



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



FABRÍCIO CUSTÓDIO DE MOURA GONÇALVES

**APLICAÇÃO DE FERRO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODULA O
METABOLISMO EM PLANTAS DE *Mentha piperita* L.**

BOTUCATU

2021

FABRÍCIO CUSTÓDIO DE MOURA GONÇALVES

**APLICAÇÃO DE FERRO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODULA O
METABOLISMO EM PLANTAS DE *Mentha piperita* L.**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Horticultura).

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono

Coorientador: Prof. Dr. João Domingos Rodrigues

Botucatu

2021

G635a Gonçalves, Fabrício Custódio de Moura
Aplicação de ferro e intensidade de radiação solar
modula o metabolismo em plantas de *Mentha piperita* L. /
Fabrício Custódio de Moura Gonçalves. -- Botucatu, 2021
189 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Elizabeth Orika Ono
Coorientadora: João Domingos Rodrigues

1. Planta medicinal. 2. Micronutriente. 3. Irradiância. 4.
Metabolismo vegetal. 5. Estrutura foliar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: APLICAÇÃO DE FERRO E INTESIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODULA O METABOLISMO EM PLANTAS DE *Mentha piperita* L.

AUTOR: FABRÍCIO CUSTÓDIO DE MOURA GONÇALVES

ORIENTADORA: ELIZABETH ORIKA ONO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª ELIZABETH ORIKA ONO (Participação Virtual)
Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



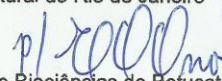
Prof.ª Dr.ª CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO (Participação Virtual)
Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof. Dr. LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof.ª Dr.ª TATIANE MARIA RODRIGUES (Participação Virtual)
Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof.ª Dr.ª ANGÉLICA LINO RODRIGUES (Participação Virtual)
/ Faculdade Orígenes Lessa



Botucatu, 10 de fevereiro de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Francisco e Isabel, que dignamente me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

Aos meus irmãos e demais familiares, que sempre me incentivaram.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Horticultura - Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a Dr^a. Elizabeth Orika Ono, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de profissional.

Ao Prof. Dr. João Domingos Rodrigues, pela coorientação e amizade. A você Prof. Mingo, meu respeito e admiração.

À banca examinadora, composta pelos professores Carmen Silva Fernandes Boaro, Angélica Lino Rodrigues, Tatiane Maria Rodrigues e Luiz Ricardo dos Santos Tozin, pelo aceite do convite e contribuições.

À Prof^a Dr^a Tatiane Maria Rodrigues por permitir o uso do laboratório para análises anatômicas.

Ao Gean Monteiro, Luís Paulo Mantoan, Nathália Parreiras, Nicolas Oliveira e Stefany Cristina pela amizade e colaboração durante esse trabalho.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Agronomia/Horticultura, Rafael Bibiano, Bruno Novaes e Carla Correa pela amizade e apoio.

Finalmente, a todos que participaram direta e indiretamente dessa fase importante da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) é uma planta medicinal com potencial na medicina tradicional, indústria farmacêutica e de perfumes. Os compostos ativos das plantas resultam tanto do metabolismo primário como do secundário, mais recentemente denominado especializado. Condições ambientais, como intensidade da radiação solar e a nutrição mineral modulam o metabolismo vegetal influenciando a fisiologia, bioquímica e anatomia desses indivíduos. O presente estudo tem como objetivo analisar respostas fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em plantas de *M. piperita* submetidas à aplicação de ferro (Fe) e diferentes intensidades de radiação solar. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com 2 fatores: concentrações de Fe (5 concentrações) e 2 condições de irradiância I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). As concentrações de Fe aplicadas via foliar foram: 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e duas condições de irradiância, I_{100%} e I_{50%}. Foram realizadas avaliações de crescimento, teores de pigmentos, Fe foliar e, carboidratos, bem como trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, respostas relacionadas ao sistema antioxidante e modificações anatômicas. No capítulo 1, os resultados revelam que em curto período de tempo, a maior sensibilidade as maiores concentrações de Fe são causadas pelo comprometimento da fotossíntese, como a concentração interna de CO₂ (C_i) e eficiência de uso de água, desencadeada por dano oxidativo e sua consequente incapacidade de extinguir o excesso de energia entre os fotossistemas, como revelado pela elevação de coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e diminuição de quenching não fotoquímico (NPQ). A condição de I_{50%} eleva os valores de clorofilas (a e b), carotenoides, C_i, transpiração, fluorescência mínima da folha adaptada ao claro (F₀'), fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (F_m) e ao claro (F_m'), eficiência quântica da antena (F_v'/F_m'), fluorescência variável adaptada ao claro (F_v') e ao escuro (F_v). A condição em pleno sol (I_{100%}) aumenta a fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (F₀) e a taxa de transporte de elétrons. Nos capítulos 2 e 3, os resultados revelam que o crescimento, concentração de clorofilas, assimilação e uso de CO₂ são influenciados positivamente pela aplicação com concentrações menores de Fe, refletindo em maior produção de biomassa total. De maneira em geral, a aplicação de Fe não prejudica o aparato fotossintético, sem alteração na produção de peróxido de hidrogênio, apesar de modificar discretamente peroxidação lipídica, no entanto, incrementa respostas do sistema antioxidantes. A condição I_{100%} reflete positivamente em incrementos de trocas gasosas, biomassa e compostos fenólicos totais. No capítulo 4, o teor de Fe foliar é proporcional a concentração aplicada desse elemento e com maior acúmulo em condição de menor incidência solar (I_{50%}). Plantas pulverizadas com 1,5 g L⁻¹ de Fe em condição de I_{50%} aumenta a espessura do mesofilo foliar. A área ocupada pelos espaços intercelulares do mesofilo foi afetada significativamente na presença de 1,5 g L⁻¹ de Fe sob redução do nível de irradiância (I_{50%}). A aplicação de Fe reduz o número de elementos condutores na nervura principal. De maneira em geral, o ambiente com sombreamento (I_{50%}) diminui espessuras da epiderme da face adaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Em busca de maior produtividade de plantas de *M. piperita*, recomenda-se concentrações menores de Fe e cultivo em condição de maior intensidade de radiação solar.

Palavras-chave: Planta medicinal. Micronutriente. Irradiância. Metabolismo vegetal. Estrutura foliar.

ABSTRACT

Peppermint (*Mentha piperita* L.) has medicinal properties and is largely employed in both pharmaceutical and cosmetic industries. The plants' active compounds come from both primary and secondary metabolism, which is recently called specialized. Then, environmental conditions, such as solar radiation intensity and mineral nutrition modulate plant metabolism; consequently, influencing their physiology, biochemistry, and morphology. The present study aimed to analyse physiological, biochemical, and morphological responses in *M. piperita* plants subjected to iron (Fe) application under different solar radiation conditions. The experiment was conducted in a greenhouse with controlled humidity and temperature. The experimental design was completely randomized in a 5x2 factorial scheme, that is, five Fe concentrations (0 [control], 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g L⁻¹) and two irradiance conditions (I_{100%} [full sunlight] and I_{50%} [50% irradiance]). The following parameters were analysed growth evaluations, pigments levels, Fe in leaf and carbohydrates, besides gas exchange, chlorophyll a fluorescence, responses related to the antioxidant system and morphological changes. In the first chapter, the results showed the greater sensitivity to higher Fe concentrations are caused by photosynthesis impairment in a short period of time, such as the internal CO₂ concentration of (C_i) and water use efficiency, triggered by oxidative damage and, consequently, the inability to extinguish excess energy between photosystems, since there was an increase in the photochemical extinction coefficient (qP) and a decrease in non-photochemical quenching (NPQ). The I_{50%} condition increases the values of chlorophylls (a and b), carotenoids, C_i, transpiration, minimum fluorescence in light adapted leaf (F_{o'}), maximum fluorescence in the dark adapted leaf (F_m) and light adapted leaf (F_{m'}), antenna quantum efficiency (F_v'/F_m'), variable fluorescence adapted to light (F_v) and dark (F_v). The full sunlight condition increases the minimum fluorescence in dark adapted leaf (F_o) and electron transport rate. In the second and third chapters, results showed that growth, chlorophyll concentration, CO₂ assimilation and uptake are positively influenced by lower doses of Fe; thus, a higher total biomass production. In general, Fe application does not harm the photosynthetic apparatus without altering hydrogen peroxide production, despite the slight change in lipid peroxidation; however, it increases responses to antioxidant system. The I_{100%} reflects positively in gas exchange, biomass, and total phenolic compounds. In the fourth chapter, the Fe content in leaf is proportional to the applied concentration of this element, besides the greatest accumulation under lower irradiance conditions (I_{50%}). Plants sprayed with 1.5 g L⁻¹ of Fe and I_{50%} increased the thickness of the leaf mesophyll. The area occupied by the intercellular spaces of the leaf mesophyll was significantly affected with 1.5 g L⁻¹ of Fe under low irradiance condition (I_{50%}). The Fe application reduces the number of conductive elements in leaf midrib. In general, shaded environment (I_{50%}) decreases the thickness of the epidermis of the adaxial face and the palisade and spongy parenchyma. In a search for high yield of *M. piperita* plants, low Fe concentrations and cultivation area under full sunlight are recommended.

