



THAIARA DE SOUZA

**IMPACTO DE FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO
E METABOLISMOS DO NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM
PLANTAS JOVENS DE MILHO (*Zea mays*) CULTIVADAS EM
SUBSTRATO CONTENDO REJEITO DE MINERAÇÃO**

LAVRAS – MG

2020

THAIARA DE SOUZA

**IMPACTO DE FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E METABOLISMOS
DO NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE MILHO (*Zea mays*)
CULTIVADAS EM SUBSTRATO CONTENDO REJEITO DE MINERAÇÃO**

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 a
obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

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

LAVRAS – MG
2020

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

Souza, Thaiara de.

Impacto de fontes de nitrogênio no crescimento e metabolismos do nitrogênio e antioxidante em plantas jovens de milho (*Zea mays*) cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração / Thaiara de Souza. - 2020.

52 p. : il.

Orientador(a): Luiz Edson Mota de Oliveira.

Coorientador(a): Elisa Monteze Bicalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Assimilação do nitrogênio. 2. Enzimas antioxidante. 3. *Zea mays*. I. Oliveira, Luiz Edson Mota de. II. Bicalho, Elisa Monteze. III. Título.

THAIARA DE SOUZA

**IMPACTO DE FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E METABOLISMOS
DO NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE MILHO (*Zea mays*)
CULTIVADAS EM SUBSTRATO CONTENDO REJEITO DE MINERAÇÃO**

**IMPACT OF NITROGEN SOURCES ON THE GROWTH AND METABOLISMS OF
NITROGEN AND ANTIOXIDANT IN YOUNG MAIZE (*Zea mays*) PLANTS
CULTIVATED IN SUBSTRATE CONTAINING MINING TAILINGS**

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 a
obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de dezembro de 2020.

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira	UFLA
Prof. ^a Dr. ^a Janaina Guernica Silva	UFMS
Dr. ^a . Jacqueline Oliveira dos Santos	CEBAL

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

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

LAVRAS – MG

2020

Aos meus pais, José e Rosimeire...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo amor e apoio, imprescindíveis para a concretização desta etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, à UFLA, pelo crescimento profissional e pessoal, e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de estudo.

Ao orientador, Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, por toda confiança, carinho e por não ter me deixado desistir em momentos difíceis.

A coorientadora Prof^a. Dr^a. Eliza Monteze Bicalho e ao LCDP, por todo o aprendizado adquirido nas conversas e reuniões.

A república Carpe Diem, pelos dias convividos, farras, choros e todo o companheirismo, agradeço a cada moradora e ex-moradora por estarem ao meu lado quando precisei, cada uma em seu momento e do seu jeito.

Ao Ligeirinho, pela amizade, amor, companheirismo, incentivo e toda a paciência do mundo.

A Taís, Val e Lissa, pelas risadas, incentivos e pela imensa ajuda para realização desse trabalho.

A todos de que alguma forma foram presentes.

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho, estudar o impacto de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e metabolismos do nitrogênio e antioxidante em plantas jovens de milho (*Zea mays*) cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração. Dessa maneira, sementes de milho (Cultivar Lavrador) foram semeadas em vasos de 1 litro com substrato contendo rejeito de mineração, oriundo do rompimento da barragem de Fundão (Mariana - MG) e areia na proporção 3:1, respectivamente. Foram testados 4 tratamentos com 8 repetições variando a fonte de nitrogênio na dose recomendada para milho de 100 kg ha⁻¹. As fontes de nitrogênio utilizadas foram sulfato de amônio (tratamento com amônio), nitrato de cálcio (tratamento com nitrato), nitrato de amônio (tratamento com amônio e nitrato) e o tratamento sem fonte de nitrogênio (S/N). Avaliou-se os metabolismos do nitrogênio e antioxidante, assim como o crescimento. Os resultados mostraram que plantas cultivadas no substrato contendo apenas NO₃⁻ apresentaram maior crescimento em altura e diâmetro. Plantas cultivadas com NO₃⁻ apresentaram maior crescimento em altura da parte aérea e diâmetro. Para número de folhas e comprimento de raiz o tratamento com NH₄⁺ apresentou maiores valores. Clorofila *a* e *b* os maiores teores encontrados foram nos tratamentos NH₄⁺ e NH₄⁺/NO₃⁻. Para carotenoides o menor teor observado foi no tratamento com NO₃⁻. Para teor de nitrogênio total o tratamento com maior teor foi o com NH₄⁺, tanto para folhas, quanto para raízes. A atividade da enzima redutase do nitrato não diferiu em função da fonte nitrogenada, em raízes. Em folhas a maior atividade foi observada no tratamento com NO₃⁻. Em raízes a atividade da enzima GS não diferiu em função da fonte nitrogenada e foi baixa, entretanto nas folhas a atividade foi mais presente e diferiu no tratamento com NH₄⁺/NO₃⁻. A atividade da GDH em folhas foi maior em plantas cultivadas com NH₄⁺, para raízes foram as cultivadas com NO₃⁻. Para GOGAT tanto folhas quanto raízes apresentaram maior atividade com o tratamento de NH₄⁺. Para peroxidação lipídica em folhas o tratamento com NH₄⁺/NO₃⁻ foi o com maior valor e em raízes os tratamentos não diferiram em função da fonte nitrogenadas. O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi maior observado e não diferiram nos tratamentos com NO₃⁻, NH₄⁺/NO₃⁻ e S/N, entretanto em raízes não ocorreram diferenças. A atividade da SOD nas folhas não diferiu em função da fonte nitrogenada, em raízes, foi maior no tratamento S/N. O tratamento S/N aumentou a atividade da APX nas folhas, em raízes a maior atividade se deu no tratamento com NH₄⁺. A atividade da CAT em folhas não diferiu em função da fonte nitrogenada e em raízes a maior atividade foi observada no substrato com NO₃⁻.

Palavras-chave: Assimilação do nitrogênio. Enzimas antioxidantes. *Zea mays*. Mineração.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the impact of different sources of nitrogen on the growth and metabolism of nitrogen and antioxidants in young plants of corn (*Zea mays*) cultivated in substrate containing mining waste. In this way, corn seeds (Cultivar Lavrador) were sown in 1 liter pots with substrate containing mining waste, resulting from the rupture of the Fundão dam (Mariana - MG) and 3:1 sand, respectively. Four treatments were tested with 8 repetitions, varying the nitrogen source in the recommended dose for corn of 100 kg ha⁻¹. The nitrogen sources used were ammonium sulfate (treatment with ammonium), calcium nitrate (treatment with nitrate), ammonium nitrate (treatment with ammonium and nitrate) and treatment without a nitrogen source (S/ N). Nitrogen and antioxidant metabolisms were evaluated, as well as growth. The results showed that plants cultivated in the substrate containing only NO₃⁻ showed greater growth in height and diameter. For number of leaves and root length, the treatment with NH₄⁺ showed higher values. Chlorophyll *a* and *b* the highest levels found were in the NH₄⁺ and NH₄⁺/NO₃⁻ treatments. For carotenoids, the lowest content observed was in the treatment with NO₃⁻. For total nitrogen content, the treatment with the highest content was NH₄⁺, for both leaves and roots. The activity of the nitrate reductase enzyme did not differ according to the nitrogen source, in roots. In leaves the greatest activity was observed in the treatment with NO₃⁻. In roots, the activity of the GS enzyme did not differ due to the nitrogen source and was low, however the activity was more present in the leaves and differed in the treatment with NH₄⁺/NO₃⁻. GDH activity in leaves was higher in plants cultivated with NH₄⁺, for roots were cultivated with NO₃⁻. For GOGAT, both leaves and roots showed greater activity with NH₄⁺ treatment. For lipid peroxidation in leaves the treatment with NH₄⁺/NO₃⁻ were the ones with higher values and in roots the treatments did not differ depending on the nitrogen source. The hydrogen peroxide content was higher observed and did not differ in the treatments with NO₃⁻, NH₄⁺/NO₃⁻ and S/ N, however in roots there were no differences. The SOD activity on the leaves did not differ according to the nitrogen source, in roots, it was higher in the S/ N treatment. The S/ N treatment increased the APX activity in the leaves, in roots the greatest activity occurred in the NH₄⁺ treatment. The activity of CAT in leaves did not differ according to the nitrogen source and in roots the greatest activity was observed in the substrate with NO₃⁻.

Keywords: Nitrogen assimilation. Antioxidant enzymes. *Zea mays*. Mining.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Massa seca de plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.....26
- Figura 2** – Altura da parte aérea (A), diâmetro (B), número de folhas (C) e comprimento de raiz (D), de plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio27
- Figura 3** – Vigésimo dia do experimento executado no Setor de Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras.....29
- Figura 4** – Plantas de milho ao final do experimento (A). Plantas de milho de cada tratamento, NH_4^+ (T1), NO_3^- (T2), $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (T3) e S/ N (T4) posterior a coleta (B).....30
- Figura 5** – Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C) e nitrogênio total (D) em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.....32
- Figura 6** – Atividade das enzimas GS (A), GDH (B), GOGAT (C) e RN (D), em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.....35
- Figura 7** – Peroxidação lipídica (A) e peróxido de hidrogênio (B), em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio 38
- Figura 8** – Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tratamentos e fontes de nitrogênio utilizados no experimento	19
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Mineração: importância e consequências	14
2.2 Nitrogênio para a planta de milho	15
2.3 Metabolismo e assimilação do nitrogênio pelas plantas	16
2.4 Sistema antioxidante	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Condução do experimento	19
3.2 Massa seca e massa fresca	20
3.3 Análise de crescimento	20
3.4 Clorofilas e Carotenoides	20
3.5 Teor de nitrogênio	21
3.6 Avaliação das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em folhas e raízes	21
3.7 Quantificação de peroxidação lipídica	22
3.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio	23
3.9 Enzimas do metabolismo antioxidante	23
3.9.1 Dismutase do superóxido (SOD)	23
3.9.2 Catalase (CAT)	24
3.9.3 Peroxidase do ascorbato (APX)	24
3.10 Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Crescimento e massa seca	25
4.2 Clorofila, carotenoides e teor de nitrogênio	31
4.3 Enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio (GS, GDH, GOGAT e RN)	33
4.4 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio	38
4.5 SOD, CAT e APX	39
5. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

O rompimento da barragem de Fundão foi responsável pelo lançamento de cerca de 50 milhões de m³ de rejeito de mineração de ferro no ambiente (PORTO, 2016). O acidente, classificado pela Defesa Civil como de nível IV (de muito grande porte) e de evolução súbita (devido à violência dos fatores adversos causados), impactou diretamente cerca de 663,2 km de um corpo hídrico que se estende entre os estados de Minas Gerais ao Espírito Santo (IBAMA, 2015). Entre os impactos ambientais causados pela onda de lama de rejeitos, destacam-se a destruição de áreas de preservação permanente e vegetação nativa da Mata Atlântica, a mortandade da biodiversidade aquática e da fauna terrestre; o assoreamento dos cursos d'água, e a perda e fragmentação de habitats (IBAMA, 2015).

A restrição dos serviços ambientais nestes ecossistemas gera impactos socioeconômicos diretos, afetando a qualidade de vida da população das áreas atingidas. Além da vasta área de remanescente de Mata Atlântica, a lama de rejeito de minério foi responsável pela destruição de áreas agrícolas e pastos, levando a perdas consideráveis de receitas econômicas.

