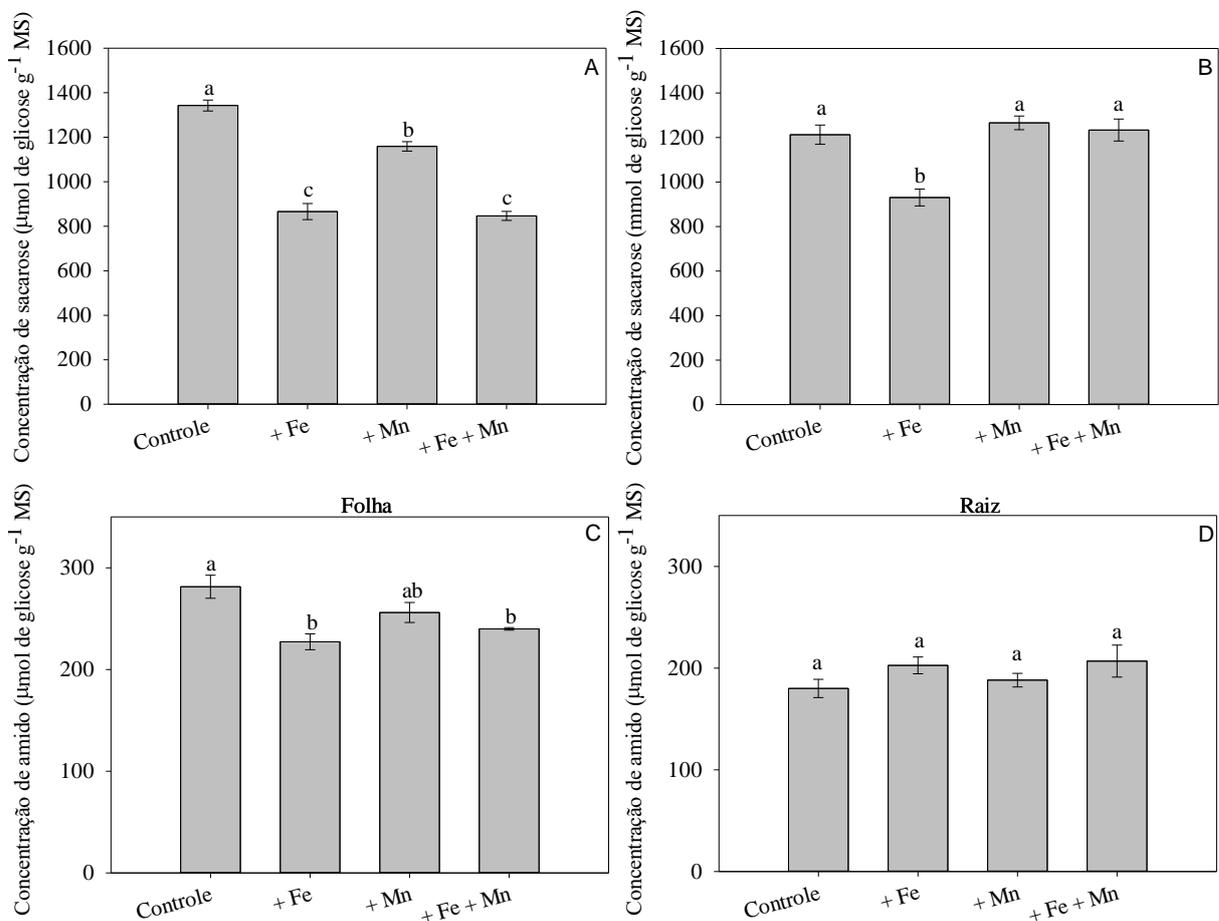
Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Em relação às concentrações de sacarose nas plantas, os resultados mostraram que houve uma redução média de 36,23% nos tratamentos com excesso de ferro (T2 e T4), em folhas (FIGURA 9A). Porém, nas raízes essa diminuição só foi observada no T2 (23,29%), e o T4 apresentou o mesmo comportamento que em análises de AST, com o manganês atenuando o efeito do ferro (FIGURA 9B). Quando comparadas folhas e raízes do tratamento controle, foi possível observar concentrações semelhantes de sacarose em ambos os órgãos.

Com relação a concentração de amido nas folhas (FIGURA 9C), os tratamentos com presença de ferro, T2 e T4, apresentaram as menores concentrações dessa molécula, com uma diminuição de 19,23% e 14,71%, respectivamente, enquanto que as análises de amido em

raízes (FIGURA 9D), não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. A concentração de amido em folhas de *Z. tuberculosa* no tratamento controle foi 60% maior (aproximadamente 280 μmol de glicose g^{-1} MS) que nas raízes (aproximadamente 170 μmol de glicose g^{-1} MS).