Keywords: Medicinal plant. Micronutrient. Irradiance. Plant metabolism. Leaf structure.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CHAPTER 1	19
IRRADIANCE AND APPLICATION OF IRON INTENSIFIES RESPONSES OF THE PRIMARY METABOLISM AND ANTIOXIDANTS OF PLANTS OF <i>Mentha piperita</i> L.	19
1.1 INTRODUCTION.....	19
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	21
1.2.1 STUDY LOCATION.....	21
1.2.2 PLANT MATERIAL AND TREATMENTS.....	21
1.2.3 EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL VARIABLES.....	22
1.2.4 EVALUATION OF BIOCHEMICAL VARIABLES.....	24
1.2.5 EXPERIMENTAL DESIGN.....	25
1.2.6 STATISTICAL ANALYSIS.....	25
1.3 RESULTS.....	25
1.3.1 EFFECT OF FE APPLICATION AND SOLAR RADIATION INTENSITY ON CHLOROPHYLL CONTENT.....	26
1.3.2 EFFECT OF FE APPLICATION AND SOLAR RADIATION INTENSITY ON GAS EXCHANGE VARIABLES.....	29
1.3.3 EFFECT OF FE APPLICATION AND SOLAR RADIATION INTENSITY ON CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE VARIABLES.....	31
1.3.4 EFFECT OF FE APPLICATION AND SOLAR RADIATION INTENSITY ON ANTIOXIDANT SYSTEM VARIABLES.....	35
1.4 DISCUSSION.....	36
1.5 CONCLUSIONS.....	39
REFERENCES.....	39
CAPÍTULO 2	45
FERRO EXÓGENO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODIFICA RESPOSTAS DO METABOLISMO PRIMÁRIO DE <i>Mentha piperita</i> L.	45
2.1 INTRODUÇÃO.....	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	49
2.2.2 MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS.....	49
2.2.3 AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS.....	50
2.2.4 AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS.....	53
2.2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
2.3.1 VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS.....	57
2.3.2 ANÁLISE DE CRESCIMENTO.....	57
2.3.3 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS.....	70
2.3.4 TROCAS GASOSAS.....	74
2.3.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	87
2.3.6 ANÁLISE DE CARBOIDRATOS.....	96
2.3.7 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (APC).....	103
2.4 CONCLUSÕES.....	107

	REFERÊNCIAS.....	108
	CAPÍTULO 3.....	120
	AÇÃO DO FERRO EXÓGENO E IRRADIÂNCIA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE <i>Mentha piperita</i> L.....	120
3.1	INTRODUÇÃO.....	122
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	124
3.2.1	LOCAL DE ESTUDO.....	124
3.2.2	MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS.....	124
3.2.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	125
3.2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	130
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
3.3.1	EFEITO DA APLICAÇÃO DE FE E DA INTENSIDADE DA RADIAÇÃO SOLAR NOS TEORES DE ANTIOXIDANTES.....	131
3.4	CONCLUSÕES.....	147
	REFERÊNCIAS.....	148
	CAPÍTULO 4.....	154
	APLICAÇÃO DE FERRO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODIFICA ANATOMIA DE FOLHAS DE <i>Mentha piperita</i> L.....	154
4.1	INTRODUÇÃO.....	156
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	158
4.2.1	LOCAL DE ESTUDO.....	158
4.2.2	MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS.....	158
4.2.3	TEOR DE FERRO FOLIAR.....	159
4.2.4	ANATOMIA DA FOLHA.....	159
4.2.5	DENSIDADE ESTOMÁTICA (Nº DE ESTÔMATOS POR MM ²).....	160
4.2.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	160
4.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	161
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	161
4.3.1	EFEITO DA APLICAÇÃO DE FE E DA INTENSIDADE DA RADIAÇÃO SOLAR NO TEOR DE FERRO.....	161
4.3.2	EFEITO DA APLICAÇÃO DE FE E DA INTENSIDADE DA RADIAÇÃO SOLAR EM ASPECTOS ANATÔMICOS.....	163
4.4	CONCLUSÕES.....	175
	REFERÊNCIAS.....	176
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	182
	REFERÊNCIAS.....	185

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais têm sido usadas durante séculos na medicina tradicional devido ao seu efeito terapêutico (SAHARKHIZ et al., 2012), constituindo, ainda hoje, alternativa de grande aceitação (SANTOS et al., 2008). Os potenciais das plantas medicinais ainda não foram investigados em sua totalidade e seus princípios ativos podem ser decisivos em estudos atuais e no futuro. Dessa forma, o cultivo e a importância das plantas medicinais e aromáticas vêm crescendo, com base, em especial, na demanda criada pelas indústrias (SOUZA et al., 2007; SINGH, 2015). Nos diferentes ramos industriais, a contribuição das plantas medicinais é notável, pois são amplamente utilizadas em vários países como remédios, cosméticos, conservantes de alimentos e perfumes. Especificamente, o uso dos óleos essenciais (OE) na perfumaria se deve ao seu potencial aromático (PALA et al., 2010; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011; DAR et al., 2017).

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) é uma espécie da família Lamiaceae, erva medicinal e aromática de importância em todo o mundo e possui potencial na culinária, na medicina tradicional, indústria farmacêutica, cosmética e de perfumes (ROODBARI et al., 2013; MALAQUIAS et al., 2014). O OE dessa espécie possui diversos usos na medicina popular, sendo utilizada para amenizar cólicas, bronquite crônica, calmante, revitalizante, antidepressivo, antialérgico, carminativo, hipotensor, tônico em geral, antiespasmódico, espasmolítica, antiemética, estomáquica e como broncodilatadora e estimulante do sistema nervoso (MALAQUIAS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2017). Além disso, o potencial antimicrobiano de diferentes partes da *M. piperita* reporta a significativa atividade antibacteriana de extratos obtidos das folhas da planta, possivelmente, devido à presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos e fenóis (BENITEZ et al., 2016).

O OE das folhas de *M. piperita* apresenta mais de 200 componentes, é um líquido de cor amarelo claro, odor forte e agradável, possui sabor aromático, sendo um dos OE mais produzidos e consumido no mundo. Os mais importantes constituintes do OE dessa espécie são mentol, mentona, isomentona, acetato de mentila, mentofurano, limoneno, pulegona, carvona, α -pineno, sabineno, β -pineno, 3-octanol, 1,8 cineol, piperitona, acetato de neomentila, *t*-cariofileno, farneseno, neomentol e isomentol (TAVISH; HARRIS, 2002; AFLATUNI, 2005). Dentre os

monoterpenos, o mentol é o principal constituinte, seguido pela mentona e outros compostos minoritários acetato de mentila, 1,8-cineol, mentofurano, isomentona, neomentol, limoneno, pulegona, α -pineno, β -pineno, linalol e α -terpineol, enquanto o α -cariofileno representa o principal sesquiterpeno (AFLATUNI, 2005; BEHN et al., 2010; VERMA et al., 2011).

Apesar do mentol ser considerado o principal componente, no entanto, não é a única substância que define a qualidade do OE (PAULUS et al., 2007). Outras substâncias presentes no perfil químico de voláteis foliares da *M. piperita* podem agregar valor, como o mentofurano que representa uma substância interessante para a indústria de perfumes por não intensificarem o aroma da essência, além do que, é uma substância de custo elevado, devido a sua limitada disponibilidade e baixa produção (0 a 6%) (KHANUJA et al., 2003). Destaca-se ainda o acetato de mentila, que é utilizado em perfumaria, em águas sanitárias, além de ser um monoterpeneo que apresenta atividade contra ovos, larvas e adultos de drosófilas (ADDOR, 1994; THE MERCK INDEX, 1996).

Os componentes das plantas medicinais resultam tanto do metabolismo primário e secundário, atualmente denominado metabolismo especializado, que é essencial para o crescimento, desenvolvimento e defesa de plantas (KLIEBENSTEIN; OSBOURN, 2012; ZANDALINAS et al., 2017). A quantidade e qualidade dos princípios ativos refletem o valor comercial das plantas medicinais (POVH; ONO, 2006), que, por sua vez, são influenciados por fatores, como genética da planta, disponibilidade de água, local de cultivo e composição do solo, assim como, tratamentos culturais, que junto com a herbivoria, também podem influenciar no rendimento e na composição dos OEs. Esses fatores podem ainda interagir entre si, influenciando no metabolismo especializado (LOPES et al., 2009; ROSA et al., 2010; LOPES et al., 2013; ARUMUGAM et al., 2016; GORELICK; BERNSTEIN, 2017; DEHSHEIKH et al., 2019). Deve-se destacar ainda que, compostos de plantas medicinais são sintetizados somente durante determinada fase de crescimento, ou ainda, em épocas específicas e, sobretudo, em condições ambientais adversas (GHOSH et al., 2018). Dessa maneira, percebe-se a importância de estudos realizados em diferentes condições de cultivo, com o objetivo de elevar a produtividade e qualidade de compostos de plantas medicinais.