Os rejeitos de mineração afetaram também, o solo pela alteração de suas características físicas, químicas e biológicas (pH, teores de matéria orgânica, microorganismos, etc). Em longo prazo, essas mudanças dificultam a reestruturação natural através do recrutamento das espécies ocorrentes nas áreas, podendo resultar no estabelecimento de ecossistemas diferentes dos originais (IBAMA, 2015).

Devido aos altos níveis de elementos traços presentes em áreas mineradas, nem todas as espécies vegetais se desenvolvem nestes substratos, o que dificulta sua revegetação. Um estudo realizado por um grupo independente para a Avaliação de Impacto Ambiental (GIA- Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental, 2015) sobre os resíduos do incidente da barragem do Fundão, verificou que os níveis encontrados de chumbo (Pb), manganês (Mn) e arsênio (As) foram mais elevados do que o recomendado pelos regulamentos brasileiros, porém outros estudos verificaram que os rejeitos não contém vestígios de elementos com concentrações tóxicas, mostrando assim resultados controversos (CRUZ et al., 2020; EMBRAPA, 2015). No trabalho por Hatje et al. (2017), as concentrações de ferro (Fe), mercúrio (Hg), Mn e As após o derrame do rejeito ultrapassou os limites de qualidade para

sedimentos e também com a força do volume de rejeito despejado nos rios os sedimentos podem ter sido agitados e suspensos do fundo dos cursos d'água que contém vestígios de metais de uso histórico que podem ter sido espalhados pelo caminho da lama (SEDRU, 2016; Hatje et al., 2017).

Altos níveis desses elementos no solo podem inibir a mobilização de reservas, ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio, interrupção da osmorregulação celular e degradação das atividades proteolíticas, causando também a inibição da germinação e desenvolvimento de plântulas, afetando o processo fotossintético (ADREES et al. 2015; BARCELO´ e POSCHENRIEDER, 1990; PERFUS-BARBEOCH et al. 2002; KARMOUS et al. 2015; BASZYN´SKI, 2014).

Cruz et al., (2020), mostraram que a adubação com NPK, aumentou a biomassa nas plantas cultivadas no rejeito fertilizado e particularmente, maior concentração de N, constituinte essencial das clorofilas assegurando uma alta atividade de fotossíntese. Com isso sabendo que os macro e micronutrientes são elementos vitais devido ao seu envolvimento em metabolismo, fisiologia e desenvolvimento dos processos nas plantas, são necessárias quantidades adequadas de nutrientes para sustentar o crescimento das plantas.

O milho (*Zea mays*) é uma das principais culturas cultivadas no mundo, pois, além de fornecer produtos largamente utilizados pelo homem e pelos animais, é importante matéria-prima para a indústria, em razão da quantidade e da natureza das reservas acumuladas em seus grãos (Fancelli & Dourado Neto, 2000). Também é um cultura conhecida por apresentar uma demanda elevada por nutrientes, principalmente o N, podendo sua deficiência reduzir o rendimento de grãos, devido a isso sua disponibilidade é importante durante todo o ciclo da cultura e sua aplicação é extremamente necessária para obtenção de altas produtividades (BASTOS et al., 2008; FIDELIS et al., 2007).

Com isso, o presente estudo teve como objetivo verificar o impacto de fontes de nitrogênio no crescimento e metabolismos do nitrogênio e antioxidante em plantas jovens de milho cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mineração: importância e consequências

A mineração é uma importante fonte de renda e suporte financeiro e econômico para o país, por meio do equilíbrio econômico, influência histórica e no PIB nacional e geração de empregos. (IBRAM, 2019). No caso do Brasil, a atividade se torna grande protagonista nesse contexto, em função do potencial do solo nacional, caracterizado por seu diferencial e riqueza. Dessa forma, a mineração é um dos setores básicos da economia brasileira.

A crescente demanda pelo minério de ferro é proporcional ao número de áreas que precisam ser degradadas para que este recurso seja explorado. A exploração pode causar uma série de distúrbios no ambiente, como a grande produção de rejeitos, contaminação da água, remoção da camada superficial do solo, frequente desmatamento/supressão da vegetação nativa, e modificação das paisagens, o que demonstra a grande importância de planos de reabilitação das áreas mineradas (KOPPE, 2007).

A degradação de áreas pela mineração de ferro (Fe) pode modificar todo o ecossistema, seja pela supressão da vegetação ou pelo acúmulo de rejeitos, o que acaba dificultando processos de restauração ecológica. Além disso, o excesso de metais como o Fe nos tecidos, pode causar modificações nos processos fisiológicos dos vegetais, em função da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (BROADLEY et al., 2012; NEVES et al., 2009) e desencadear um déficit nutricional de diversos minerais, uma vez que pode haver competição e consequente diminuição dos teores de nutrientes absorvidos (ZANINE e SANTOS, 2004).

Dentre os fatores abióticos que dificultam o estabelecimento de espécies em áreas alteradas pela mineração, é comum a escassez de nutrientes importantes como nitrogênio (N) e fósforo (P), cuja disponibilidade e absorção são dificultadas pela perda de matéria orgânica (FRANCO et al., 1995). Além disso, nos tecidos vegetais a ação de enzimas importantes pode ser prejudicada, como por exemplo, a nitrato redutase (NR), relacionada ao metabolismo do N e à regulação da incorporação deste nutriente no metabolismo das plantas (PURCINO et al., 1994), incluindo as gramíneas (MENGEL et al., 2001).

2.2 Nitrogênio para a planta de milho

O milho pertence à família *Poaceae*, ao gênero *Zea* e sua espécie única recebe o nome de *Zea mays*. É uma cultura mundialmente importante devido a sua diversidade de utilização, da extensão da área cultivada e de sua elevada capacidade produtiva. É uma cultura exigente em nutrientes, principalmente o nitrogênio (N), pois sua deficiência pode reduzir entre 10% e 22 % o rendimento de grão (SUBEDI et al., 2009).

A absorção do nitrogênio pela planta de milho ocorre durante todo o ciclo vegetativo, sendo pequena nos primeiros 30 dias. Nesta fase, as plantas absorvem menos do que 0,5 kg N ha⁻¹ dia (SCHRODER et al., 2000). Porém, com a deficiência de N nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, o número de óvulos nos primórdios da espiga (SCHREIBER et al., 2000), o crescimento e o desenvolvimento da planta são reduzidos (PIZOLATO NETO et al., 2016). Desta maneira, a adequada disponibilidade de N é importante durante todo o ciclo da cultura e a avaliação da capacidade de absorção e da remobilização do nitrogênio em cada estágio do desenvolvimento da planta fornece dados importantes para a avaliação de sua eficiência na utilização desse nutriente e pode ser utilizada no planejamento de uma agricultura ecológica e economicamente mais eficiente (MORTATE et al., 2018).

Apesar do milho ser classificado no grupo das plantas C4, espera-se uma maior eficiência do uso do N devido a ausência aparente da fotorrespiração e menor investimento do N nas enzimas relacionadas à carboxilação quando comparadas às plantas C3, sendo possível assim, o investimento na produção de novas folhas (SAGE et al., 1987; SAGE, 2004) e também possui ampla adaptação a diferentes condições de ambiente.

O milho atende as características necessárias quanto a produção de grande quantidade de resíduos vegetais que são importantes na reciclagem de nutrientes dando origem a matéria orgânica, que são indicadas por contribuir com o estabelecimento de outras espécies durante o processo de restauração (RESENDE et al., 2013). Segundo Lauer (2016), a palhada do milho também é muito importante como cobertura morta do solo, evitando que os pingos de chuva atinjam diretamente ele desagregando-o e, portanto, tornando-o facilmente transportável pela enxurrada. Além da palha, as raízes, depois de decompostas, também ajudam na formação de canais que mantêm o solo rico e ajudam a conservar os recursos hídricos.

O milho é uma das poucas espécies que fornecem essas substâncias e por isso é muito utilizado na rotação de culturas do plantio direto (ARTUZO et al., 2019).

2.3 Metabolismo e assimilação do nitrogênio pelas plantas

Dentre os elementos minerais essenciais requeridos pelas plantas, o N é o que se necessita em maiores quantidades. Esse macronutriente atua na síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, além de fitormônios, vitaminas e alcaloides os quais realizam papéis essenciais no metabolismo vegetal. Sua escassez pode limitar o crescimento vegetal, sendo os sintomas a clorose gradual das folhas mais velhas, seguida por abscisão e a redução do crescimento da planta (PALLARDY, 2008; LI; WANG; STEWAR, 2013).

O N está disponível no solo em diversas formas, entre elas o NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos, peptídeos solúveis. Porém, NO_3^- e NH_4^+ são as principais fontes minerais de N absorvidas pelas plantas, sendo que a forma de N inorgânico absorvida depende da espécie e das condições do solo (WILLIAMS; MILLER, 2001). Em condições ideais de pH e oxigênio, a forma nítrica é predominante em consequência do processo de nitrificação no qual bactérias promovem a oxidação do NH_4^+ livre (LI et al., 2013). Já em solos anaeróbicos, com baixo pH, baixa temperatura, ou com acúmulo de compostos fenólicos alelopáticos que inibem o processo de nitrificação, a forma amoniacal pode se tornar mais abundante (MILLER; CRAMER, 2005).

O NO_3^- absorvido pelas plantas pode ser assimilado nas raízes, na parte aérea, ou em ambos os locais (FORDE, 2002), porém primeiramente o NO_3^- precisa ser reduzido a NH_4^+ . Essa redução é catalisada por enzimas em duas etapas: a primeira ocorre no citosol através da enzima redutase do nitrato (RN) que transforma NO_3^- em nitrito (NO_2^-) e a segunda ocorre nos cloroplastos (parte aérea) e plastídios (raízes), através da redutase do nitrito (RNi) que converte NO_2^- a NH_4^+ (LI et al., 2013). O NH_4^+ produzido é, então, assimilado pelas enzimas glutamina sintetase (GS), que requer ATP na reação que adiciona NH_4^+ ao glutamato formando glutamina, posteriormente, a glutamato sintase (GOGAT) transfere um N amídico da glutamina ao 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de glutamato (ciclo GS/GOGAT) (LEA; MIFLIN, 2011).

Quando NO_3^- e NH_4^+ são disponibilizados às plantas em quantidades iguais, o NH_4^+ é absorvido mais rapidamente do que o NO_3^- . Essa preferência pelo NH_4^+ , pode ser explicada através da energia extra que a planta gastaria para reduzir o NO_3^- a NH_4^+ antes de sua incorporação em componentes orgânicos (BLOOM et al., 1992).

A assimilação do N pode ocorrer nas raízes ou na parte aérea, dependendo da espécie vegetal e das condições ambientais. Para assimilação na parte aérea, é necessário o transporte do N para as folhas, o qual ocorre via xilema, embora a redistribuição das folhas para outros órgãos ocorra predominantemente na forma de aminoácidos, via floema (PATE et al., 1981). Essa redistribuição é fundamental para o suprimento dos tecidos que não participam na assimilação de N.