Figura 9 – Concentração de sacarose em folhas (A) e raízes (B) e concentração de amido em folhas (C) e raízes (D) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Os resultados indicaram que a redução da sacarose foi a principal responsável pela diminuição dos açúcares solúveis totais nas folhas com a imposição dos tratamentos. Já nas raízes, o excesso de manganês propiciou o aumento de AST nas plantas em relação ao controle e mitigou o efeito do ferro no T4, uma vez que o excesso de ferro provocou redução dessas moléculas no T2 assim como aconteceu nas folhas. Alguns estudos mostram que a

redução dos níveis de açúcares solúveis totais pode estar relacionada a atenuação da fotossíntese e conseqüentemente a redução na assimilação de carbono em plantas sob condições de estresse abiótico (ROITSCH, 1999; GUPTA; KAUR, 2005). Além disso, a baixa concentração de AST também pode estar envolvida no controle da produção de EROs, uma vez que os carboidratos são consumidos em vias metabólicas, por exemplo, na via das pentoses fosfato, responsáveis pela produção de poder redutor (NADPH), que contribui para a eliminação de espécies reativas de oxigênio (COUÉE et al., 2006). Onyango et al. (2019) observaram decréscimo nos níveis de açúcares solúveis em variedades de arroz não tolerantes à toxidez provocada pelo excesso de ferro e constataram que algumas dessas variedades utilizaram a mobilização de carboidratos no estágio inicial do período de estresse como mecanismo de tolerância para antecipar a escassez de metabólitos.

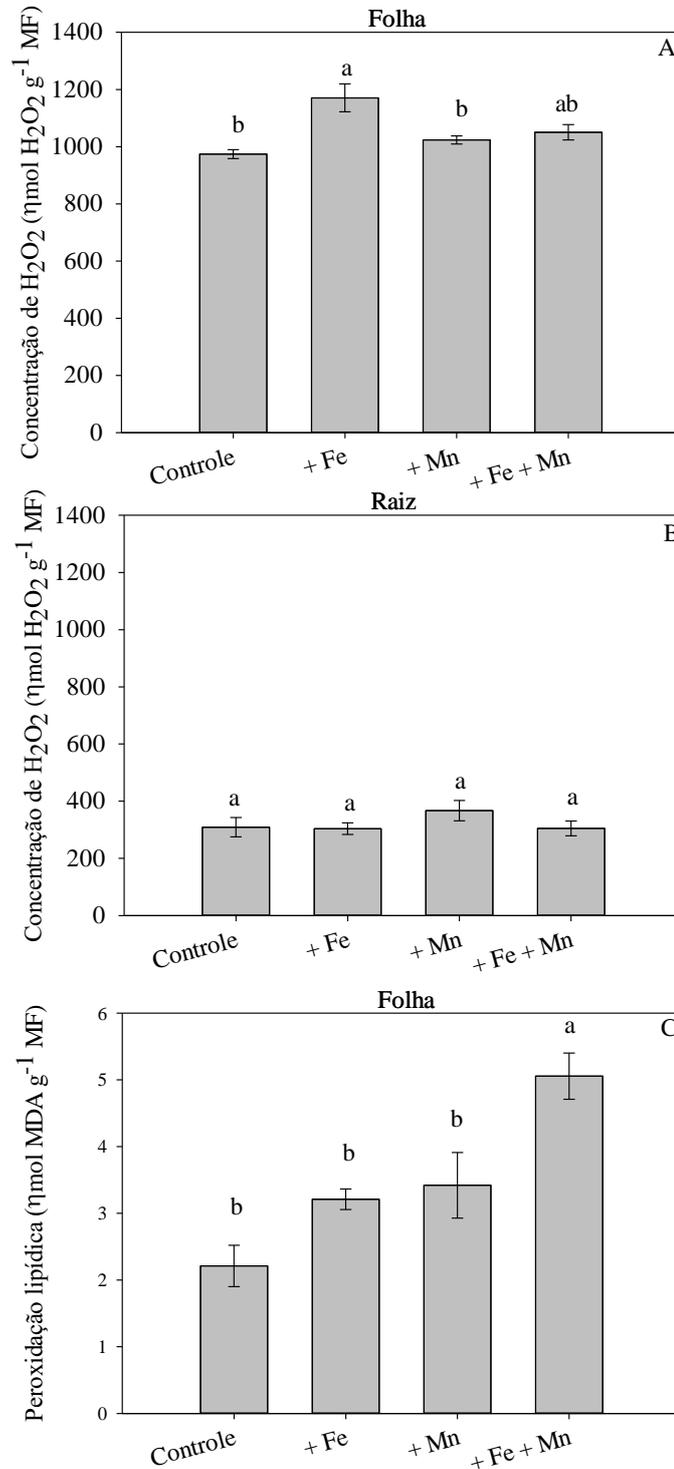
Os AST são importantes substratos na obtenção de energia e no crescimento vegetal. A diminuição do nível dessas moléculas dentro das células, seja devido à baixa eficiência fotossintética ou devido a mobilização e consumo dos mesmos em outras vias, pode provocar vulnerabilidade nas plantas. Todavia, o amido é outra importante forma de reserva de carboidratos dentro das células vegetais e sua utilização, quando está armazenado, é acentuada quando há aumento na demanda de açúcares e também quando não está acontecendo fotossíntese (SMITH; STITT, 2007; SULPICE et al., 2009), o que explica a diminuição na concentração desse polissacarídeo em folhas de *Z. tuberculosa* nos tratamentos com excesso de Fe e Mn (FIGURA 8A), promovendo o fornecimento de carbono para as plantas.

4.8 Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

A concentração de peróxido de hidrogênio foi mais expressiva nas folhas de plantas submetidas aos tratamentos com excesso de ferro (FIGURA 10A), com uma diferença de 20,19% no T2 e 7,83% no T4, quando comparados ao controle. Nas raízes não houve diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$) (FIGURA 10B). Quando analisadas as concentrações de H_2O_2 em folhas e raízes do tratamento controle, foi possível observar que nas folhas esses valores foram cerca de 3 vezes maiores que nas raízes.