Dentre os fatores do ambiente, a luz tem função primordial no metabolismo vegetal, pois controla a produção da biomassa e é determinante para plasticidade relacionada à aclimatação a situações diferenciadas de luminosidade que leva a modificações no aparato fotossintético, de forma a promover acúmulo eficiente de matéria seca e promover o crescimento (ALVARENGA et al., 2005). Frigeri (2007) e Miralles et al. (2011) apontam como variáveis morfológicas, que variam em função dos diferentes níveis de irradiância, relação raiz/parte aérea, massa específica foliar e razão de área foliar. Variáveis estas que estão associadas à área, espessamento, número e arranjo espacial de folhas; biomassa alocada no caule, nas folhas e raízes; biomassa total; altura e espessura do caule.

Apesar disso, as plantas podem responder de maneira específica aos estímulos luminosos. Essas respostas não dependem apenas da presença ou da ausência da luz, mas também da qualidade espectral da radiação (BOULY et al., 2007). Tem-se utilizados várias técnicas para a manipulação da qualidade da luz. Alguns trabalhos mostram efeitos marcantes sobre a fotomorfogênese de plantas pela iluminação artificial (PONS; VAN BERKEL, 2004) por coberturas refletoras ou malhas coloridas para casas de vegetação (SHAHAK; GUSSAKOVSKY, 2004). Zhang et al. (2009) reforçam que a intensidade da luz pode melhorar significativamente o crescimento e alterar as concentrações de metabólitos. Por exemplo, o aumento na densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ melhorou significativamente o crescimento e a capacidade fotossintética de plântulas de *Momordica grosvenori*. Em parte, Selmar e Kleinwachter (2013) sugerem que o aumento da síntese de metabólitos secundários, como isoprenoides, fenóis ou alcaloides, pode ser explicado como resultado da redução de CO_2 interno e da atividade do ciclo de Calvin e aumento da oferta de agentes redutores (NADPH) para as vias metabólicas secundárias.

Adicionalmente, os micronutrientes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, devido ao seu envolvimento em diversas funções celulares, como o metabolismo energético, regulação de expressão gênica, síntese e percepção de hormônios vegetais, e, são ainda cofatores para a estrutura e/ou atividade catalítica de enzimas. Os micronutrientes são necessários em pequenas quantidades, sendo que seu excesso pode causar estresse e, em última instância, toxicidade, inibindo a atividade enzimática e induzindo a formação de espécies

reativas de oxigênio (EROs), podendo ocasionar interrupção do equilíbrio iônico intracelular (DALCORSO et al., 2014). É amplamente relatado que a aplicação foliar de micronutrientes melhora o rendimento em várias culturas, inclusive em plantas medicinais, como revelado em *M. piperita* (ZEHTAB-SALMASI et al., 2008).

O ferro (Fe) é considerado o quarto microelemento mais abundante na crosta terrestre e é essencial para o crescimento e produtividade vegetal (CURIE; BRIAT, 2003; PUIG et al. 2005). Esse elemento é constituinte de várias proteínas e enzimas que desempenham papéis importantes nos principais processos metabólicos, incluindo respiração celular, transporte de oxigênio, metabolismo de lipídeos, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), regulação gênica, síntese de intermediários metabólicos e biossíntese de DNA, além de ser essencial para a fotossíntese e biossíntese de clorofila (JEONG; CONNOLLY, 2009; BRIAT et al., 2010; ADAMSKI et al. 2012; ABOUTALEBI, 2013; CHEN et al., 2015; MAHENDER et al., 2019). Contudo, o Fe encontra-se pouco disponível na maioria dos solos (MARSCHNER et al., 2011) e a sua disponibilidade depende de vários fatores, como tipo de solo, pH, matéria orgânica e atividades microbianas que influenciam significativamente na absorção, captação, transporte e translocação de Fe do solo para as raízes e, conseqüentemente, para os demais órgãos da planta (MAHENDER et al., 2019).

As plantas desenvolveram duas estratégias para absorção do Fe, a fim de driblar a deficiência deste mineral nos solos. As estratégias I (redução) e II (quelatão). A estratégia I é típica de dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, que consiste na redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} através da acidificação da rizosfera, causada pela liberação de prótons H^+ através da H^+ -ATPases de membrana plasmática (GARCÍA et al., 2011; MARSCHNER, 2012; GARCÍA et al., 2015). Na estratégia II, os fitossideróforos (FS), compostos com alta afinidade pelo ferro, como ácidos muginéico e avênico, assim como a nicotianamina, são secretados para a rizosfera, onde se unem ao Fe^{3+} formando um complexo quelato (Fe^{3+} -FS). Este complexo é transportado para o interior da célula por transportadores específicos conhecidos como *Yellow Stripe 1* (YS1) (BASHIR et al., 2011; ALEXANDRE et al., 2012; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012; MARSCHNER, 2012; AUNG et al., 2018). A forma iônica (Fe^{2+}) é preferencialmente absorvida pelas plantas (BROADLEY et al., 2012; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2013; ROUT; SAHOO, 2015). Uma vez que, o Fe penetra na raiz, inicia-se seu caminho via simplasto, dependente de um sistema de transportador

de membrana de alta afinidade por Fe (CURIE; BRIAT, 2003), carregado no xilema e translocado na forma de complexos com ácidos orgânicos, sobretudo, citrato para a parte superior via fluxo transpiratório (BECKER; ASCH, 2005; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012).

O Fe atua ainda na biossíntese de etileno, ácido giberélico e jasmônico, na produção e na eliminação de espécies reativas de oxigênio, na osmoproteção e na defesa de patógenos (HÄNSCH; MENDEL, 2009; DIXON; STOCKWELL, 2014; FOURCROY et al., 2014; BRIAT et al., 2015). As enzimas que atuam na transferência de elétrons utilizam o Fe como cofator de escolha, sendo estas enzimas envolvidas em uma variedade de reações redox reversíveis (FOURCROY et al., 2014), como transporte de elétrons. Além disso, é importante na fixação de nitrogênio (JEONG; GUERINOT, 2009; MARENCO; LOPES, 2009; BRIAT et al., 2010; MÜLLER et al., 2015). Tanto o excesso como a deficiência por Fe em plantas causa redução da produção de clorofila (BRIAT et al., 2015; ROUT; SAHOO, 2015). E pode provocar ainda distúrbios nutricionais e danos oxidativos que afetam negativamente a produção agrícola (AUDEBERT; FOFANA, 2009; STEIN et al., 2014).

Considerando as inúmeras variações de produção de massa, respostas bioquímicas, anatômicas e produção de OE e a escassez de informações sobre efeitos do elemento Fe em respostas a diferentes condições de luz nesses processos biológicos, são, portanto, cruciais. O Fe influencia inúmeras reações metabólicas vitais, exercendo efeitos diretos sobre a produção de compostos dos metabolismos primário e especializado, além de modificar a própria anatomia da planta (JAIN; CONNOLLY, 2013), enquanto, a luz em plantas medicinais influencia não só o crescimento, mas também a produção de OE. Por exemplo, plantas de *M. piperita* cultivadas sob alta intensidade de luz revela incremento no crescimento e na produção de óleo essencial (COSTA et al., 2012).

A *M. piperita* é uma espécie de importância econômica, destacando-se entre as plantas medicinais, sobretudo, devido às suas propriedades terapêuticas comprovadas e sua inclusão na Farmacopeia de diferentes países. Dessa forma, a importância de estudos sobre o comportamento fisiológico, bioquímico e anatômico dessa espécie consiste em gerar conhecimentos que possibilitem determinar condições ideais de cultivo, a fim de alcançar maiores índices de produtividade,

quantidade e qualidade de princípios ativos de interesse econômico, biológico e farmacológico.

O presente estudo tem como objetivo geral analisar efeitos da aplicação de Fe e da intensidade de radiação solar em respostas fisiológicas, bioquímicas e anatômicas em plantas de *M. piperita*.

CHAPTER 1

Irradiance and application of iron intensifies responses of the primary metabolism and antioxidants of plants of *Mentha piperita* L. *

*The manuscript was submitted to the journal *Acta Physiologiae Plantarum*

Fabrício Custódio de Moura Gonçalves^{1**}. João Domingos Rodrigues¹. Elizabeth Orika Ono¹

¹Departament of Horticulture, São Paulo State University, Botucatu, SP CEP: 18610 – 307, Brazil.