Quando a assimilação do N ocorre nas raízes, aminoácidos são transportados para as folhas maduras via fluxo transpiratório pelo xilema (MARSCHNER et al., 1997). Além de poder ser transportado através da membrana plasmática de certas células, em outras formas tais como peptídeos menores (STEINER et al., 1994), bases purinas e pirimidinas e seus derivados (GILLISSEN et al., 2000). Com isso, a análise de compostos nitrogenados na seiva do xilema pode indicar como a planta está assimilando e transportando o N. O N transportado pelo xilema pode não ser exclusivamente de origem radicular, pois as reservas de N podem ser remobilizadas. Geralmente, no xilema, são transportados NO_3^- , as amidas, aminoácidos ácidos e traços de NH_4^+ .

Apesar de existir trabalhos de conhecimento sobre as formas de absorção, assimilação e transporte do N na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas (LEMOS et al., 1999), o estudo ainda é escasso sobre esse assunto em distintas condições ambientais, como por exemplo, em rejeito de mineração.

2.4 Sistema antioxidante

As plantas estão expostas a uma grande variedade de estresses ambientais, como aqueles associados às mudanças de temperatura, seca, níveis de luz, sanidade, hipoxia, metais pesados e deficiência de nutrientes minerais.

A exposição das plantas a condições ambientais desfavoráveis, incluindo a deficiência de nutrientes, como por exemplo o nitrogênio e também as diferentes concentrações deste nutriente

nas plantas, induz a um estado de estresse que pode ativar várias vias metabólicas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente durante os processos oxidativos biológicos, mas seus efeitos são incrementados sob condições estressantes em diversos sítios intracelulares como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). As EROs como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio são geradas durante processos metabólicos.

Os radicais O_2^- e OH^\cdot possuem baixa mobilidade pela membrana celular e curto tempo de meia-vida, o que implica em elevada capacidade de reação e especificidade de sinalização dessas EROs. O peróxido de hidrogênio uma espécie não radical, possui capacidade de cruzar as membranas sinalizadoras do estresse oxidativo (BLOKHINA, FAGERSTEDT, 2010). Os radicais OH^\cdot , que podem ser formados a partir de O_2^- ou H_2O_2 , são os mais reativos, sendo também considerados os iniciadores da peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993).

O estresse oxidativo resultante da produção contínua de EROs durante os processos metabólicos normais ou em condições de estresse levou ao desenvolvimento de um complexo sistema antioxidante (ALI et al., 2008). O sistema antioxidante é capaz de retardar ou inibir o aparecimento e a progressão da oxidação, bloqueando a formação de radicais livres ou interagindo com estes, tornando-os inativos. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e as peroxidases (APX) (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A SOD catalisa a dismutação dos íons superóxido, formando H_2O_2 e é a primeira enzima do sistema antioxidante e pode ser vista como protetora contra os danos oxidativos causados pelos radicais O_2^- (SCANDALIOS, 1993), pois está presente em todos os compartimentos celulares suscetíveis ao estresse oxidativo (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). A CAT transforma o H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A APX está presente em cloroplastos e mitocôndrias, ou ainda no citosol e nos peroxissomos, apresentando alta afinidade pelo substrato (WILLEKENS et al., 1995), é a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, que tem como substrato H_2O_2 , formando água como produto final. O ascorbato é utilizado como cofator enzimático, resultando na formação de dehidroascorbato o qual é reciclado a ascorbato, sendo a glutatona reduzida (GSH) e doadora de elétrons, de forma que a glutatona oxidada (GSSG) seja convertida pela glutatona redutase (GR) dependente de NADPH (ASADA; TAKAHASHI,

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, Minas Gerais, entre os meses de agosto e setembro de 2020.

Primeiramente sementes de milho (*Zea mays*), cultivar Lavrador foram selecionadas e semeadas em recipientes plásticos com capacidade para 1 litro contendo o rejeito de mineração coletado em 2019 em Rio Doce, Mariana – Minas Gerais, no qual a Fundação Renova já havia realizado uma adubação, e areia, com proporção 3:1, respectivamente. Foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio em cada tratamento (Tabela 1), sendo 4 tratamentos, 8 repetições por tratamento e 4 plantas em cada recipiente plástico de 1L. A dose recomendada de nitrogênio para milho são 100 kg ha⁻¹, sendo assim, as contas das quantidades de nitrogênio para cada tratamento foram realizadas com base no tamanho dos recipientes plásticos de 1L. As diferentes fontes de nitrogênio foram misturadas junto ao rejeito e a areia de acordo com o tratamento.

Tabela 1 – Tratamentos e fontes de nitrogênio utilizados.

Tratamentos	Fontes de nitrogênio
T1 - Amônio (NH ₄ ⁺)	Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄
T2 - Nitrato (NO ₃ ⁻)	Nitrato de cálcio Ca(NO ₃) ₂
T3 - Amônio/nitrato (NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻)	Nitrato de amônio (NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻)
T4 - Sem fonte de nitrogênio (S/ N)	-

Fonte: Do autor (2020).

As plantas foram irrigadas uma vez por dia até próximo a capacidade de campo, durante 30 dias. Após esses 30 dias de cultivo nos tratamentos, em setembro de 2020 foram feitas as avaliações necessárias e a coleta do material para as análises bioquímicas.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC, sendo 1 cultivar,

totalizando 4 tratamentos, com 8 repetições cada).

20

3.2 Massa seca e massa fresca

Antes da secagem do material vegetal, foram retiradas amostras de matéria fresca para análise de clorofila e bioquímica. A massa seca de folhas e raízes foram obtidas por meio de amostras secas em estufa de ventilação forçada a 70° C durante 72 horas. Após esse tempo, ambas foram pesadas em balança e seus valores anotados até peso constante.

As avaliações bioquímicas foram realizadas em folhas e raízes. Em seguida da coleta, os materiais foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

Das 8 repetições por tratamento, 4 repetições foram utilizadas para matéria seca e 4 repetições para matéria fresca, sendo 4 plantas em cada repetição.

3.3 Análise de crescimento

Após o final do experimento, no momento da coleta as plantas foram retiradas dos recipientes plásticos, suas raízes lavadas em água corrente e secas em papel toalha absorvente. Foram medidas altura da parte aérea, comprimento da raiz, diâmetro do caule e número de folhas de cada planta.

3.4 Clorofilas e Carotenoides

Para a determinação dos teores de clorofilas, foram macerados 0,1 g de tecido foliar fresco de cada tratamento em acetona 80%. O volume final foi completado para 10 ml, sendo realizadas as leituras espectrofotométricas a 647 e 663 nm, conforme metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os cálculos de μg de clorofila/g e μg carotenoides/g de matéria fresca foliar, seguiram as equações:

Clorofila a: $12.25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$;

Clorofila b: $21.50 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2}$.

3.5 Teor de nitrogênio

Os teores de N total foram determinados pelo método de Kjeldahl. A mistura digestora foi composta por 175 mL de água destilada, 5,47 g de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 21,39 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 200 mL de H_2SO_4 , sendo este último acrescentado cuidadosamente após a diluição dos outros reagentes. Para realizar a digestão foi pesado 0,1 g de amostra de folhas e raízes moídas para balão de Kjeldahl e adicionado 7 mL da mistura digestora e posteriormente levados para bloco digestor e submetido à temperatura de 350°C partindo-se da temperatura ambiente e aumentando-se 50°C a cada 30 minutos. Permaneceu assim até completar a digestão caracterizada pela obtenção de um líquido incolor ou levemente esverdeado. Posteriormente, foi realizada a destilação adicionando NaOH 13N e a titulação com HCl 0,07143N até mudança de cor (coloração verde para rosa). O volume gasto de ácido foi anotado para os cálculos de teores de N total. (FEEMA, 1983).

3.6 Avaliação das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em folhas e raízes

Os extratos enzimáticos para a determinação da atividade da GS, GOGAT, GDH e RN foram obtidos a partir da maceração de 1 g de folha e raiz de matéria fresca em nitrogênio líquido, adicionando-se 5 mL de tampão de extração contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), PMSF 1 mM, EDTA 100 mM, 10% PVPP e DTT 2 mM. O extrato foi centrifugado a 16.000 g por 20 minutos a 4 °C.

A atividade da RN foi avaliada, *in vitro*, como proposto por Berger e Harrison (1995) com modificações. Foram pipetados 14 µL de amostra, em triplicatas, na placa de Elisa-UV. Posteriormente foi adicionado o tampão de incubação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e KNO_3 , a mistura foi incubada a 30°C por 3 minutos. Após a incubação foi adicionado β - NADH para disparar a reação. A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 340 nm, a cada 1 minuto, por 10 minutos, ocorrendo decréscimo na absorbância pela oxidação do NADH.

A atividade da GS foi avaliada como proposto por Ratajczack et al. (1981). Foi realizada tomando-se uma alíquota de 300 μ L do extrato bruto, adicionou-se 700 μ L de um meio reacional composto por tris-HCl 500 mM, pH 7,5; mercaptoetanol 100 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 400 mM; NH_2OHCl 100 mM; glutamato monossódico 500 mM e ATP 100 mM. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução composta de $FeCl_3$ 1,2M, HCl 1,7 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,7 mM. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 16.000 g, a 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi pipetado na placa e a leitura realizada a 540 nm para a quantificação do quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) produzido pela reação.

A GOGAT foi determinada pelo método de Pimenta et al.(1989) com modificações, adicionando junto as alíquotas das amostras, tampão de incubação composto por tris-HCL 100 mM, pH 7,8; 2- oxoglutarato 135 mM e L-glutamina 135 mM. A mistura foi incubada a 35°C por 5 minutos, posteriormente foi adicionado β -NADH 3,6 mM para disparar a reação e imediatamente foi realizada a leitura a 340 nm, de 1 em 1 minuto, durante 10 minutos.

A atividade da GDH foi pipetando junto da alíquota das amostras, tampão de incubação composto por Tris-HCl, pH 7,8 200 mM, 2-oxoglutarato 90 mM, $CaCl_2$ 36 mM e $(NH_4)_2SO_4$ 900 mM (GROAT e VANCE, 1981). A mistura foi incubada a 30°C por 3 minutos. Após esse tempo foi adicionado β -NADH 3,6 mM para disparar a reação. Assim como a GOGAT, imediatamente após adicionar o β -NADH foi realizada a leitura a 340 nm, de 1 em 1 minuto, durante 10 minutos.

3.7 Quantificação de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método TBARS (ácido tiobarbitúrico) conforme descrito por Buege e Aust (1978). 300 mg de folhas e de raízes frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Posteriormente foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado. A reação foi realizada com 125 μ L de alíquota do sobrenadante e pipetado em um eppendorf contendo 250 μ L do seguinte meio de reação TBA 0,5% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 10%, levando a banho- maria a 95°C por 30 minutos. A estimativa da

peroxidação lipídica foi medida a partir da leitura espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm para contabilização de interferentes.

3.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram quantificados pelo método de Velikova et al. (2000). 300 mg de folhas e de raízes frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. As amostras foram centrifugadas e a reação realizada com tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10mM, pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) a 1M. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro com leitura da absorbância à 390 nm e os níveis de H_2O_2 quantificados por meio de curva padrão.

3.9 Enzimas do metabolismo antioxidante

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material fresco de folhas e raízes, as quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375 μ L de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15 μ L de EDTA 10 mM, 75 μ L de ácido ascórbico 200 mM, e 1035 μ L de água. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a - 20° C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

3.9.1 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 μ L de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, 40 μ L de metionina 70 mM, 3 μ L de EDTA 10 μ M, 15 μ L de NBT 1 mM, 2 μ L de riboflavina 0,2 mM e 31 μ L de água. Os tubos com o meio de reação e 10 μ L de amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma

lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado.