A peroxidação lipídica, obtida através da quantificação de MDA, foi 2 vezes maior nas folhas de *Z. tuberculosa* submetidas ao T4 (FIGURA 10 C) quando comparadas aos demais tratamentos. Nas raízes, os valores de MDA ficaram abaixo do limite de detecção, portanto, não foi possível quantificar peroxidação lipídica nesse órgão.

Figura 10 – Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A) e raízes (B) e peroxidação lipídica em folhas (C) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

Nas análises realizadas em *Z. tuberculosa*, os resultados mostraram que houve acréscimo de H₂O₂ nas folhas das plantas do T2, submetidas ao excesso de ferro. O incremento de H₂O₂ nas células pode estar relacionada ao aumento de EROs provocada pelo excesso de Fe livre dentro das células em plantas de Ipê-felpudo. De Oliveira Jucoski et al. (2013) também verificaram que houve aumento de H₂O₂ em folhas de pitangueira sob excesso de ferro. Chalmardi, Abdolzadeh e Sadeghipour (2014) e Verma e Pandey (2015) relataram aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio tanto em folhas quanto raízes de *Oryza sativa* L e *Vigna radiata* L. submetidas a altas concentrações de ferro. A adição de manganês no T4 acabou mitigando os efeitos provocados pelo excesso de ferro nas folhas, pois fez com que a concentração de H₂O₂ nesse tratamento fosse 12,36% menor do que em T2.

A peroxidação lipídica é um marcador de estresse oxidativo, obtido através da quantificação do subproduto malondialdeído (MDA) (SHARMA et al., 2012). Em relação às análises de peroxidação lipídica em folhas (FIGURA 10C), os maiores valores encontrados foram no T4, no qual as plantas foram submetidas ao excesso de Fe e Mn concomitantemente. Esse resultado possibilita a inferência de que, no T4, o sistema antioxidante das plantas não foi eficiente no combate às espécies reativas de oxigênio e ao peróxido de hidrogênio, causando, portanto, dano oxidativo. Pandey e Verma (2019) também verificaram aumento de MDA nas folhas de *Triticum aestivum* L. submetidos ao estresse causado por excesso de ferro e Silva et al. (2017) observaram aumento de MDA em folhas de *Zea mays* L. cv. Saracura submetidas ao estresse causado por excesso de Mn. Em raízes de *Z. tuberculosa* não foram constatadas concentrações de MDA, inferindo o excesso de Fe e Mn adicionados aos tratamentos não foram suficientes para causar dano oxidativo nesse órgão da planta.

4.9 Atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX)

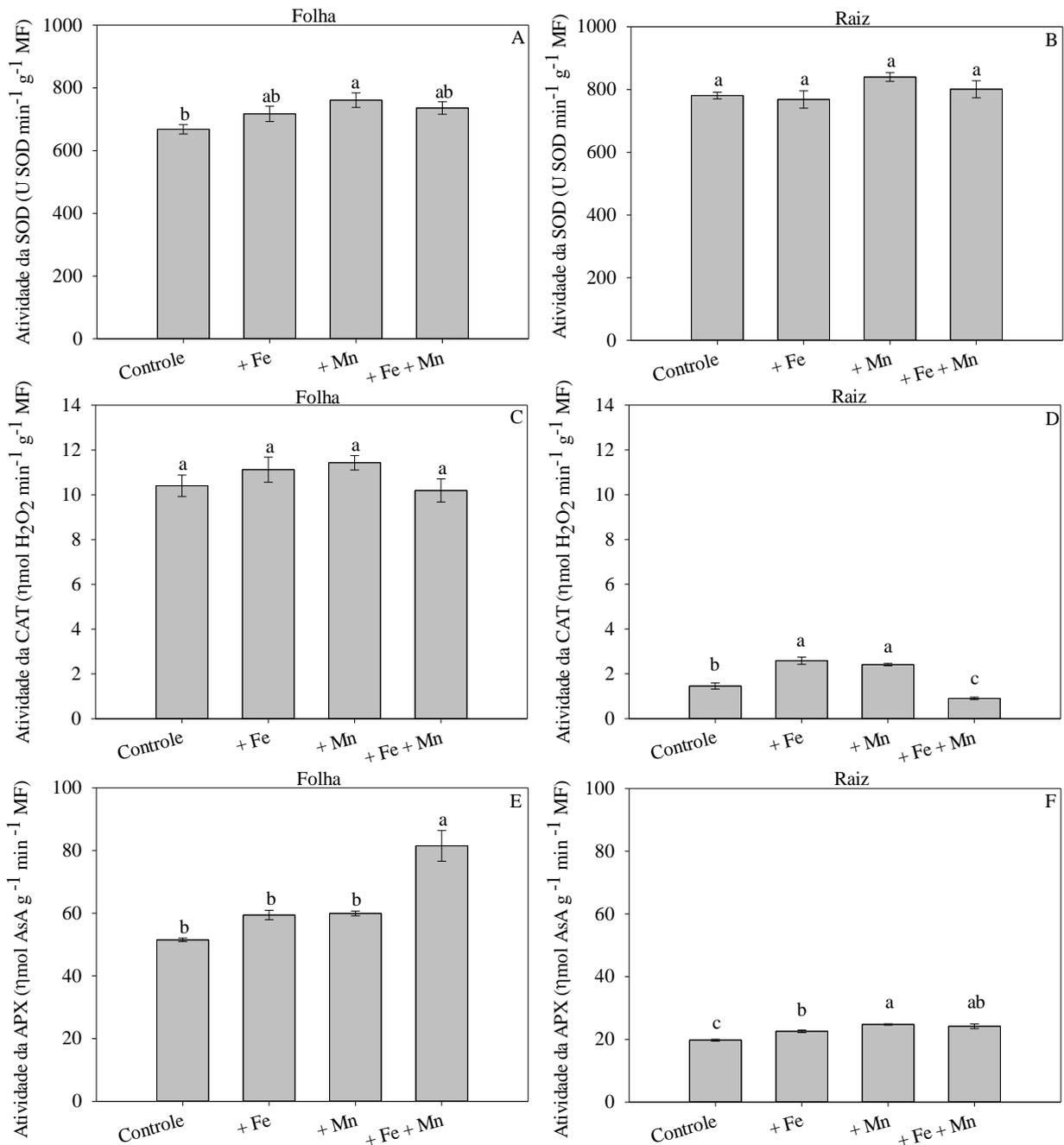
Nas análises das enzimas do sistema antioxidante, a atividade da SOD (FIGURA 11A) apresentou aumento com a imposição dos tratamentos quando comparada ao controle, de: T2 – 7,34%, T3 – 13,90% e T4 – 10,13%. Nas raízes (FIGURA 11B), a atividade da SOD não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($P < 0,05$). Quando comparadas folhas e raízes do T1, foi possível observar que nas raízes a atividade da SOD foi ligeiramente maior que nas folhas.