**Corresponding author: fabricio-moura-07@hotmail.com. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4319-635X>

Abstract

The present study aimed to analyze the synthesis of pigments, gas exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant in peppermint plants (*Mentha piperita* L.) submitted to iron (Fe) application and exposed to different levels of irradiance. Therefore, the plants were distributed in a completely randomized design and subjected to five levels of Fe, that is, equal to 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹ and exposed to two irradiance conditions, i.e. 50% (I_{50%}) and 100% of full sunlight (I_{100%}). The evaluations of gas exchange, pigment content, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities were made within 48 hours after Fe application. Results indicated that greater sensitivity and higher Fe concentrations are caused by photosynthesis impairment, such as internal CO₂ concentration (C_i) and water use efficiency; in addition to oxidative stress and the inability to extinguish excess energy between photosystems, such as the increase in the photochemical extinction coefficient (qP) and the decrease in non-photochemical quenching (NPQ). The I_{50%} condition increased the values of chlorophylls (a and b), carotenoids, C_i, transpiration, minimum fluorescence in light adapted leaves (F_o'), maximum fluorescence in dark (F_m) and light (F_m') adapted leaves, antenna quantum efficiency (F_v/F_m'), variable fluorescence adapted to light (F_v') and dark (F_v). Results showed that full sunlight (I_{100%}) increased F_o and the electron transport rate. *M. piperita* plants are more sensitive to the solar irradiance variations than Fe applications in a short evaluation period after the application of iron.

Keywords: Peppermint. Shading. Mineral stress. Metabolites.

1.1 Introduction

Peppermint, botanically known as *Mentha piperita* L., is an herbaceous plant with medicinal properties, belongs to family Lamiaceae (Grisi 2006). Peppermint essential oil is globally consumed as food additives, oral care products and pharmaceutical preparations (Malaquias et al. 2014; Siqueira et al. 2017). However, the essential oil production depends on several factors, such as cultivation area, solar radiation intensity, water availability and nutrients from soils.

Iron (Fe) is an essential micronutrient to preserve several cellular, metabolic, and physiological functions in plants (López-Millán et al. 2013; Mahender et al. 2019); Fe plays a crucial role in CO₂ fixation and yield (Briat et al. 2010; Pereira et al. 2013). Fe also participates in electron transfer through reversible redox reactions (Pereira et al. 2013; Fourcroy et al. 2014; Chen et al. 2015). Thus, high Fe applications increase oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) (Robello et al. 2007; Kobayashi and Nishizawa 2012; Sharma et al. 2012), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide (O₂⁻) and hydroxyl radicals (OH[·]) (Gill and Tuteja 2010; Asensio et al. 2012). Stopping uncontrolled oxidation caused by antioxidant enzymes is needed to limit progressive oxidative damage. Therefore, superoxide dismutase (SOD) plays a protective role against the harmful effects of ROS, which requires Fe as a cofactor. Superoxide dismutase is within several cellular compartments and is involved in the detoxification of O₂⁻ to H₂O₂ (Sinha and Saxena 2006; Sharma et al. 2012). Besides, catalase and peroxidases also participate in this protection mechanism (Da Costa et al. 2005; Sharma et al. 2012).

Moreover, solar radiation is indispensable for photosynthesis, pigment synthesis, Calvin cycle, electron transport and biomass production (Wang et al. 2013b; Yang et al. 2014; Kong et al. 2016; Habibi 2018). The intensity and quality of solar radiation changes growth patterns and various physiological and biochemical characteristics of plants (Brant et al. 2009; Yang et al. 2018a). Shade stress reduces photosynthetic rate in C₃ plants (Su et al. 2014; Yao et al. 2017; Khalid et al. 2019) and blocks electron transport from PSII to PSI; consequently, reducing chlorophyll *a* fluorescence (Yao et al. 2017; Wu et al. 2017). Depending on the solar radiation intensity, the levels of chloroplast pigments, carotenoids and anthocyanin can be considered as important markers for plant environment (Martins et al. 2009). Pompelli et al. (2010) found an increase in the value of the *Fv/Fo* quotient and maximum photochemical efficiency (*Fv/Fm*), which showed higher values in plants grown in full sunlight than plants grown in shade. Ni et al. (2020) found that the following parameters minimum fluorescence in dark adapted leaves (*Fo*) and maximum fluorescence in dark adapted leaves (*Fm*) and *Fv/Fm* increased in all plants when light intensity was reduced, suggesting that low light intensity increases these values in *Passiflora* species of the genus in the end.

For yield, physiological and biochemical variations influence environment and management practices, such as mineral nutrition and solar radiation intensity. They all directly reflect changes in primary metabolism and antioxidant system. Despite the importance and the evolution of these factors in physiological and biochemical responses of plants, there is a paucity of literature on the production of *M. piperita* with regards to yield.

Thus, the present study aimed to analyze the production of photosynthetic pigments, gas exchanges, chlorophyll *a* fluorescence and responses to antioxidant systems of *M. piperita*

plants subjected to Fe application and exposed to different solar radiation conditions in a short period of time.

1.2 Material and methods

1.2.1 Study location

This study took place at the Department of Biostatistics, Plant Biology, Parasitology and Zoology in the Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, state of São Paulo. Therefore, the experiment was conducted in a greenhouse with humidity and temperature control, located at the following GPS coordinates: 22°53'12.2 "S, 48°29'52.5" W. During the experiment, the average of daily minimum and maximum with a mean of continuously recorded temperature were 27°C, 18°C and 22°C, respectively.

1.2.2 Plant material and treatments

The cuttings of *Mentha piperita* L. were obtained from matrix plants that were grown in pots containing commercial substrate Tropstrato HT Hortalices®+Carolina soil® + soil, in the 1:1:1 proportion.

Shoots were selected, in which the 8 cm height cuttings were kept with the first four pairs of leaves; they were then placed in expanded polystyrene trays with commercial substrate Tropstrato HT Hortalices®. These cuttings were kept in an intermittent nebulization chamber until rooting, according to Gonçalves et al. (2020).

At 30 days after planting the cuttings and rooted, they were definitively transferred to 2.6 L pots by using the same substrate.

The iron (Fe) treatments were conducted through foliar application of fertilizer, that is, 13% Fe-EDTA dissolved in distilled water. The Fe levels were equal to 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹. These levels were based on the optimal foliar fertilization recommendation proposed by El-Emary et al. (2018) and previous observation tests.

In Fe solution, the pH was adjusted closing to 5.0, which is the ideal range of solubility and efficacy of foliar application of fertilizer. The Fe application in *M. piperita* was proceeded at 10 days after acclimatization in substrate and 4 days after acclimatized in different irradiance conditions, that is, 50% (I_{50%}) and 100% of full sunlight (I_{100%}). Moreover, the evaluation was performed within 48 hours after Fe application, i.e. 47-day-old plants.

The foliar feeding was performed using the commercial product Agral® (Nonil Fenoxi Poli [Ethyleneoxy] Ethanol) as a spread agent in the 800 µL per liter of iron solution proportion.

The application used a manual carbon dioxide (CO₂) pressurized sprayer with a flow rate from 0.025 to 2500 gpm (0.09 to 9464 l/min) and 4000 PSI Fan Nozzle 276 Bar Pressure .

The Fe levels used in the different treatments were carried out on plants 44 days after sowing. The foliar spraying was applied in the morning (9:00 am) at average temperatures closing to 18 ° C and 80% relative humidity.

The plants were fertigated with Hoagland & Arnon nutrient solution 2, with ionic strength reduced to 70%, pH adjusted to 5.5 - 6.5 and electrical conductivity was maintained between 1.5 - 2.5 mS cm⁻¹, according to Gonçalves et al. (2020).

1.2.3 Evaluation of physiological variables

1.2.3.1 Gas exchange

The gas exchange evaluations were determined with a handheld photosynthesis system enclosed CO₂/H₂O and infrared gas analyzer (WALZ-GFS-3000FL model). The measurements were performed between 09:00 and 11:00 am; the plants were selected by repetition from each treatment, in which the 2nd or 3rd leaves were chosen and standardized, and the limbus were completely expanded and photosynthetically active. With regards to gas exchange, the following traits were evaluated: CO₂ assimilation rate (A , μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), transpiration rate (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹), stomatal conductance (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹) and internal CO₂ concentration in the leaf (C_i , μmol CO₂ mol⁻¹) (Caemmerer and Farquhar 1981).

The water use efficiency (WUE, μmol CO₂ (mmol H₂O)⁻¹) was determined by the relation between CO₂ assimilation and transpiration rate (A/E) according to Berry and Downton (1983). The instantaneous carboxylation efficiency of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (commonly known as Rubisco) was calculated by the ratio of CO₂ assimilation rate and CO₂ internal concentration in leaf (A/C_i) (Zhang et al. 2001).