As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.9.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada, segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 5 μL do extrato enzimático foi adicionada a 180 μL do meio de incubação, contendo 90 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9 μL de peróxido de hidrogênio 250 mM e 72 μL de água, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância, a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.9.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 3 μL do extrato enzimático 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, 9 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 63 μL de água (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P \geq 0,05$) e os dados considerados dentro da normalidade foram submetidos a análise de variância e teste de médias por Scott-Knott (1974) ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa

estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011).

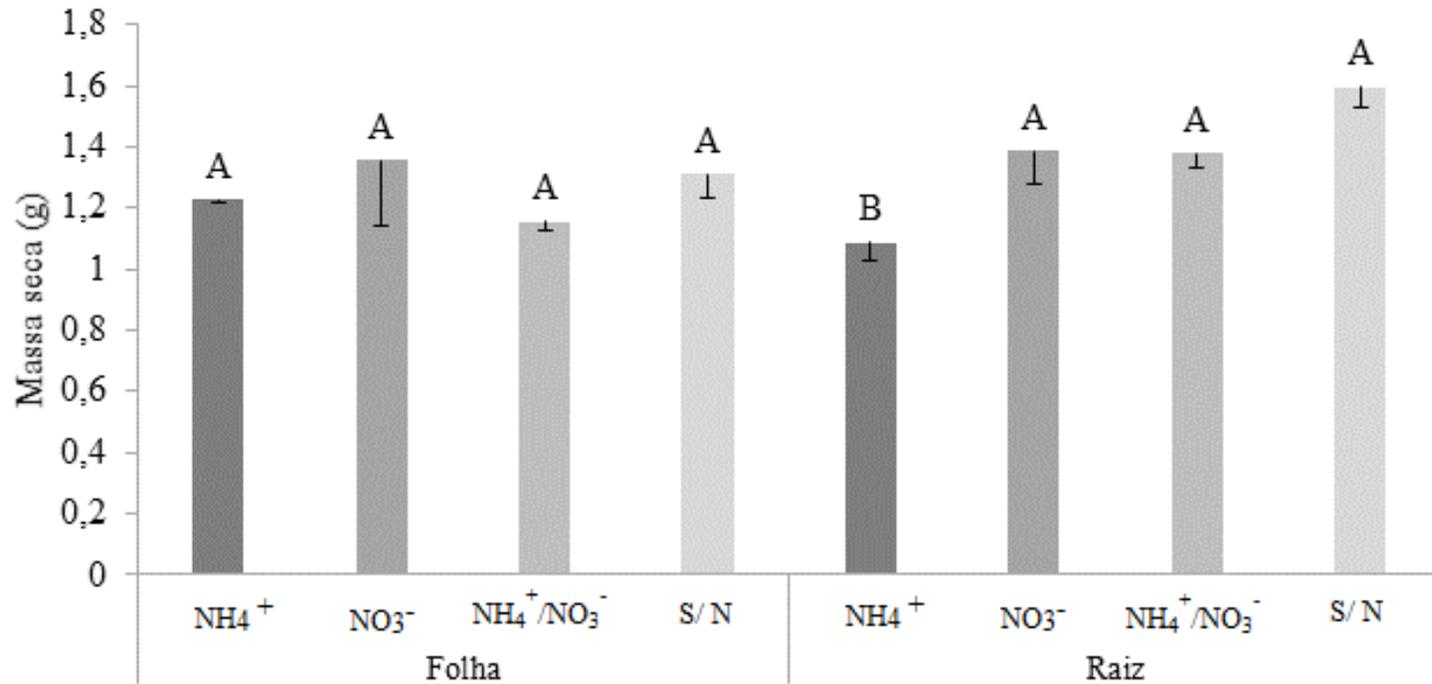
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento e massa seca

Massa seca não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em folha. Para raiz foi observado diferença significativa apenas no tratamento NH_4^+ , quando comparado aos demais, sendo esse o de menor fitomassa (Figura 1).

Para crescimento, o tratamento NO_3^- apresentou estatisticamente os maiores valores de altura de parte aérea e diâmetro do caule (10 cm e 5 mm respectivamente) (Figura 2A e 2B). Os tratamentos NH_4^+ e NO_3^- não apresentaram diferença significativa entre si para número de folhas (5,7 e 5,6 respectivamente) (Figura 2C), mas apresentaram valores estatisticamente maiores do que $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/N. O tratamento NH_4^+ mostrou maiores valores de comprimento de raiz, (27,5 cm) (Figura 2D), seguido por NO_3^- e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (20 cm para ambos) e por último S/N (15 cm).

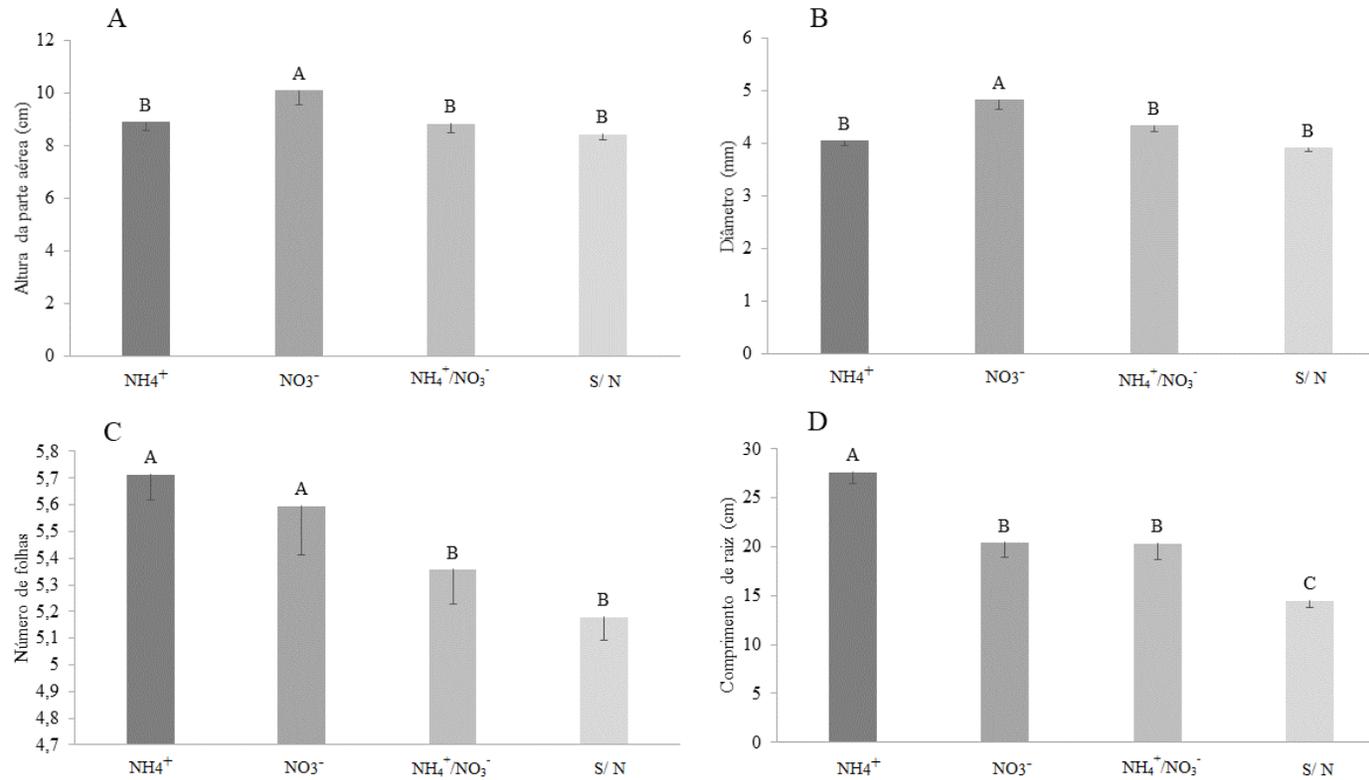
Figura 1 – Massa seca de plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH₄⁺, NO₃⁻, NH₄⁺/NO₃⁻ e S/ N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

Figura 2 – Altura da parte aérea (A), diâmetro (B), número de folhas (C) e comprimento de raiz (D), de plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/ N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

O uso do N absorvido pode variar dependendo da proporção $\text{NO}_3^- \times \text{NH}_4^+$ no meio de cultivo, porém apesar da alta demanda energética para a utilização do nitrato, o crescimento das plantas é melhor quando supridas com nitrato e não amônio, evidenciado no tratamento com NO_3^- para parte aérea e diâmetro do caule (Figura 2A e 2B).

EGHBALL & MARANVILLE (1993) observaram que, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, a deficiência de nitrogênio aumentou o comprimento e a massa seca do sistema radicular de alguns genótipos de milho, assim como observado no presente trabalho (Figura 1). Para esses autores, sistemas radiculares mais volumosos, associados à deficiência de nitrogênio, podem possibilitar maior exploração de camadas mais profundas do solo e extrair maiores quantidades de nitrogênio. Os mecanismos relacionados a esse crescimento diferencial do sistema radicular, sob concentração variada de nitrogênio, não estão totalmente esclarecidos, mas existe a possibilidade de que fatores hormonais e a partição de carbono e nitrogênio entre a raiz e a parte aérea possam estar envolvidos (Van der WERF & NAGEL, 1996).