A atividade da CAT também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos em folhas (FIGURA 11C). Entretanto, nas raízes (FIGURA 11D), o T2 e o T3 apresentaram maiores atividades da enzima, com aumento de 77,50% e 65,36%, respectivamente, em

relação ao controle. Contudo, no T4, onde as plantas estavam submetidas ao excesso de ferro e manganês simultaneamente, a atividade da CAT foi a menor entre todos os tratamentos, com uma diminuição de 37,99% em relação ao tratamento controle. Nas folhas do T1 foram analisados valores para a atividade da CAT cerca de 7 vezes maior que nas raízes.

Em amostras de folha (FIGURA 11E) a atividade da enzima APX foi maior no T4, com uma diferença de 30,11% em relação aos demais tratamentos. Já em raízes (FIGURA 11F), a atividade da APX foi maior nos tratamentos com excesso de manganês (T3 e T4), apresentando um aumento de 23,81% em relação ao controle. As folhas do T1 apresentaram aumento de 50% na atividade da enzima APX em relação às raízes.

Figura 11 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B), catalase (CAT) em folhas (C) e raízes (D) e peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (E) e raízes (F) de plantas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau ex Verl., submetidas aos tratamentos com solução nutritiva completa (controle), SNC com excesso de ferro – 0,160 mM (+ Fe), SNC com excesso de manganês – 0,327 mM (+ Mn) e SNC com excesso de ferro e manganês – 0,160 mM + 0,327 mM (+ Fe + Mn).



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições. Fonte: Do autor 2021.

O excesso de Fe e Mn adicionados aos tratamentos favoreceu o aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX envolvidas no sistema antioxidante das plantas. Segundo Boojar e Goodarzi (2007), o aumento das atividades das enzimas antioxidantes faz parte dos mecanismos de resposta à síntese de espécies reativas de oxigênio em plantas com toxicidade provocada pelo excesso de metais. A SOD possui a função de catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, portanto, o aumento da concentração dessa enzima nas plantas, mostra que houve produção de EROs, durante a imposição dos tratamentos.

O aumento de espécies reativas de oxigênio dentro das células vegetais foi atribuído ao excesso de ferro (CHALMARDI; ABDOLZADEH; SADEGHIPOUR, 2014; PANDEY; VERMA, 2019) e também ao excesso de manganês (CEBALLOS-LAITA et al., 2018) em estudos anteriores. O excesso de Fe pode provocar reações de Fenton e converter o H_2O_2 em radicais livres (RAVET et al., 2009). O excesso de manganês também está associado à produção de EROs e ativação dos mecanismos antioxidantes das plantas (CEBALLOS-LAITA et al., 2018; SILVA et al., 2017).