The response curve of CO₂ assimilation rate versus photosynthetic photon flux density (PPFD) was drawn at intervals of approximately 300 μmol m⁻² s⁻¹ till 100 μmol m⁻² s⁻¹ and then, at intervals of 50 μmol m⁻² s⁻¹; thus, showing the PPFD (μmol of photons m⁻² s⁻¹) for the species (Fig. 1).

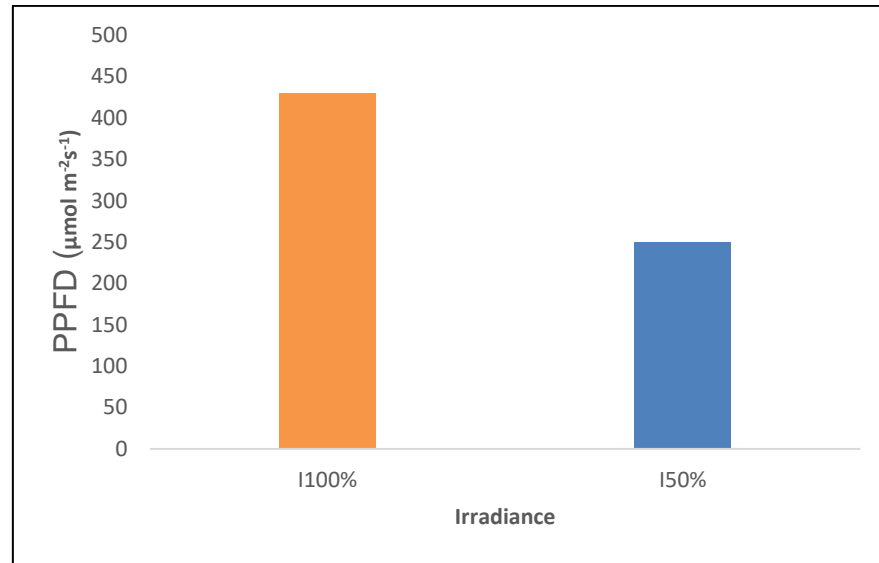


Fig. 1 Photosynthetic photon flux density (PPFD, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) of the experiment irradiance conditions: $I_{100\%}$ (full sunlight) and $I_{50\%}$ (50%)

1.2.3.2 Chlorophyll fluorescence a

The evaluations were performed in the morning with a pulse amplitude modulated (PAM) fluorometers coupled in a handheld photosynthesis system enclosed $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ and infrared gas analyzer (WALZ-GFS-3000FL model). The leaves were acclimated and covered with aluminum foil to exclude light for 30 minutes. Then, a saturation pulse ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at PPFD of 0.6 s) was applied to obtain the F_m (maximum fluorescence in dark adapted leaves) and F_m' (maximum fluorescence in light adapted leaves). In addition to the maximum fluorescence in light and dark adapted leaves, the values of F_o (minimum fluorescence in dark adapted leaves), F_o' (minimum fluorescence in light adapted leaves), F_v'/F_m' (quantum antenna efficiency), F_v/F_m (maximum photochemical efficiency), F_v' (variable fluorescence light adapted), F_v (variable fluorescence dark adapted), ETR (electron transport rate), qP (photochemical dissipation) and NPQ (non-photochemical quenching), according to Kitajima and Butler (1975); Bilger and Björkman (1990) and Schreiber and Klughammer (2008).

1.2.4 Evaluation of biochemical variables

1.2.4.1 Chlorophyll *a* and *b*, carotenoid and anthocyanin contents

The contents of chlorophylls (*a* and *b*), carotenoids and anthocyanins followed the methodology proposed by Sims and Gamon (2002).

1.2.4.2 Activities of antioxidant enzymes

Fully expanded and healthy leaves were selected, which were collected from 9:00 am to 10:00 am and placed in plastic bags, wrapped in aluminum foil, and then frozen in liquid nitrogen. These samples were stored in a freezer at - 80 °C.

The enzymatic extract for determining the activity of superoxide dismutase and peroxidase was obtained by following the methodology proposed by Kar and Mishra (1976). Therefore, 200 mg of fresh frozen leaf mass was macerated and frozen in liquid nitrogen. Then, sample was homogenized in 5 ml of cold potassium phosphate buffer (0.1M, pH 6.8) and the extract was centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes at 4 ° C. The obtained supernatants were separated in microtubes and frozen at -26 °C for further evaluation.

The quantification of total soluble proteins was determined according to an adaptation of the methodology proposed by Bradford (1976). The reaction consisted of 100 µL of enzymatic extract and 5000µL of Bradford reagent, composed of Coomassie Brilliant Blue G-250 0.01% (w/v), ethanol 4.7% (w/v) and phosphoric acid 8, 5% (m/v), which was conducted for 15 minutes, and the reading was performed on a spectrophotometer at 595 nm. To perform the standard curve, sample was diluted in 100 mg of casein in 50 mL of 0.5 mol L⁻¹ NaOH solution and the volume made up to 100 mL with deionized water. From this solution, the standard curve for the quantification of proteins was developed.

The activity of the superoxide dismutase enzyme (SOD, EC 1.15.1.1) was determined by the methodology described by Peixoto et al. (1999). The reaction was prepared in a dark environment, consisting of 50 µL of enzymatic extract and 2950µL of potassium phosphate buffer solution (50 mmol L⁻¹, pH 7.8) containing methionine (13 mmol L⁻¹), blue chloride of p-nitrotetrazolium (NBT, 75 µmol L⁻¹) riboflavin (2 µmol L⁻¹) and EDTA (100 nmol L⁻¹), totaling 3000µL. The reaction was conducted under light for 5 minutes and at room temperature. The inhibition of NBT photochemical reduction was evaluated in a spectrophotometer at 560 nm. The calculation of the specific activity of the enzyme was expressed in U mg⁻¹ of protein.

The activity of the peroxidase enzyme (PODs, EC 1.11.1.7) was determined as proposed by Teisseire and Guy (2000), using 30 μ L of the enzymatic extract, 500 μ L of potassium phosphate buffer (50 mmol L⁻¹, pH 6.5), 250 μ L of pyrogallol (1,2,3-benzenetriol, 20 mmol L⁻¹) and 220 μ L of hydrogen peroxide (H₂O₂, 5 mmol L⁻¹), totaling 1000 μ L. The reaction was maintained for 5 minutes and the purpurogallin formation was evaluated in a spectrophotometer, whose reading was performed at 430 nm. The specific activity of the enzyme was calculated using its molar extinction coefficient (2.5 mmol L⁻¹ cm⁻¹) and the activity expressed in μ mol of purpurogallin min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

1.2.5 Experimental design

A completely randomized design was adopted with five replications in a 5x2 factorial arrangement, that is, five Fe concentrations (equal to 0 [control], 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹) and two different irradiance conditions (50% [I_{50%}] and 100% [I_{100%}] of full sunlight). The evaluations started within 48 hours after Fe applications. The experimental portion consisted of a vessel containing a plant.

1.2.6 Statistical analysis

The results obtained were subjected to analysis of variance or regression analysis; the means were compared by the Tukey test at 5% probability.

1.3 Results

CO₂ curve

Mentha piperita L. plants show assimilation peak around 1000 μ mol photons m⁻² s⁻¹, with reduction according to increased PPFD; thus, becoming more pronounced with 2000 μ mol photons m⁻² s⁻¹. The drop in the CO₂ assimilation rate also occurred around 12 o' clock, due to the gradual closure of the stomata (Fig. 2).

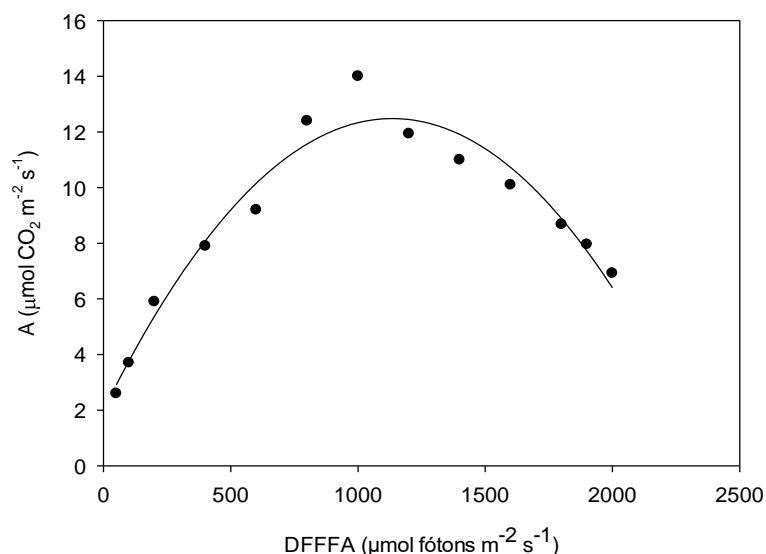


Fig. 2 CO₂ assimilation rate (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) due the radiation of photosynthetic photon flux density (PPFD, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) in *M. piperita* plants

With regards to the data from the curve, the period from 9 am to 11 am was defined to perform gas exchange evaluations, that is, a period when *M. piperita* plants had greater stomatal opening and, consequently, a higher rate of CO₂ assimilation. Bearing in mind the fact that the plants have a peak of CO₂ around 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 2), we adopted the amount of PPFD, according to the experimental conditions, at evaluation time (Fig. 1).