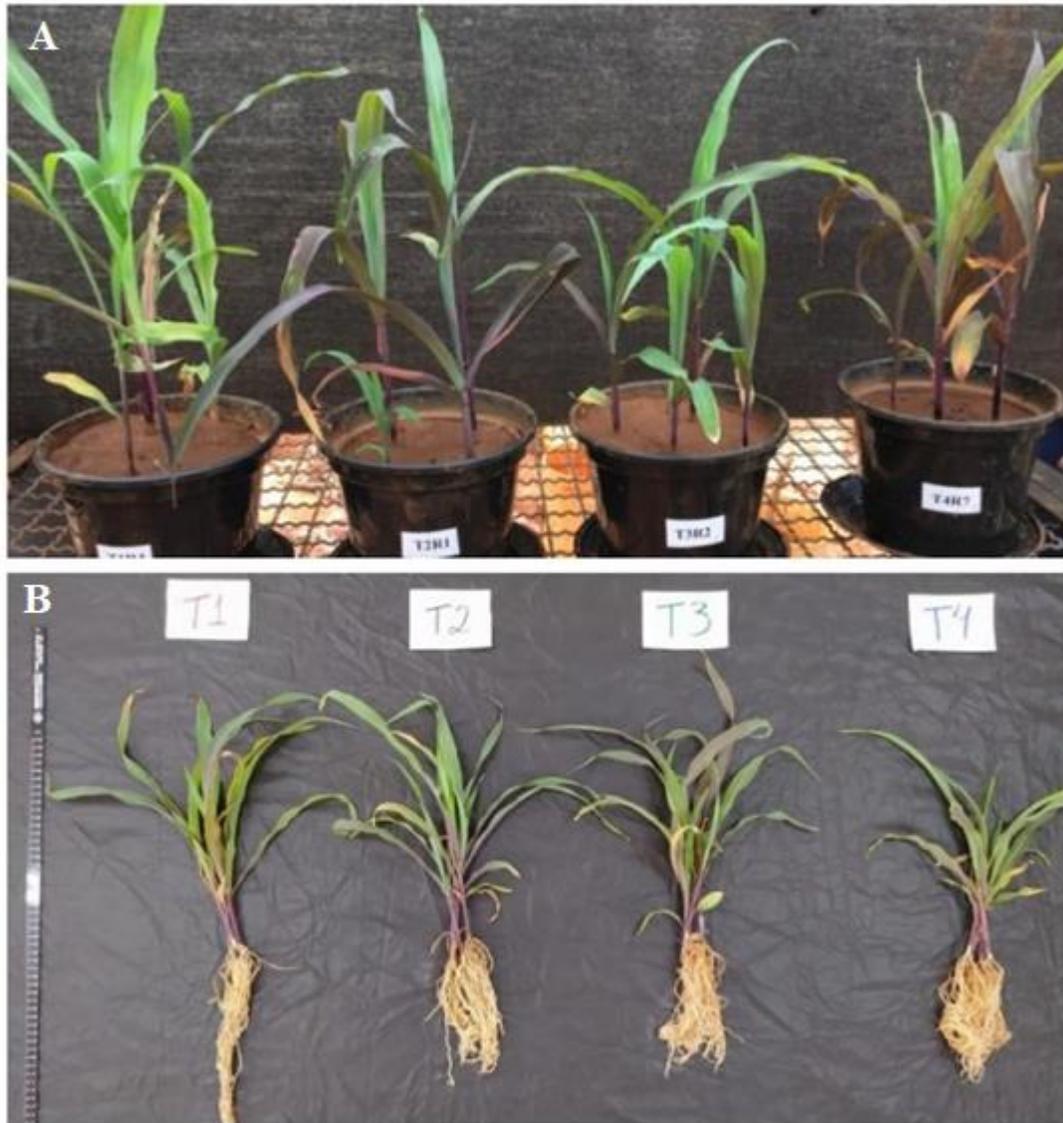
Para número de folhas e comprimento de raiz (Figura 2C e 2D), o tratamento S/ N foi o de menor valor, sendo de conhecimento que plantas cultivadas sob deficiência de N podem não expressar seu potencial produtivo, pois sob tais condições podem ocorrer reduções na taxa de formação e expansão foliar. Também para os dois parâmetros o tratamento NH_4^+ foi o que apresentaram maiores valores evidenciando o fato de que, algumas espécies tendem a absorver o nitrato mais rapidamente do que o amônio, enquanto outras agem justamente ao contrário, preferindo absorver o amônio (CRUZ et al., 2004b).

Figura 3 - Vigésimo dia do experimento executado no Setor de Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Lavras.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 4 – Plantas de milho ao final do experimento (A). Plantas de milho de cada tratamento, ³⁰
 NH_4^+ (T1), NO_3^- (T2), $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (T3) e S/ N (T4) posterior a coleta (B).



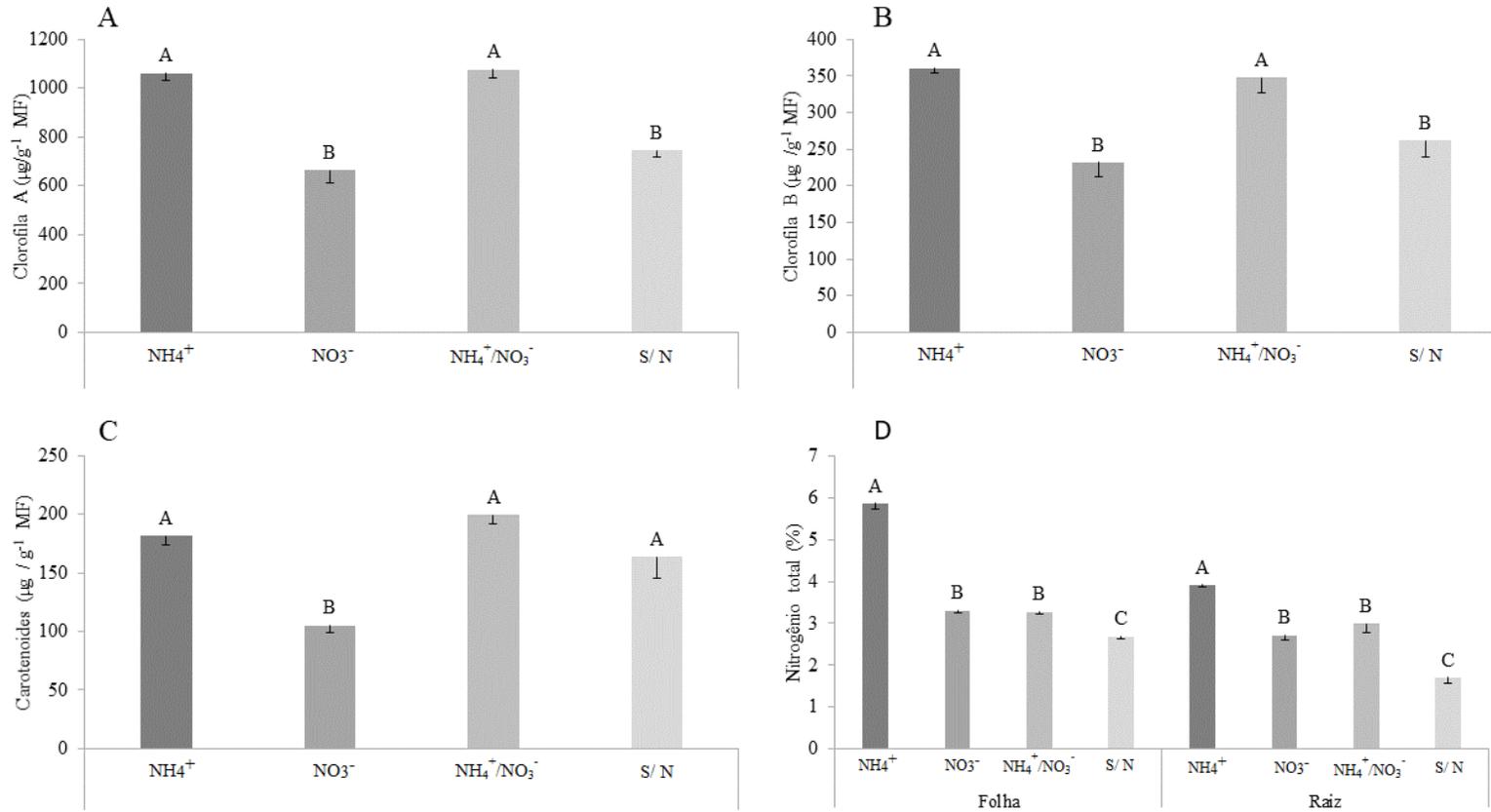
Fonte: Do autor (2020).

4.2 Clorofila, carotenoides e teor de nitrogênio

Os teores de clorofila "a" e "b" apresentaram alterações em resposta ao substrato com diferentes tipos de adubação nitrogenada, contaminado com rejeito de mineração. Para o teor de clorofila "a" (Figura 5A) foi possível observar uma diferença significativa entre os tratamentos NH_4^+ e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ dos tratamentos NO_3^- e S/ N, sendo os maiores teores observados nos tratamentos NH_4^+ e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Também foram observados as mesmas diferenças significativas nos tratamentos para clorofila "b" (Figura 5B). Para carotenoides (Figura 5C), ocorreu diferença significativa apenas no tratamento NO_3^- , onde se observou uma menor concentração de carotenoides.

Para teor de nitrogênio, em folhas e raízes, todos os tratamentos tiveram diferença significativa, porém em ambos, os tratamentos NO_3^- e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 5D).

Figura 5 – Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoides (C) e nitrogênio total (D) em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH₄⁺, NO₃⁻, NH₄⁺/NO₃⁻ e S/N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

O N é um dos nutrientes requeridos em maior quantidade pelo milho, estando diretamente relacionado aos teores de clorofila na folha. A concentração de clorofila das folhas se relaciona positivamente com a concentração foliar de N uma vez que 70% do N contido nas folhas estão nos cloroplastos que participam da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila, enzimas e proteínas envolvidas na assimilação do carbono e influenciam o desenvolvimento e a produção das culturas (SOUSA et al., 2016), então quanto maior a disponibilidade de N para a planta maior é a disponibilidade para a síntese de biomoléculas nitrogenadas. De acordo com Lopes et al. (2012) quanto maior o teor de N na folha do milho (Figura 5D) maior o teor de clorofila (Figura 5A e 5B) e síntese, estando de acordo com os dados que foram apresentados neste trabalho.

A produção de carotenoides está ligada a mecanismos de proteção do aparato fotossintético, prevenindo a fotoinibição sob condições de estresse. Também atuam na dissipação do estado excitado da clorofila e neutralização de espécies reativas de oxigênio, uma vez que são antioxidantes de baixo peso molecular (KRESLAVSKI et al., 2013). Plantas estressadas realizam a síntese de novo da zeaxantina, um tipo de carotenoide, com o objetivo de prevenir a fotoinibição (YOUNG, 1991). Uma vez que há clorose nas folhas, então está ocorrendo o acúmulo de antocianinas devido possivelmente a deficiência de N, e também o fato do conteúdo de clorofilas A e B (Figura 5A e 5B) serem semelhantes entre os tratamentos, pode ser explicado pelo teor de carotenoide (Figura 5C).