5. CONCLUSÕES

A absorção de ferro nos tecidos vegetais foi significativamente reduzida com a adição de manganês. Ainda assim, a concentração de Fe absorvida pelas plantas foi maior quando comparada à de Mn, o que acabou estimulando sintomas de toxidez em *Z. tuberculosa*, evidenciados pela redução na concentração de clorofilas e carotenoides, pela diminuição da eficiência fotossintética, redução da atividade da redutase do nitrato, da concentração de carboidratos e do crescimento das raízes, além do aumento na concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas. No entanto, nos tratamentos onde houve adição de manganês, observou-se mitigação dos efeitos tóxicos provocados pelo ferro nos parâmetros avaliados. A ação conjunta do ferro e manganês propiciou o aumento dos teores de nitrogênio dentro das plantas e estimulou o crescimento das raízes de *Z. tuberculosa* em comparação com o tratamento controle. As atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio sofreram alterações, com a queda da atividade da GS em folhas e raízes na presença de Fe e Mn em excesso e com o aumento na atividade de GDH. A Atividade da GOGAT aumentou na presença de Mn nas folhas e com a presença de Fe nas raízes. Além disso, o aumento das concentrações desses elementos no meio de cultivo provocou a degradação de proteínas, aumento de aminoácidos livres e induziu o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante em folhas e raízes de *Z. tuberculosa*. A quantificação da concentração de MDA evidenciou que houve dano oxidativo provocado pela ação simultânea de Fe e Mn nas folhas, mas não houve estresse oxidativo nas raízes em nenhum dos tratamentos. O Mn se mostrou menos danoso aos processos fisiológicos avaliados em mudas de *Z. tuberculosa*, quando comparados ao excesso de ferro. Esses resultados sugerem que essa espécie tem potencial para se desenvolver em solos contaminados pelo rejeito composto por Fe e Mn nas concentrações que foram encontradas e relatadas nos laudos e estudos publicados anteriormente.

REFERÊNCIAS

- AKTAS, M.; VAN EGMOND, F. Effect of nitrate nutrition on iron utilization by a Fe-efficient and Fe-inefficient soybean cultivar. **Plant Soil**, v. 51, p. 251-274, 1979.
- ARAÚJO, C. B. **Contribuição ao estudo do comportamento de barragens de rejeito de mineração de ferro**. 2006. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
- ARAÚJO, W. L. et al. Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in plant science**, v. 16, n. 9, p. 489-498, 2011.
- AUBERT, S. et al. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 37-45, 2001.
- BAGGIO, A. J.; CARPANEZZI, O. B. Alguns sistemas de arborização de pastagens. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 17, p. 47-60, 1988.
- BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling** v. 11, p. 41-49, 1994.
- BALK, J.; SCHAEDLER T. A. Iron cofactor assembly in plants. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 125-153, 2014.
- BARBOSA, J. M.; MACEDO, A. C. Essências florestais nativas de ocorrência no Estado de São Paulo: informações técnicas sobre sementes, grupo ecológico, fenologia e produção de mudas. **Instituto de Botânica e Fundação Florestal**, p. 125, 1993.
- BARCELOS, G. J. N.; LAGE, J. R. D.; CORDEIRO, J. S. Characterization of Brazil mine tailings dams. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, 2020.
- BARROS, N. F.; BRANDI, R. M. Influência de três espécies florestais sobre a fertilidade de solo de pastagem em Viçosa, MG. **Brasil Florestal**, v. 6, n. 21, p. 24-29, 1975.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and soil**, v. 201, n. 1, p. 137-147, 1998.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n. 4, p. 558-573, 2005.
- BERGES, J. A.; HARRISON, P. J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 1, p. 82-93, 1995.
- BISINOTI, M. C.; YABE, M. J. S.; GIMENEZ, S. M. N. Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina – PR. **Revista Analytica**, v. 8, p. 22-27, 2004.

BNDES. **Minério de ferro: insumos básicos**. 2014. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/>. Acesso em: 10 de dez. 2020.

BOLLE-JONES, E. W. Copper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and soil**, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957.

BOOJAR, M. M. A.; GOODARZI, F. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2138-2147, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Centro de Tecnologia Mineral**. 2004. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2005-137-00.pdf>

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BROADLEY, M. et al. Function of nutrients: micronutrients. *In*: Marschner, P. (Ed.), Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. **Academic Press**, p. 119-284, 2012.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *In*: Methods in enzymology. **Academic Press**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CÂNDIDO, E. S. et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3290-3305, 2011.

CARMO, F. F. et al. "Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context". **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 3, p. 145-151, 2017.

CARVALHO, D. A. et al. Florística e estrutura da vegetação arbórea de um fragmento de floresta semidecidual às margens do Reservatório da Usina Hidrelétrica Dona Rita (Itambé do Mato Dentro, MG). **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 1, p. 37-55, 2000.

CARVALHO, P. E. R. Ipê-Felpudo. **Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, v. 1, p 1-9, 2005.

CARVALHO, W. A. C. Variações da composição e estrutura do comportamento arbóreo da vegetação de oito fragmentos de floresta semidecídua do Vale do Alto Rio Grande, MG. 2002. **Dissertação** - Universidade Federal de Lavras, p. 1-168, 2002.

CEBALLOS-LAITA, L. et al. Effects of manganese toxicity on the protein profile of tomato (*Solanum lycopersicum*) roots as revealed by two complementary proteomic approaches, two-dimensional electrophoresis and shotgun analysis. **Journal of proteomics**, v. 185, p. 51-63, 2018.

CHALMARDI, Z. K.; ABDOLZADEH, A.; SADEGHIPOUR, H. R. Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 2, p. 493-502, 2014.

CHEN, P. et al. Iron and manganese-related CNS toxicity: mechanisms, diagnosis and treatment. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 243-260, 2019.

CLAIR, S. B.; CARLSON, J. E.; LYNCH, J. P. Evidence for oxidative stress in sugar maple stands growing on acidic, nutrient imbalanced forest soils. **Oecologia** v. 145, p. 257-268, 2005.