1.3.1 Effect of Fe application and solar radiation intensity on chlorophyll content

Under high irradiance conditions, there were no differences for chlorophyll *a* in the presence or absence of Fe applications, whereas the 0.5 and 1 g L⁻¹ of Fe applications increased the values of chlorophyll *a* in I_{50%}. The results of chlorophyll *b* are like chlorophyll *a* under high irradiance conditions, since there are no changes in chlorophyll *b* levels associated to Fe applications. Moreover, 0.5 and 1 g Fe L⁻¹ applications increased chlorophylls *b* levels under low irradiance conditions. Plants kept in shaded environments cause more pronounced values of chlorophyll *b* (Figs. 3A, B).

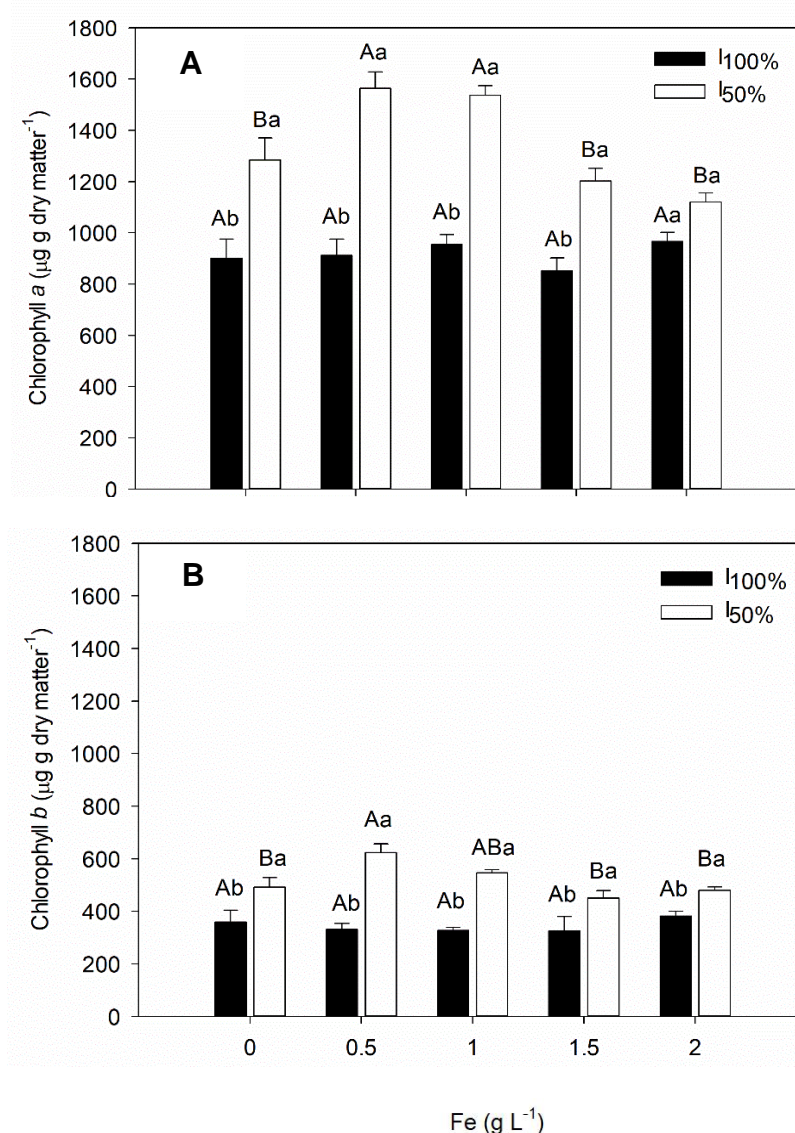


Fig. 3 Average levels of chlorophyll *a* (A) and *b* (B) ($\mu\text{g g fresh matter}^{-1}$) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L^{-1} of Fe under two irradiance conditions, $I_{100\%}$ (full sunlight) and $I_{50\%}$ (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test ($P < 0.05$). Values represent means \pm standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

Nevertheless, Fe application did not change the values of carotenoids levels under high irradiance condition. But the Fe application at the highest concentrations (i.e., 1.5 and 2 g L^{-1}) reduced the carotenoid values in a shaded environment ($I_{50\%}$) (Fig. 4A). Thus, $I_{50\%}$ increases carotenoids values, similarly to those observed in chlorophylls *a* and *b* (Figs. 4A; 3 A, B).

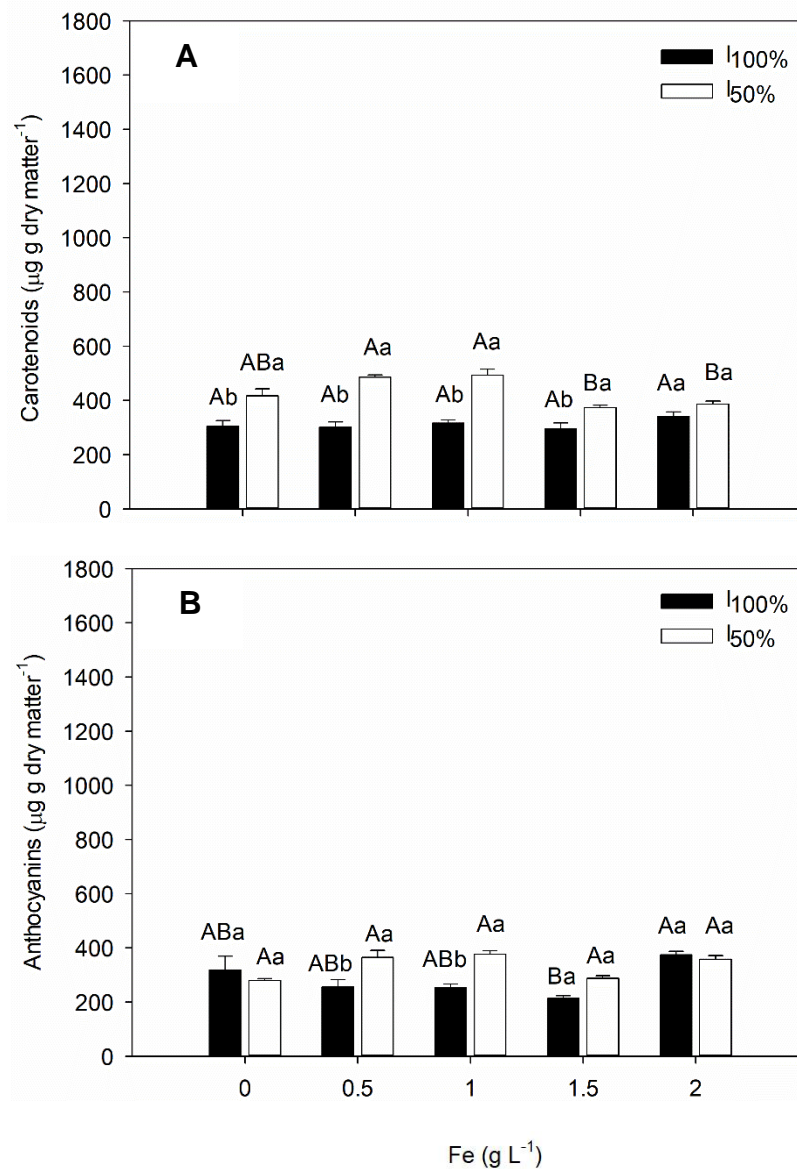


Fig. 4 Average levels of carotenoids (A) and anthocyanins (B) ($\mu\text{g g fresh matter}^{-1}$) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L^{-1} of Fe under two irradiance conditions, I_{100%} (full sunlight) and I_{50%} (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test ($P < 0.05$). Values represent means \pm standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

The values of anthocyanins reveal that Fe application (1.5 g L^{-1}) reduced the values of photoprotectors in I_{100%}, when compared to Fe application (2 g L^{-1}) in I_{50%}. The Fe application does not differ between plants in the presence or absence of foliar fertilization. Anthocyanins values are generally higher under shaded environment and thereby when the Fe application (0.5 and 1 g L^{-1}) was analyzed. The Fe applications showed no changes for anthocyanin values in I_{100%} (Fig. 4B).