4.3 Enzimas envolvidas na assimilação do nitrogênio (GS, GDH, GOGAT e RN)

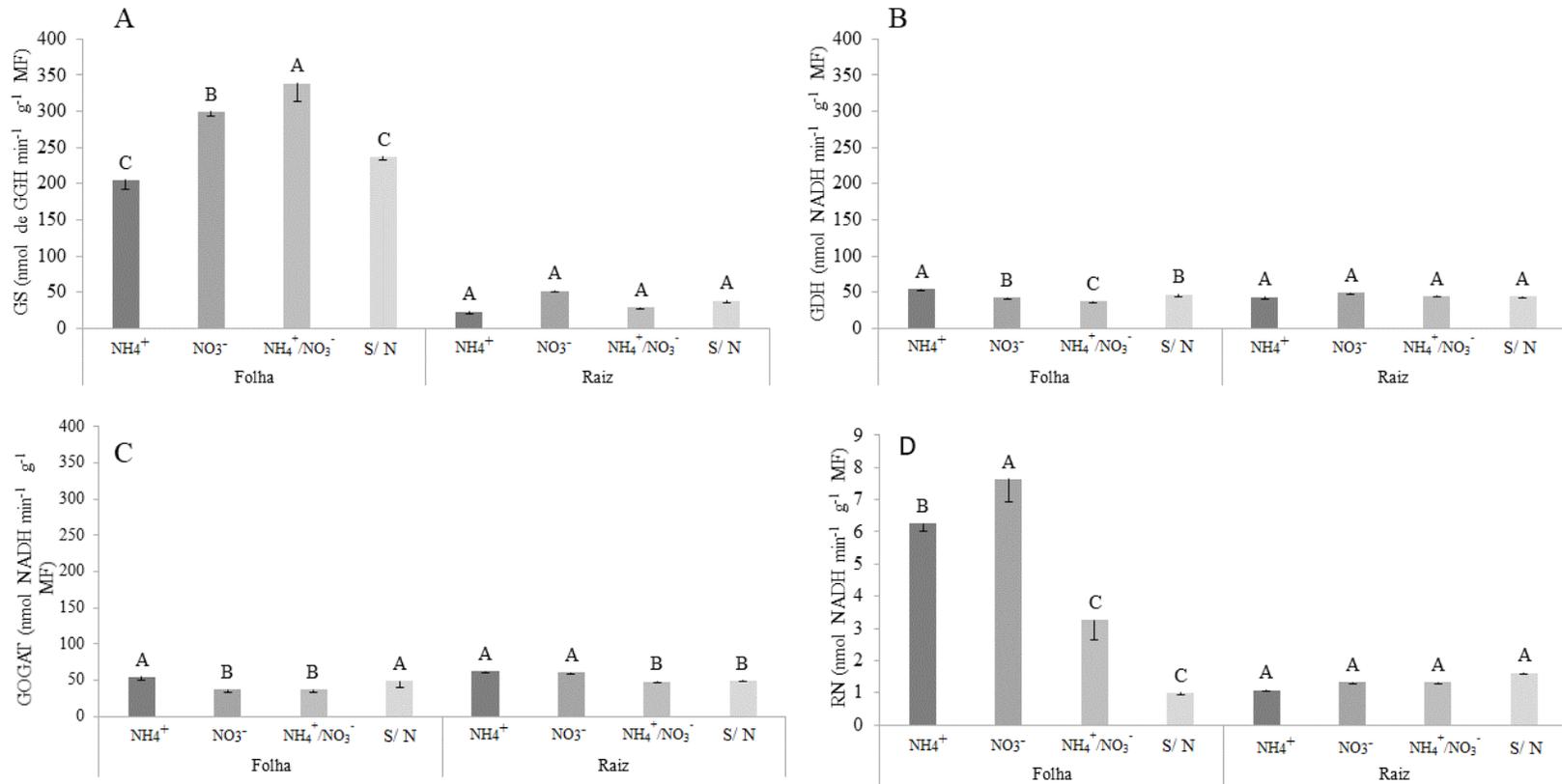
Para GS, em folha foi observado diferença significativa em todos os tratamentos, já em raiz não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos sendo que em folha a atividade da GS foi mais presente (Figura 6A).

Quanto atividade da enzima GDH em folha, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo o tratamento com amônio o de maior atividade da enzima GDH, porém NO_3^- e S/ N não diferiram entre si. Já em raiz não ocorreu diferença significativa em nenhum tratamento (Figura 6B).

Para GOGAT, tanto em folha quanto em raiz foi observado diferença significativa entre os tratamentos, porém em folhas, os tratamentos NH_4^+ e S/N não tiveram diferença entre si mas foram os que obtiveram os maiores valores de atividade enzimática da GOGAT, e os tratamentos NO_3^- e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ também não diferiram entre si. Já em raiz os tratamentos que não diferiram entre si foram NH_4^+ e o tratamento NO_3^- , sendo esses os com maior atividade da enzima (Figura 6C).

Para atividade da redutase do nitrato, em folha ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, sendo a maior atividade encontrada em NH_4^+ e NO_3^- , porém $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/N não diferiram entre si. Em raiz não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 6D).

Figura 6 – Atividade das enzimas GS (A), GDH (B), GOGAT (C) e RN (D), em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

O efeito do nitrogênio sobre a atividade da GS já foi observado em várias culturas, tais como feijão, ervilha e soja (HOELZLE et al., 1992), porém resultados com milho são divergentes, Watanabe et al. (1985) observaram um aumento significativo na atividade da GS em folhas, em função da aplicação de nitrato, assim como foram observados no presente trabalho (Figura 6A), o tratamento com NO_3^- e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, foram os que obtiveram a maior atividade da enzima GS, estando associada a assimilação primária de N (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2006).

A aplicação de nitrato ao substrato aumentou a atividade da GS e GOGAT (Figura 6) em raízes também. O aumento semelhante da atividade das duas enzimas mostra que elas atuam de forma coordenada na rota de assimilação do NH_4^+ denominada GS/GOGAT (LEA & MINFLIN, 1974). Watanabe et al. (1985) também observaram que, em milho, para folhas o aumento na concentração de NO_3^- , no meio de cultivo, aumentou a sua atividade, quando a massa fresca foi a base de expressão. No entanto, PURCINO et al. (1998) verificaram que o aumento na disponibilidade de NO_3^- tanto pode aumentar quanto reduzir a atividade da GS de alguns genótipos de milho. Em seringueira, a aplicação tanto do NO_3^- quanto do NH_4^+ no meio de cultivo pode induzir aumentos na atividade da GS em folhas, muito embora o NH_4^+ tivesse sido significativamente mais efetivo (LEMOS, 1996).

Embora existam citações mostrando que o NO_3^- possa diminuir ou não apresentar nenhum efeito sobre a atividade da GDH, a possibilidade maior é que, em trabalhos de longa duração, o NO_3^- estimule a atividade dessa enzima (SRIVASTAVA & SINGH, 1987), conforme aqui observado, em raiz (Figura 6B). No entanto, o efeito positivo do NO_3^- sobre a GDH-NADH parece ser indireto, via produtos de sua redução. Por exemplo, PEETERS & van LAERE (1992) verificaram que a inclusão de NH_4^+ no meio de incubação promoveu um aumento na atividade da GDH maior do que quando se usou o NO_3^- como única fonte de nitrogênio, observado em folha no presente trabalho. O aumento da atividade da GDH, quando se aumenta a proporção de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva, também mostra que o NH_4^+ e não o NO_3^- seja mais efetivo em induzir a atividade da GDH (ZORNOZA & GONZALEZ, 1998).

Em relação a GOGAT, em raízes apresentaram, para todos os tratamentos, aumento na atividade enzimática (Figura 6C) com valores semelhantes entre as plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato, maiores que os valores para o tratamento sem nitrogênio. A comparação

das atividades enzimáticas obtidas para GS com as obtidas para GOGAT mostra que a transaminação é inferior à síntese de glutamina, o que indica que a glutamina sintetizada pode ser translocada para os tecidos foliares para a transaminação. Ainda em relação a GOGAT, DELÚ-FILHO (1994) mostrou que a nutrição nítrica promoveu aumentos na sua atividade em folhas. Em milho, a expressão do gene para a GOGAT-Fd e GOGAT-NADH foi aumentada em resposta à aplicação de NO_3^- (SAKAKIBARA et al., 1997) e, quando plantas de cevada foram cultivadas continuamente com NO_3^- o mRNA, os níveis da proteína e a atividade da GOGAT-Fd tiveram aumentos consideráveis (PAJUELO et al., 1997). Esses resultados são semelhantes ao efeito positivo do nitrato sobre a atividade da GOGAT em raiz, encontrado no presente trabalho.

As plantas cultivadas sob o tratamento com NO_3^- apresentaram a maior atividade da RN em folhas (Figura 6D). Esse efeito positivo do nitrato sobre a atividade da RN também foi encontrado em folhas de braquiária (FERNANDES et al., 1976) e seringueira (DELÚ-FILHO, 1994). Para CRAWFORD et al. (1992), o NO_3^- pode ser considerado como o sinal primário para a indução da atividade da RN, visto que ele, além de propiciar aumentos nos níveis do mRNA da proteína, também estimularia a sua atividade. Adicionalmente, o NO_3^- também pode colaborar para a redução da atividade de proteases e prevenir a degradação da RN (GALANGAU et al., 1988).

Entretanto o efeito do aumento da atividade da RN sob o tratamento com NO_3^- leva também um aumento na concentração de NH_4^+ celular, conseqüentemente aumentando a atividade da GS, GOGAT-Fd e GDH-NADH e também podendo aumentar a assimilação e reassimilação do NH_4^+ e evitar o acúmulo desse íon, em níveis tóxicos. Esses resultados também concordam com os dados obtidos por EDWARDS & CORUZZI (1989), que mostraram haver uma relação positiva entre o aumento do processo fotorrespiratório (principal formador de NH_4^+ foliar) e a acumulação do mRNA da GS.

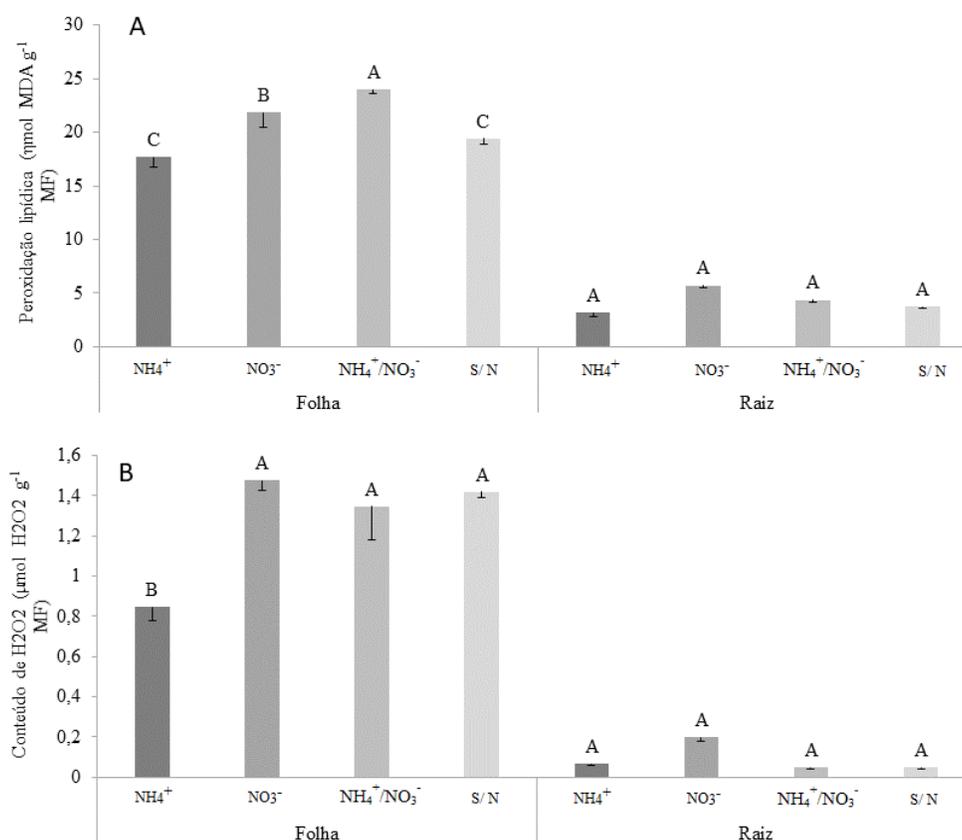
Com base em todos os dados e informações, não deve ser desconsiderados a necessidade de estudos complementares envolvendo a quantificação dos nutrientes minerais, especialmente do rejeito, e também utilizar as formas de transporte de nitrogênio no xilema e floema e seus envoltórios com os processos fisiológicos específicos, tanto na folha como na raiz.

4.4 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio

Peroxidação lipídica em folha foi observada diferença significativa entre os tratamentos, com NH_4^+ e S/ N não diferindo significativamente entre si e sendo esses os de menores valores, o maior valor de peroxidação foi encontrado no tratamento S/ N. Em raiz não foi observada diferença estatística entre os tratamentos, sendo assim em folha onde apresentou uma maior atividade da enzima (Figura 7A).