CLAIR, S. B.; LYNCH, J. P. Element accumulation patterns of deciduous and evergreen tree seedlings on acid soils: implications for sensitivity to manganese toxicity. **Tree Physiology**, v. 25, p. 85-92, 2005.

COUÉE, I. et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 3, p. 449-459, 2006.

CRICHTON, R. R. et al. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 9-18, 2002.

CRUZ, F. V. S. et al. Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110021, 2020.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 53, n. 2, 2014.

DE OLIVEIRA JUCOSKI, G. et al. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 5, p. 1645-1657, 2013.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient Disorders and Nutrient Management International Rice Research Institute (IRRI). **Manila, Philippines**. 223p, 2000.

DUCIC, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 103-112, 2005.

ECKHARDT, U.; MARQUES, A. M.; BUCKHOUT, T. J. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant molecular biology**, v. 45, n. 4, p. 437-448, 2001.

EL-JAOUAL, T.; COX, D. A. Manganese toxicity in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 353-386, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Relatório Técnico: Avaliação dos Impactos Causados ao Solo pelo Rompimento de Barragem de Rejeito de Mineração em Mariana, MG: Apoio ao Plano de Recuperação Agropecuária**. 2015.

Disponível em:

http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/566237/RESPOSTA_PEDIDO_Relatorio%20Tecnico_Avaliacao%20dos%20Impactos_Acidente%20Mariana_Embrapa.pdf. Acesso em: 08 de fev. 2020.

FAGERIA, N. K.; STONE, L. F. Micronutrient deficiency problems in South America. *In: Micronutrient deficiencies in global crop production*. **Springer**, p. 245-266, 2008.

- FAGERIA, V. D. Nutrient Interactions in Crop Plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 8, n. 24, p. 1269-1290, 2001.
- FARMER, E. E.; MUELLER, M. J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 429-450, 2013.
- FECHE-CHRISTOFFERS, M. M. et al. Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1935-1946, 2003.
- FEEMA. Nitrogênio Kjeldahl total (micro Kjeldahl). Manual do Meio Ambiente Volume II – **Métodos FEEMA**, p. 45, 1983.
- FERNANDO, D. R.; LYNCH, J. P. Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. **Annals of Botany**, v. 116, p. 313-319, 2015.
- FERNANDO, D. R. et al. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus. **American journal of botany**, v. 100, n. 4, p. 690-700, 2013.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese). R package version 1.2.1, 2020.
- FERRETTI, A. R. et al. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestal Estatístico**, v. 3, n. 7, p. 73-77, 1995.
- FONTAINE, J. X. et al. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of Arabidopsis demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. **The Plant Cell**, v. 24, n. 10, p. 4044-4065, 2012.
- FORDE, B. G. The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 39-43, 2002.
- FRANÇA, G. S.; STEHMANN, J. R. Florística e estrutura do componente arbóreo de remanescentes de Mata Atlântica do médio rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, p. 607-624, 2013.
- GENON, J. G. et al. Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. **Plant and Soil**, v. 166, n. 1, p. 109-115, 1994.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae: part II (tribe Tecomeae). **Flora Neotropica**, p. 1-370, 1992.
- GERMANI, Darcy J. **A mineração no Brasil. Relatório Final**, Brasil, 2002.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GOUSSIAS, C.; BOUSSAC, A.; RUTHERFORD, A. W. Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1426, p. 1369-1381, 2002.

GRATÃO, P. L. et al. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n.1, p. 387-394, 2009.

GROAT, R. G.; VANCE, C. P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): developmental patterns and response to applied nitrogen. **Plant Physiology**, v. 67, n. 6, p. 1198-1203, 1981.

GUPTA, A. K.; KAUR, N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of biosciences**, v. 30, n. 5, p. 761-776, 2005.

HANSEL, C. M. et al. Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impact aquatic plants. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3863-3868, 2001.

HATJE, V. et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 107-106, 2017.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

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

HORST, W. J. The physiology of manganese toxicity. In: *Manganese in soils and plants*. Springer, p. 175-188. 1988.

HUDSON-EDWARDS, K. A. Sources, mineralogy, chemistry and fate of heavy metal-bearing particles in mining-affected river systems. **Mineralogical magazine**, v. 67, n. 2, p. 205-217, 2003.

HYNDMAN, R. **fpp: Data for forecasting: principles and practice**. R package version 0.5. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais**. 2015. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/laudo_tecnico_preliminar.pdf. Acesso em: 08 de fev. 2020.

JAYAWEERA, M. W. et al. Contribuição do jacinto-d'água (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) cultivado sob diferentes condições de nutrientes para os mecanismos de remoção de Fe em pântanos construídos. **Jornal de gestão ambiental**, v. 87, n. 3, pág. 450-460, 2008.

JEONG, J.; GUERINOT, M. L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends Plant Sci.**, v. 14, p. 280-285, 2009.

JESUS, R. M. Restauração florestal na mata atlântica. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. Do substrato ao solo: trabalhos voluntários**, p. 554-557, 1997.