1.3.2 Effect of Fe application and solar radiation intensity on gas exchange variables

With regards to the treatments within 48 hours after Fe application, it was found that Fe application did not influence CO₂ assimilation efficiency (*A*) in plants. However, the results show the importance of light intensity (*I*_{100%}) in increasing photosynthesis efficiency in plants, that is, the rate of *A* was almost twice as high (10 μmol m⁻²s⁻¹) than those in shaded condition (5.60 μmol m⁻²s⁻¹). The Fe application at the lowest concentration (0.5 g L⁻¹) impaired the stomatal opening, but did not reflect in *A*. Although the irradiance conditions did not change the stomatal conductance (*g*_s), it also did not restrict CO₂ uptake and neither reduced the photosynthetic rate (Table 1).

Table 1 CO₂ assimilation (*A*, μmol m⁻² s⁻¹), stomatal conductance (*g*_s, mol m⁻² s⁻¹), transpiration (*E*, mmol m⁻² s⁻¹) and carboxylation efficiency (*A/Ci*) in *M. piperita* plants, subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹ of Fe under two irradiance conditions, *I*_{100%} (full sunlight) and *I*_{50%} (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Values represent means ± standard deviation of 5 repetitions

Fe (g L ⁻¹)	<i>A</i> (μmol m ⁻² s ⁻¹)	<i>g</i> _s (mol m ⁻² s ⁻¹)	<i>E</i> (mmol m ⁻² s ⁻¹)	<i>A/Ci</i>
0	8.20±0.58	0.22a± 0.011	2.26ab±0.10	0.024±0.002
0.5	7.89±0.65	0.17b±0.008	1.96b±0.06	0.026±0.003
1	7.39±0.43	0.20ab±0.005	2.39a±0.08	0.023±0.002
1.5	6.83±0.61	0.18ab±0.010	2.28ab±0.06	0.021±0.002
2	7.71±0.67	0.18ab±0.009	2.26ab±0.07	0.024±0.002
Irradiance (%)				
<i>I</i> _{100%}	9.59a±0.13	0.20a±0.004	2.11b±0.03	0.03a±0.0004
<i>I</i> _{50%}	5.62b±0.09	0.18b±0.0029	2.35a±0.02	0.01b±0.0005
Significance				
Fe	n.s.	<0.005	<0.005	n.s.
Irradiance	<0.001	<0.005	<0.005	<0.001
Fe X irradiance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Averages followed by the same letter, in the column, do not differ significantly by the Tukey test at 5% significance.

n.s - not significant differences, ± standard error.

The treatments with the lowest Fe concentration (0.5 g L⁻¹) had the lowest *E*, compared to plants with 1 g L⁻¹ of Fe. However, it is quite similar to the results of *g*_s; therefore, there is a tendency to increase in water use efficiency (WUE) in a light environment (Table 1; Fig. 5B), since WUE comes by dividing the values of the rate of *A* over the rate of *E*; thus, enabling

water storage to be used in other vital functions for these plants metabolism. E , which is directly related to g_s , showed higher values in a shaded environment (Table 1).

The presence of Fe does not influence the carboxylation efficiency (A/C), which is consistent with the results of A , while the presence of light is essential to increase such activity (Table 1).

In $I_{100\%}$, the Fe application at the lowest (0.5 g L^{-1}) and highest (2 g L^{-1}) dose, reduces the internal CO_2 concentration of (Fig. 5A); consequently, correlating with the reduction of g_s (Table 1). In $I_{50\%}$, the application of Fe does not alter the internal CO_2 concentration (Fig. 5A). In general, the highest values of internal CO_2 are observed in plants exposed to low irradiance conditions, due to the lower activity of the rubisco enzyme (RuBP) (Fig. 5A, Table 1).

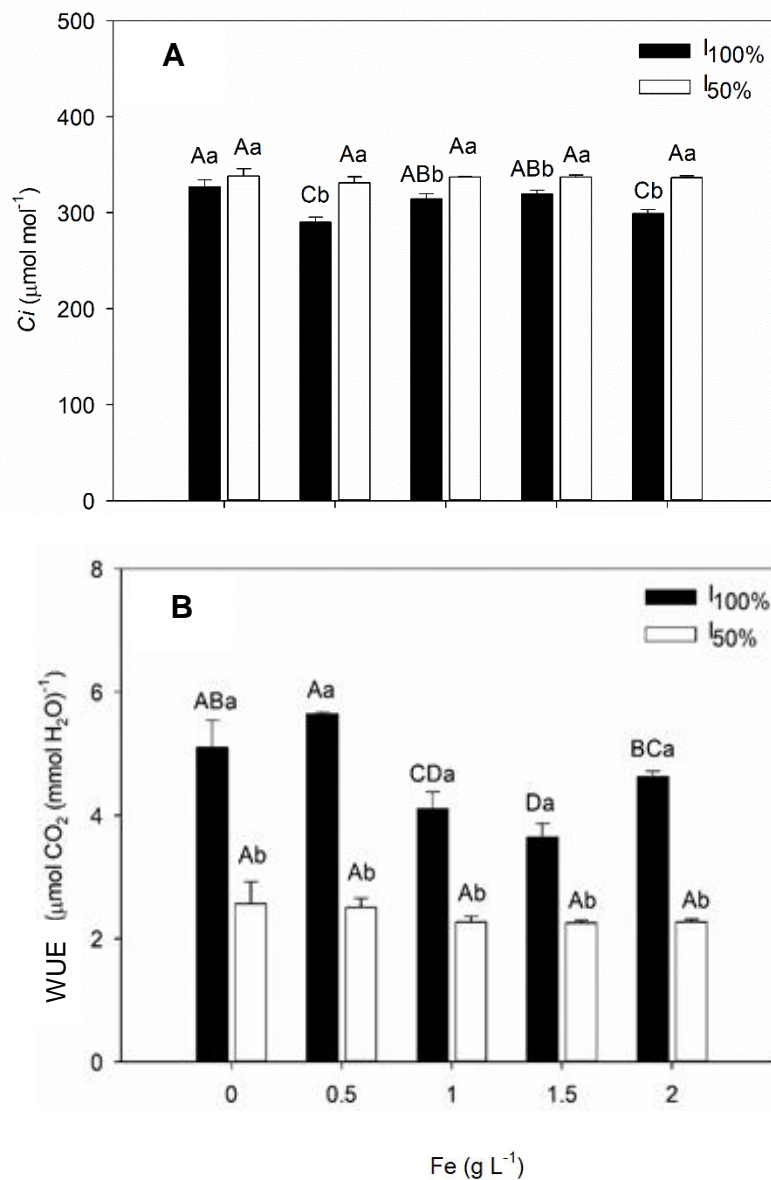


Fig. 5 Internal CO_2 concentration (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) (A) and water use efficiency (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) (B) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5

and 2 g L⁻¹ of Fe under two irradiance conditions, I_{100%} (full sunlight) and I_{50%} (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test (P < 0.05). Values represent means ± standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

In I_{100%}, the Fe concentration of 1.0 and 1.5 g L⁻¹ reduced WUE in *M. piperita* plants. However, the lowest and highest concentration of iron did not differ from those that received Fe applications in both irradiance conditions (Fig. 5B). In addition, we can say that A influenced the WUE in high irradiance conditions (Table 1; Fig. 5B). Regardless of the Fe application, *M. piperita* plants do not change in both WUE and internal CO₂ concentration in shaded condition (Figs. 5A, B).

1.3.3 Effect of Fe application and solar radiation intensity on chlorophyll a fluorescence variables

For chlorophyll a fluorescence variable, the light factor overlaps the applications with Fe element, revealing that this species is more sensitive to irradiance changes when the photosynthetic apparatus is affected. In general, Fe application infers on the ability to maintain the photosynthetic apparatus in *M. piperita* plants subjected to different irradiance conditions (Table 2).

The Fe application and irradiance conditions do not modify the maximum quantum yield (F_v/F_m), as well as it does not modify the minimum fluorescence in dark adapted leaf (F_o). However, the presence of greater irradiance (I_{100%}) increases F_o . The lowest values of the F_v/F_m ratio occurred in plants subjected to full sunlight (I_{100%}) (0.678) and, then, increasing in conditions of shaded environment (I_{50%}), that is, 0.736. Thus, the reduction in the quantum efficiency of PSII occurred due to the light intensity, which can cause photoinhibition (Table 2).