Para peróxido de hidrogênio, em folhas, o tratamento NH_4^+ foi o único que apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo esse, o de menor atividade do peróxido de hidrogênio. Já em raiz não foi observada essa diferença em nenhum tratamento (Figura 7B).

Figura 7 – Peroxidação lipídica (A) e peróxido de hidrogênio (B), em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH_4^+ , NO_3^- , $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

Rutschow, Baskin e Kramer (2011) sugerem que baixas concentrações de H_2O_2 geram um suave sinal de estresse que pode aliviar o estresse mais intenso e quando em elevadas concentrações vai produzir uma forte mensagem de estresse, podendo ser observada nos tratamentos NO_3^- , $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/N em folha (Figura 7B). Quando peróxido de hidrogênio está em menor atividade, conseqüentemente menor a atividade da peroxidação lipídica, observada em raiz (Figura 7A e 7B).

Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes, porém, em condições estressantes há um rompimento do equilíbrio celular, provocando um aumento na produção dessas espécies. Embora esse aumento possa ser uma ameaça as células, essas espécies podem também atuar como sinalizadoras para a ativação da resposta ao estresse e vias de defesa do vegetal (MITTLER, 2011).

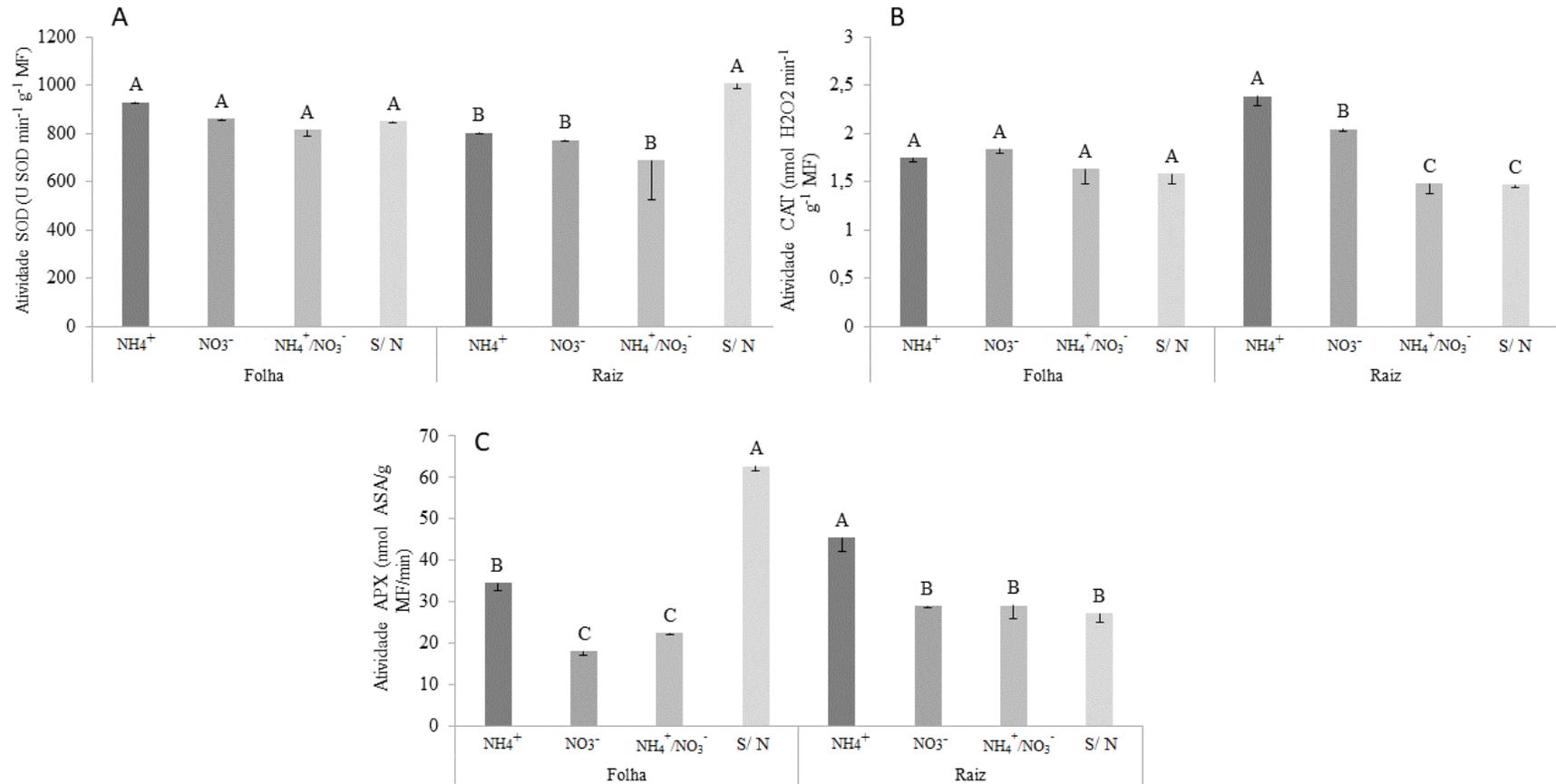
4.5 SOD, CAT e APX

A atividade da enzima SOD não obteve grandes diferenças nos tratamentos. Em folha não se observou diferença significativa entre os tratamentos, já em raiz apenas o tratamento S/N apresentou diferença significativa e foi o tratamento com maior atividade da SOD (Figura 8A).

Quanto a atividade da enzima catalase, em folha não foi observada diferença estatística entre os tratamentos, em raiz ocorreu diferença, porém os tratamentos NO_3^- e S/N não apresentaram diferença significativa entre si, a maior atividade da enzima foi verificada em NH_4^+ (Figura 8B).

Para a enzima APX, em folha ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, porém NO_3^- e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ não diferiram entre si, sendo a maior atividade no tratamento S/N. Em raiz apenas o tratamento NH_4^+ obteve diferença significativa (Figura 8C).

Figura 8 – Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) em plantas de milho (*Zea mays*), cultivadas em substrato contendo rejeito de mineração e areia, utilizando diferentes fontes de nitrogênio.



Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos de folhas e raízes (NH₄⁺, NO₃⁻, NH₄⁺/NO₃⁻ e S/ N). Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições.

Fonte: Do autor (2020).

Os processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e parede celular podem direcionar para reações em cadeia gerando EROs, que causam o estresse oxidativo (PANDA; KHAN, 2009). A disponibilidade de nitrogênio para as plantas intensifica esse estresse em diversas espécies vegetais sendo potencialmente prejudicial às células da planta (JALEEL et al., 2009), uma vez que o acúmulo de EROs leva a uma cascata de eventos que se inicia com a peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (PANDA; KHAN, 2009). Em contrapartida, como uma estratégia de proteção, as plantas amplificam seu sistema de defesa composto por enzimas tais como SOD, CAT e APX que detoxificam as células (JALEEL et al., 2009). Neste experimento a SOD não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, sugerindo que foi igualmente ativada em todos eles (Figura 8A).

Em relação a CAT, todos os tratamentos apresentaram atividade (Figura 8B) menor quando comparada com as atividades da SOD e APX (Figura 8A e 8C). A CAT tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2 sendo ativa somente quando este está em altas concentrações, ou seja, quando o estresse é muito grande, motivo pelo qual a sua atividade foi observada em todos os tratamentos, sendo maiores na raiz em NH_4^+ e NO_3^- .

A atividade da APX na folha foi maior no tratamento S/ N onde não teve fonte de nitrogênio (Figura 8C), já a CAT em folha, os tratamentos não tiveram diferença estatística, porém se mantiveram altos em todos os tratamentos. Esses resultados das duas enzimas podem estar diretamente relacionado com os níveis de peróxido de hidrogênio (Figura 7B), que foram superiores nesse órgão da planta também. Isso se deve a afinidade diferenciada dessas duas enzimas pelo seu substrato, de maneira que a APX, com sua alta afinidade, atua quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações e a CAT, tem comportamento contrário (GILL; TUTEJA, 2010). Plantas que apresentam maior atividade do sistema antioxidante são mais resistentes aos danos oxidativos (HERNANDEZ et al., 2010). Logo, evitar a superprodução de EROs, as quais são altamente danosas às estruturas e aos componentes celulares, é fundamental para as plantas principalmente sob condições adversas (GIANNAKOULA et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

Plantas cultivadas com NO_3^- apresentaram maior crescimento em altura da parte aérea e diâmetro. Para número de folhas e comprimento de raiz o tratamento com NH_4^+ apresentou maiores valores.

Clorofila *a* e *b* os maiores teores encontrados foram nos tratamentos NH_4^+ e $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Para carotenoides o menor teor observado foi no tratamento com NO_3^- .

Para teor de nitrogênio total o tratamento com maior teor foi o com NH_4^+ , tanto para folhas, quanto para raízes.

A atividade da enzima redutase do nitrato não diferiu em função da fonte nitrogenada, em raízes. Em folhas a maior atividade foi observada no tratamento com NO_3^- .

Em raízes a atividade da enzima GS não diferiu em função da fonte nitrogenada e foi baixa, entretando nas folhas a atividade foi mais presente e diferiu no tratamento com $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$.

A atividade da GDH em folhas foi maior em plantas cultivadas com NH_4^+ , para raízes foram as cultivadas com NO_3^- .

Para GOGAT tanto folhas quanto raízes apresentaram maior atividade com o tratamento de NH_4^+ .

Para peroxidação lipídica em folhas o tratamento com $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ foram os com maiores valores e em raízes os tratamentos não diferiram em função da fonte nitrogenadas.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi maior observado e não diferiram nos tratamentos com NO_3^- , $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e S/ N, entretando em raízes não ocorreram diferenças.

A atividade da SOD nas folhas não diferiu em função da fonte nitrogenada, em raízes, foi maior no tratamento S/ N.

O tratamento S/ N aumentou a atividade da APX nas folhas, em raízes a maior atividade se deu no tratamento com NH_4^+ .

A atividade da CAT em folhas não diferiu em função da fonte nitrogenada e em raízes a maior atividade foi observada no substrato com NO_3^- .

REFERÊNCIAS

43

ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 43, p. 213-223, 2005.

ARTUZO, Felipe Dalzotto et al. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v.12, n. 2, p. 515-540, 2019. ADREES, M., ALI, S., RIZWAN, M., IBRAHIM, M., ABBAS, F., FARID, M., et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: **A review**. (2015).

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CJ, Artzen CJ. (Eds). **Photoinhibition: Topics in Photosynthesis**, Amsterdam, p. 227-287, 1987.

ASADA, K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: FOYER, C. H.; MULLMEAU, P. M. (Ed.). Causes of photooxidative stress and acclimation of defense system in plants. **Boca Raton: CRC**, 1994. p.77-107.

BARCELO, J., & POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: **A review. Journal of Plant Nutrition**, 13(1), 1–37. 1990.

BASTOS, E. A. *et al.* Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**. v. 39, n. 02, p. 275-280, 2008.

BASZYN´SKI, T. Interference of Cd²⁺ in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 55(2), 291–304. 2014.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, 1998, 116.2: 651-658.

BLOOM, A.J.; CALDWELL, R.M.; FINAZZO, J.; WARNER, R.L.; WEISSBART, J. Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots dependent on nitrate assimilation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 191, p.352-356, 1989.