- JESUS, R. M.; GARCIA, A. Teste de espaçamento com *Zeyhera tuberculosa* (Vell.) Bur. Crescimento aos 48 meses de idade. **Revista do Instituto Florestal**, Edição dos Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, v. 4, n. 2, p. 719-724, 1992.
- KIM, S. A.; GUERINOT, M. L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2273-2280, 2007.
- KIRKBY, E. A.; ROMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.
- KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 131-152, 2012.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.
- KOSSOFF, D.; DUBBIN, W. E.; ALFREDSSON, M.; EDWARDS, S. J.; MACKLIN, M. G.; HUDSON-EDWARDS, K. A. Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. **Applied Geochemistry**, v. 51, p. 229-245, 2014.
- KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; BERTOLAZI, A. A.; DOBBSS, L. B.; CAMPOSTRINI, E.; DIAS, T.; RAMOS, A. C. Ecophysiology of iron homeostasis in plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 62, p. 39-47, 2016. 43.
- KUHLGERTS, G. et al. MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. **Royal Society open science**, v. 3, n. 10, p. 160592, 2016.
- KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Radii and *Sophora tomentosa* L. **Science of the Total Environment**, v. 403, p. 207-214, 2008.
- LAVRES JUNIOR, J.; REIS, A. R.; ROSSI, M. L.; CABRAL, C. P.; NOGUEIRA, N. D. L.; MALAVOLTA, E. Changes in the ultrastructure of soybean cultivars in response to manganese supply in solution culture. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 287-294, 2010.
- LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews online**, p. 1-40, 2011.
- LI, Q.; CHEN, L. S.; JIANG, H. X.; TANG, N.; YANG, L. T.; LIN, Z. H.; YANG, G. H. Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2010.
- LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, v. 118, p. 205-397, 2013.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 1, n. 1, p. 4-3, 2001.

- LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. Tecomeae (Bignoniaceae) da cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 10, n. 1, p. 103-138, 1996.
- LOMBARDI, J. A.; GONÇALVES, M. Composição florística de dois remanescentes de Mata Atlântica do sudeste de Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 23, p. 255-282, 2000.
- LOPES, B. C.; FERREIRA, M. B. D.; BRANDÃO, M. Sombreamento em pastagens: espécies recomendadas para as diversas regiões do Estado de Minas Gerais. **Daphne**, v. 6, n. 4, p. 7-15, 1996.
- LÓPEZ-MILLÁN, A.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. **Plant molecular biology**, v. 54, n. 4, p. 583-596, 2004.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Ed Plantarum**, v. 1, p. 343, 2002.
- LUO, A.; JING, G.; WU, P.; NI, J.; JIANG, S.; ZHANG, Y. Rice genotype differences in nutrient status under excessive ferric-iron conditions. **Journal of plant nutrition**, v. 20, n. 10, p. 1361-1373, 1997.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. **POTAFÓS**, 2ª ed., p. 319, 1997.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, v. 2, 1995.
- MEHRABAN, P.; ZADEH, A. A.; SADEGHIPOUR, H. R. Iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), under different potassium nutrition. **Asian J. Plant Science**, v. 7, n. 3, p. 251-259, 2008.
- MELO-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, I. C.; CORUZZI, G. M. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 4718-4723, 1996.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition. Bern. **International Potash Institute**, p. 687-695, 1987.
- MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 979-987, 2002.
- MILLALEO, R. et al. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 4, p. 470-481, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOLLER, M. I.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

- MUKHOPADHYAY, M. J.; SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **The Botanical Review**, v. 57, n. 2, p. 117-149, 1991.
- MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 77-99, 1998.
- MURCHIE, E. H.; RUBAN, A. V. Dynamic non-photochemical quenching in plants: from molecular mechanism to productivity. **The Plant Journal**, v. 101, n. 4, p. 885-896, 2020.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NICKELSEN, J.; RENGSTL, B. Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 609-635, 2013.
- OBATA, T.; FERNIE, A. R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3225-3243, 2012.
- ONYANGO, D. A. et al. Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. **Functional Plant Biology**, v. 46, n. 1, p. 93-105, 2019.
- PANDEY, N.; VERMA, L. Nitric Oxide Alleviates Iron Toxicity by Reducing Oxidative Damage and Growth Inhibition in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings. **International Journal of Plant and Environment**, v. 5, n. 1, p. 16-22, 2019.
- PICKEL, D. B. J. As principais árvores que dão madeira. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, v. 6, n. 6, p. 56-86, 1953.
- PIMENTA, J. A. et al. Efeito do alumínio sobre enzimas ligadas à assimilação do nitrogênio em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, n. 2, p. 169-175, 1989.
- PINTO-COELHO, R. M. Existe governança das águas no Brasil? Estudo de caso: O rompimento da Barragem de Fundão, Mariana (MG). **Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico**, v. 24, n. 1-2, p. 16-43, 2015.
- QUEIROZ, H. M. et al. The Samarco mine tailing disaster: a possible time-bomb for heavy metals contamination? **Science Total Environment**, v. 637, p. 498-506, 2018.
- RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, v. 51, n. 3, p. 277-280, 1981.
- RAVET, K. et al. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 57, n. 3, p. 400-412, 2009.
- REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M. Metal-accumulating plants. In: Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. **John Wiley e Sons**, p. 193-229, 2000.

- ROESER, H. M.; ROESER, P. A. O quadrilátero ferrífero – MG, Brasil: aspectos sobre sua história, seus recursos minerais e problemas ambientais relacionados. **Geonomos**, v. 18, n.1, 2010.
- ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 3, p. 198-206, 1999.
- ROMEIRO, F. **Relatório técnico: Ocorrência de cianobactérias na bacia hidrográfica do rio Doce**. ANA, 2012.
- ROSSINI-OLIVA, S.; ABREU, M. M.; LEIDI, E. O. Strategies in a metallophyte species to cope with manganese excess. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 43, n. 4, p. 1523-1535, 2021.
- SAMARANAYAKE, P.; PEIRIS, B. D.; DSSANAYAKE, S. Effect of excessive ferrous (Fe²⁺) on growth and iron content in rice (*Oryza sativa*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, p. 296-298, 2012.
- SAMARCO. **Balço de ações: um ano de rompimento de fundão**. 2016. Disponível em: https://issuu.com/samarcomineracao/docs/book_samarco_final_baixa. Acesso em 08 de fev. 2020
- SANTOS, E. F. et al. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 113, p. 6-19, 2017.
- SARMA, H. et al. Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, p. 63-86, 2012.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas de plantas**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.
- SCHMIDT, S. B.; HUSTED, S. The Biochemical Properties of Manganese in Plants. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 381, 2019.
- SCHMIDT, S. B.; JENSEN, P. E.; HUSTED, S. Manganese Deficiency in Plants: The Impact on Photosystem II. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 7, 622-632, 2016.
- SCHMIDT, W. Iron stress-induced redox reactions in bean roots. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 448-452, 1993.
- SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1351-1365, 2002.
- SECRETARIA DE ESTADO DE DESENVOLVIMENTO REGIONAL, POLÍTICA URBANA E GESTÃO METROPOLITANA (SEDRU). **Relatório: Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana-MG.**, 2016.
- SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

SFREDO, G. J.; BORKERT, C. M. Deficiências e Toxicidades de Nutrientes em Plantas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p. 44, 2004.

SHAN, A. Y. K. V. et al. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 754-762, 2012.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, p. 26, 2012.

SILVA, A. M. et al. Estado de Conservação da ictiofauna do rio Guandu, afluente do baixo rio Doce, ES. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 4, n. 1, p. 8, 2013.

SILVA, D. M. et al. Relação entre a toxicidade de manganês e a tolerância ao alagamento em plantas de *Zea mays* L. Cv. Saracura", **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 39, n. 1, p. 75-82, 2017.

SILVA, L. A.; SOARES, J. J. Levantamento fitossociológico em um fragmento de floresta estacional semidecídua, no Município de São Carlos, SP. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 205-216, 2002.

SKOPELITIS, D. S. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, v 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 9, p. 1126-1149, 2007.

SOARES, L. Barragem de rejeitos. Comunicação Técnica elaborada para o Livro Tratamento de Minérios. **CETEM/MCT**, v. 5, p. 831-896, 2010.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 449-475, 2002.

SULPICE, R. et al. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 25, p. 10348-10353, 2009.

TAYLOR, G. J.; CROWDER, A. A. Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. **American Journal of Botany**, v. 70, p. 1254-1257, 1983.

TERCÉ-LAFORGUE, T. et al. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: II. Physiological characterization of plants overexpressing the two enzyme subunits individually or simultaneously. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 10, p. 1635-1647, 2013.

TORTOLERO G. M. D. **Reducción enzimática de nitrato a nitrito en azotobacter chroococcum dependiente de ferredoxina**. 1975. Tese de doutorado - Universidad de Sevilla, 1975.

TRUGILHO, W. S. **Avaliação da fertilidade de latossolos naturais ou contaminados por rejeito de minério de ferro**. 2018. Dissertação - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2018.

UMENA, Y. et al. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstrom. **Nature**, v. 473, p. 55–65, 2011.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, v.151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VERMA, L.; PANDEY, N. The effect of Fe toxicity on seed germination and early seedling growth of green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research. ISSN (Online)**, p. 2319-7064, 2015.

VIEIRA, F. Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. **Flora**, p. 1-40, 2010.

WALDRON, K. J. et al. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, v. 460, p. 823-830, 2009.

WALKER, E. L.; CONNOLLY, E. L. Time to pump iron: iron-deficiency signaling mechanisms of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 530-535, 2008.

WALLACE, A.; WOOD, R.A.; SOUFI, S. M. Cation-anion balance in lime-induced chlorosis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 7, n. 1 p. 15-26, 1976.

WINTZ, H.; FOX, T.; VULPE, C. Responses of plants to iron, zinc and copper deficiencies. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 766-768, 2002.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The Determination of Amino Acids with Ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YEMM, E.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

YI, Y. et al. Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere. **CRC Press**, p. 295-307, 1994.

ZAHRA, N. et al. Fe toxicity in plants: Impacts and remediation. **Physiologia Plantarum**, 2021.

ZAITSEV, G. A.; DUBROVINA, O. A.; SHAINUROV, R. I. iron and manganese migration in “soil–plant” system in Scots pine stands in conditions of contamination by the steel plant’s emissions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

ZELITCH, I. et al. High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 195-204, 2009.

ZHU, W.; RICHARDS, N. G. J. Biological functions controlled by manganese redox changes in mononuclear Mn-dependent enzymes. **Essays in Biochemistry**, v. 61, p. 259-270, 2017.

ZUO, Y.; ZHANG, F. Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. **Plant Soil**, v. 339, p. 83-95, 2011.