BROADLEY, M; BROWN, P; CAKMAK, I; RENGEL, Z; ZHAO, F. Function of nutrients: Micronutrients. Marschner, P. (Ed). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. **Academic Press**, San Diego, p. 191-248, 2012.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

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

CRAWFORD, N.M.; WILKINSON, J.Q. & LABRIE, S.T. Control of nitrate reduction in plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 19:377-385, 1992.

CRUZ, J.L.; MOSQUIM, P.R.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L.; DA MATTA, F.M. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. **Biologia Plantarum**, Prague, v.8, p.67-72, 2004b.

CRUZ, F. V. S; GOMES, M. P; BICALHO, E. M; DELLA TORRE, F; GARCIA, Q. S. (2020). Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 189, 110021, 2020.

DELÚ-FILHO, N. Efeito do NO₃ sobre o crescimento e a atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Lavras:UFLA, 1994. 87p. (**Tese de Mestrado**).

EDWARDS, J.W. & CORUZZI, G.M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Cell**, 1:241-248, 1989.

EMBRAPA, 2015. 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**. <http://www.consultaesic.cgu.gov.br/> Acessado em 10 de Julho de 2020.

EGHBALL, B. & MARANVILLE, J. W. Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and nitrogen stresses. **Agronomy Journal**, 85:147-152, 1993.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de Milho. **Guaíba: Agropecuária**, 2000. 360 p.

FERREIRA, V. M. ; MAGALHAES, P. C. ; DURAES, F. O. M. ; OLIVEIRA, L. E. M. ; PURCINO, A. A. C. . Aspectos do metabolismo do nitrogênio associados à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural, Santa Maria, RS**, v. 32, n.1, p. 13-17, 2002.

FIDELIS, R. R. *et al.* Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 03, p.147-153, 2007.

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p.203-224, 2002.

FRANCO, A. A. *et al.* Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: um modelo tecnológico. **O ecologia Brasiliensis**, v.1, p.459-467, 1995.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

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**, Portland, v. 24, n. 10, p. 4044-4065, 2012.

GALANGAU, F.; DANIELVEDELE, F.; MOUREAUX, T.; THÉRÈSE, M.; DORBE, M.F.; LEYDECKER, M.T. & CABOCHE, M. Expression of leaf nitrate reductase from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology**, 88:383-388, 1988.

GIA - Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental, 2015. Relatório Parcial Expedição Rio Doce. [http://giaia.eco.br/wpcontent/uploads/2015/12/Resultados-11_12-Agua359 GIAIA.pdf](http://giaia.eco.br/wpcontent/uploads/2015/12/Resultados-11_12-Agua359_GIAIA.pdf), Data de acesso 19 de agosto de 2020.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, p.909-930, Dec. 2010.

GILLISSEN, B. *et al.* A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Portland, v. 12, n. 2, p. 291-300, 2000.

HATJE, V., PEDREIRA, R. M., REZENDE, C. E., SCHETTINI, C. A. F., SOUZA, G. C., MARIN, D. C., HACKSPACHER, P. C. **The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide.** *Sci. Rep.* 7, 10706, 2017.

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

HERNANDEZ, M. et al. A different role Rockville hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in Brassica oleracea roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 521-535, 2010.

HOELZLE, I.; FINER, J.J.; McMullen, M.D. & STREETER, J.G. Induction of glutamine synthetase activity in nodulated roots of *Glycine max. Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, 100:525-528, 1992.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente. Diretoria de Proteção Ambiental e DIPRO e Coordenação Geral de Emergências Ambientais - CGEMA. **Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, Novembro de 2015**, p. 38. Acesso em: 08/01/2020. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf, 2015.

IBRAM. Instituto Brasileiro de Mineração. **Relatório Anual, Junho 2019**. Acesso em: 08/01/2020. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/ibram/wp-content/uploads/2019/07/relatorio-anual-2018-2019.pdf>, 2019.

JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.

KARMOUS, I., BELLANI, L. M., CHAOUI, A., EL FERJANI, E., & MUCCIFORA, S. Effects of copper on reserve mobilization in embryo of *Phaseolus vulgaris* L. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(13), 10159–10165. 2015.

KOPPE, J. C. A lavra e a indústria mineral - estado da arte e tendências tecnológicas.

In: **Tendências tecnológicas Brasil 2015**; geociências e tecnologia mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p.86-107, 2007.

KRESLAVSKI, V. D. et al. Molecular mechanisms of stress resistance of photosynthetic machinery. In: ROUT, G. R.; DAS, A. B. (Ed.). **Molecular stress physiology of plants**. New Delhi: Springer, 2012. p. 21-51.

LEA, J. L. Nitrogen metabolism. In: LEA, J. L.; LEEGOOD, R. C. Plant biochemistry and molecular biology. **Chichester: Wiley**, p. 155-180, 1993.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, Washington, v.42, p. 1-40, 2011.

LEMOS, G. B. et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes fontes de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.2, p.113-118, 1999.

LEMOS, G.B. de Crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. Lavras:UFLA, 1996. 56p. (**Tese de Mestrado**).

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205–397, 2013.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: John Wiley & Son, 2001. p. 1-8.

LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v.674, p. 137-147, 2009.

LOPES, J. P.; MACHADO, E. C.; DEUBER, R.; MACHADO, R. S. Análise de crescimento e trocas gasosas na cultura de milho em plantio direto e convencional. **Bragantia**, v.68, p.839-848, 2009.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; HIGASHI, R. M. Root exudation and physiological

status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, n. 1, p. 11-20, 1997.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; PAGEAU, K.; LELANDAIS, M.; GRANDJEAN, O.; KRONENBERGER, J.; VALADIER, M.; FERAUD, M.; JOUGLET, T.;

SUZUKI, A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, v.140, p.444-456, 2006.

MENGEL, K. & KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 849, 2001.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v.15, p.873-885, 1976.

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, p.979-987, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. In: *Root Physiology: from Gene to Function*. **Springer Netherlands**, p. 1-36, 2005.

MORTATE, Roberto Kennedy et al. Resposta do milho (*Zea mays* L.) à adubação foliar e via solo de nitrogênio. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 5, n.1, p. 1-6, 2018.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

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

PAJUELO, P.; PAJUELO, E.; FORDE, B.G. & MÁRQUEZ, A.J. Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. **Planta**, 203:517-525, 1997.

PALLARDY, S. G. Nitrogen metabolism. In: PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody Plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier, Chapter 9, p. 233-254, 2008.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 195, n. 6, p.442-454, 2009

PATE, J.S.; LAYZELL, D. B. Carbon and nitrogen partitioning in the whole plant—a thesis based on empirical modeling. In: Nitrogen and Carbon Metabolism, Netherlands, n. 3, p. 94-134, 1981.

PEETERS, K.M.U. & Van LAERE, A.J. Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. **Physiologia Plantarum**, 84:243-249, 1992.

PERFUS-BARBEOCH, L., LEONHARDT, N., VAVASSEUR, A., & FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: Cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, 32(4), 539–548. 2002.

PIZOLATO NETO, Antonio et al. Doses de nitrogênio para cultivares de milho irrigado. **Nucleus**, Ituverava, v.13, n.1, p. 87-96, 2016.

PORTO, M.F.S. A tragédia da mineração e do desenvolvimento no Brasil: desafios para a saúde coletiva. **Cad Saude Publica** 32:1-3, 2016.

PURCINO, A.A.C.; ARELLANO, C. ATHWAT, G.S. & HUBER, S.C. Nitrate effects on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. **Maydica**, 43:83-94, 1998.

PURCINO, A. A. C.; LIMA, T. R. ; PINTO, A. C. ; CARNEIRO, N. P. ; SOUZA, I. R. P. ; MARRIEL, I. E. ; PARENTONI, S.N. ; CARVALHO, L.J. C. B. . Glutamine synthetase response to nitrate in maize genotypes of contrasting nitrogen use efficiency. **Maydica**

(Bergamo), v. 53, p. 101-109, 2008.

50

RESENDE, A. S.; CHAER, G. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, A. P.; LIMA, K. D. R.; CURCIO, G. R. Uso de leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas. In: **Tópicos em Ciências do Solo**, Viçosa: SBCS, v. 8, p. 71-92, 2013.

RUTSCHOW, H. L.; BASKIN, T. I.; KRAMER, E. M. Regulation of solute flux through plants modesmata in the roor meristem. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, p. 1817-1826, Apr. 2011.

SAGE, R. F.; PEARCY, R. W. The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. I. Leaf nitrogen, growth, and biomass partitioning in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 3, p. 954-958, 1987.

SAGE, R. F. 2004. The evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist**, 161, 341–370, 2004.

SAKAKIBARA, H.; KOBAYASHI, K.; DEJI, A. & SUGIYAMA, T. Partial characterization of the signaling pathway for the nitrate-dependent expression of genes for nitrate-assimilatory enzymes using detached maize leaves. **Plant and Cell Physiology**, 38:837-843, 1997

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; MIRANDA, M. Avaliação da atividade da lipoxigenase em linhagens de soja. *Bragantia*, Campinas, v. 46, n.2, p. 371-380, 1987.

SEDRU, 2016. Relatório: Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana-MG. Secretaria De Estado De Desenvolvimento Regional Política UrbanaGestão Metropolitana. Acessado em 10 junho 2020.

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

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**, Waterbury, v. 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.

SOUSA, R.; CARVALHO, M. D.; GOMES, S; GUIMARAES, W.; ARAUJO, A. Leituras de clorofila e teores de N em fases fenológicas do milho. **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-

SRIVASTAVA, H.S. & SINGH, R.P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 26:597-610, 1987.

STEINER, H. Y.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. The PTR family: a new group of peptide transporters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 825-834, 1995.

SUBEDI, K. D.; MA, B. L. Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 110,n.1, p. 21-26, 2009.

Van der WERF, A. & NAGEL, O. W. Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose. **Opinion.Plant and Soil**, 185:21-32, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer, 2016. 197p.

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**, Kyoto, v. 54, n. 10, 2013.

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.

VIDAL, E. A.; ALVAREZ, J. M.; ARAUS, V.; RIVERAS, E.; BROOKS, M.; KROUK, G.; RUFFEL, S.; LEJAY, L.; CRAWFORD, N.; CORUZZI, G. M.; GUTIERREZ, R. A. Nitrate 2020: Thirty years from transport to signaling networks. **The Plant Cell**, (), 2020.

XU, Q.; CHEN, S.; REN, Y.; CHEN, S.; LIESCHE, J. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. **Plant Physiology**, (), pp.01088, 2017.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

WANG, C.W. & TILLBERG, J.-E. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzymes activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum*

vulgare). **Physiologia Plantarum**, 97:339-345, 1996.

52

WATANABE, M.; HAYASHI, M. & SUGIYAMA, T. Effects of supplemental nitrogen application on the activity of some nitrogen assimilation enzymes and leaf tissue productivity in maize seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, 31:573-580, 1985.

YOUNG, A. J. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.83, n. 4, p. 702-708, Dec.1991.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Competition among species of plants—a review. **Revista da FZVA**. v. 11, n. 1, p. 10-30, 2004.

ZORNOZA, P. & GONZALEZ, M. Intraspecific differences in nitrogen assimilating enzymes in spinach under contrasting forms of nitrogen supply. **Journal of Plant Nutrition**, 21:1129-1238, 1998.