Table 2 Minimum fluorescence in dark adapted leaf (F_o) and to the light adapted leaf (F_o'), maximum fluorescence of dark adapted leaf (F_m) and to the light adapted leaf (F_m'), quantum antenna efficiency (F_v'/F_m'), maximum photochemical efficiency (F_v/F_m), variable fluorescence adapted to light (F_v) and electron transport rate (ETR) in *M. piperita* plants, subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹ of Fe under two irradiance conditions, I_{100%} (full sunlight) and I_{50%} (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Values represent means \pm standard deviation of 5 repetitions

Fe (g L ⁻¹)	F_o	F_o'	F_m	F_m'	F_v'/F_m'	F_v/F_m	F_v	ETR
0	149.48 \pm 12.49	391.51 \pm 7.27	2096.04 \pm 23.24	1353.15 \pm 71.88	0.70 \pm 0.011	0.92 \pm 0.07	961.63 \pm 65.33	69.20 \pm 4.66
0.5	126.58 \pm 7.56	381.21 \pm 9.79	2140.12 \pm 43.65	1445.65 \pm 23.65	0.73 \pm 0.030	0.94 \pm 0.003	1045.65 \pm 97.80	72.30 \pm 4.79
1	124.71 \pm 9.28	395.15 \pm 6.85	2032.01 \pm 72.92	1362.74 \pm 72.05	0.70 \pm 0.010	0.94 \pm 0.005	967.58 \pm 65.47	70.05 \pm 4.24
1.5	135.66 \pm 3.67	366.31 \pm 8.59	2004.48 \pm 34.10	1257.15 \pm 69.38	0.68 \pm 0.012	0.93 \pm 0.002	823.82 \pm 64.84	69.88 \pm 4.55
2	116.49 \pm 5.04	399.90 \pm 3.99	2175.29 \pm 30.97	1456.35 \pm 21.84	0.72 \pm 0.002	0.94 \pm 0.002	1056.45 \pm 18.49	78.11 \pm 5.26
Irradiance (%)								
I _{100%}	136.02a \pm 3.96	371.76b \pm 2.08	1980.59b \pm 15.59	1216.16b \pm 17.66	0.67b \pm 0.004	0.93 \pm 0.002	818.20b \pm 17.93	88.36a \pm 0.93
I _{50%}	125.14b \pm 2.50	401.88a \pm 3.27	2198.58a \pm 13.25	1533.86a \pm 19.88	0.73a \pm 0.007	0.94 \pm 0.001	1123.85a \pm 25.86	55.46b \pm 0.46
Significance								
Fe	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Irradiance	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	n.s.	<0.001	<0.001
Fe X irradiance	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Averages followed by the same letter, in the column, do not differ significantly by the Tukey test at 5% significance.

n.s - not significant differences, \pm standard error.

The higher the light intensity there are ($I_{100\%}$), the more the decrease in the values of F_m , F_o' , F_m' , F_v/F_m' and F_v' . The decline in the values of the maximum fluorescence in dark adapted leaf (F_m) and the reduction in F_v/F_m' are associated to the reduction of PSII ability to reduce the primary acceptor, i.e. quinone A; consequently, impacting in the photochemical reactions. For F_m , the average values in $I_{100\%}$ and $I_{50\%}$ were equal to 1980.594 and 2198.585, respectively. The values of ETR in $I_{50\%}$ and $I_{100\%}$ were 55.460 and 88.365, respectively. For F_v' , F_m' and F_o' , the values were higher in $I_{50\%}$ (Table 2).

M. piperita plants grown without foliar fertilizer exhibited a lower qP, when compared to those sprayed with 2 g L^{-1} of Fe. In the present study, there are no changes in qP in the different irradiance conditions ($I_{100\%}$ and $I_{50\%}$) (Fig. 6).

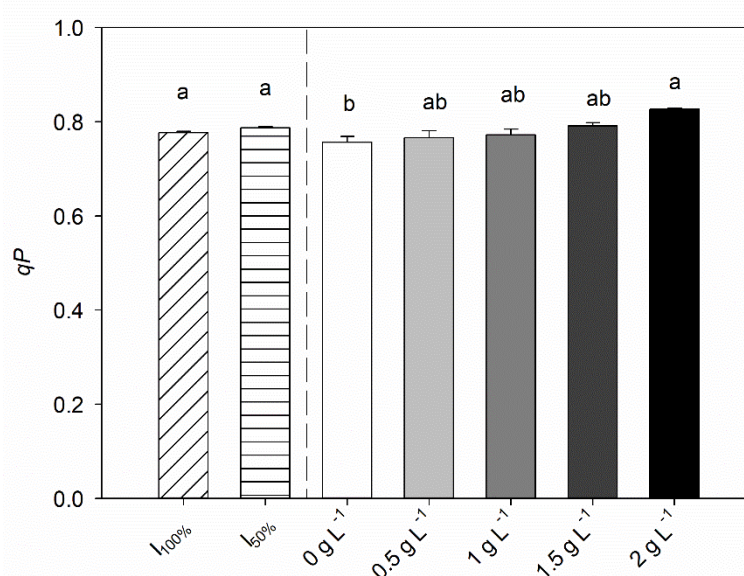


Fig. 6 Photochemical extinction coefficient values (qP) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L^{-1} of Fe under two irradiance conditions, $I_{100\%}$ (full sunlight) and $I_{50\%}$ (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test ($P < 0.05$). Values represent means \pm standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

The results of NPQ shows that Fe application at the highest concentration continues to reduce the NPQ values, similarly to the $I_{50\%}$, in which the NPQ values were lower. NPQ reduces the efficiency of photochemical reactions and is one of the main components of photoprotection, as observed in the present study in a full sunlight condition (Fig. 7A).

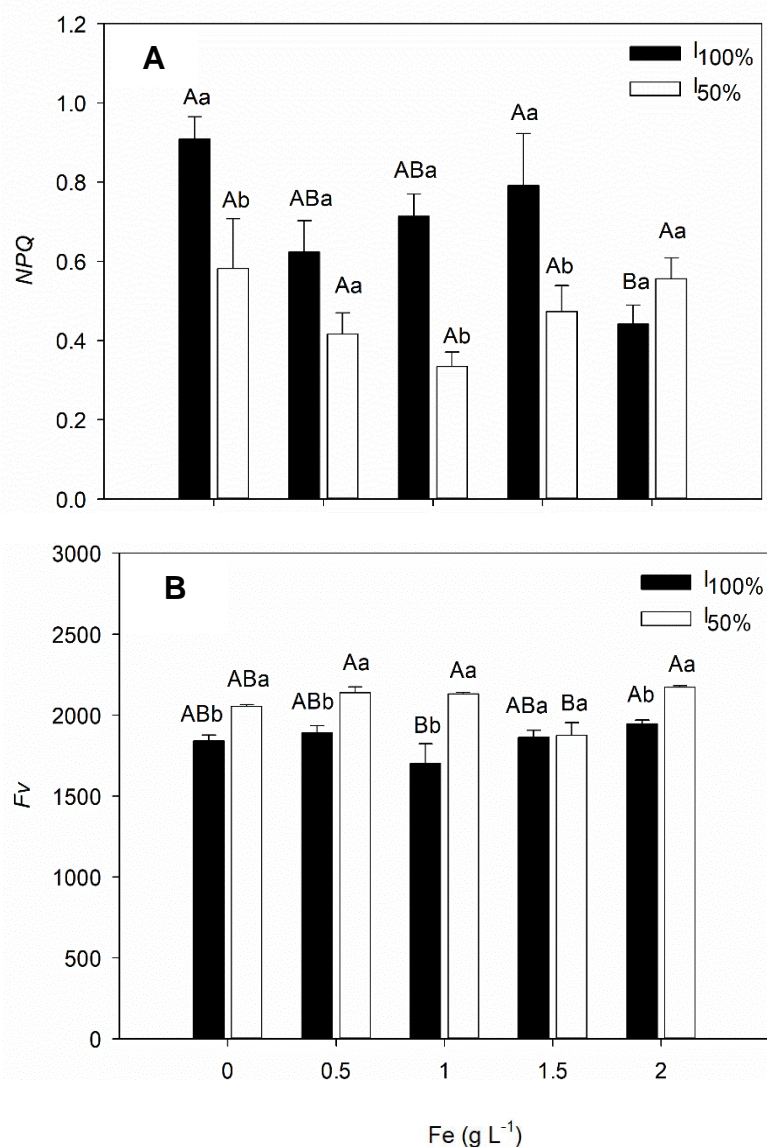


Fig. 7 Non-photochemical quenching (NPQ) (A) and variable fluorescence (F_v) (B) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹ of Fe under two irradiance conditions, I_{100%} (full sunlight) and I_{50%} (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test ($P < 0.05$). Values represent means \pm standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

In relation to F_v , I_{100%} and 1 g L⁻¹ of Fe causes a reduction in the average values of F_v , compared to 2 g L⁻¹. There was a linear decrease in the values of F_v and, then, an increase in the level of irradiance, that is, with a value of 1848.1824, while the value of F_v is equal to 2073.371 in I_{50%} (Fig. 7B).

1.3.4 Effect of Fe application and solar radiation intensity on antioxidant system variables

Within 48 hours after Fe application, the peroxidase enzyme showed no detectable differences between Fe treatments in $I_{100\%}$, that is, all treatments showed similar activities. In $I_{50\%}$, 2 g L⁻¹ of Fe increased peroxidase activity, that is, the combination of these factors can disrupt membrane curvature. Furthermore, the average values of POD were higher in this condition with 2 g L⁻¹ of Fe, compared to $I_{100\%}$ with 2 g L⁻¹ of Fe (Fig. 8A).

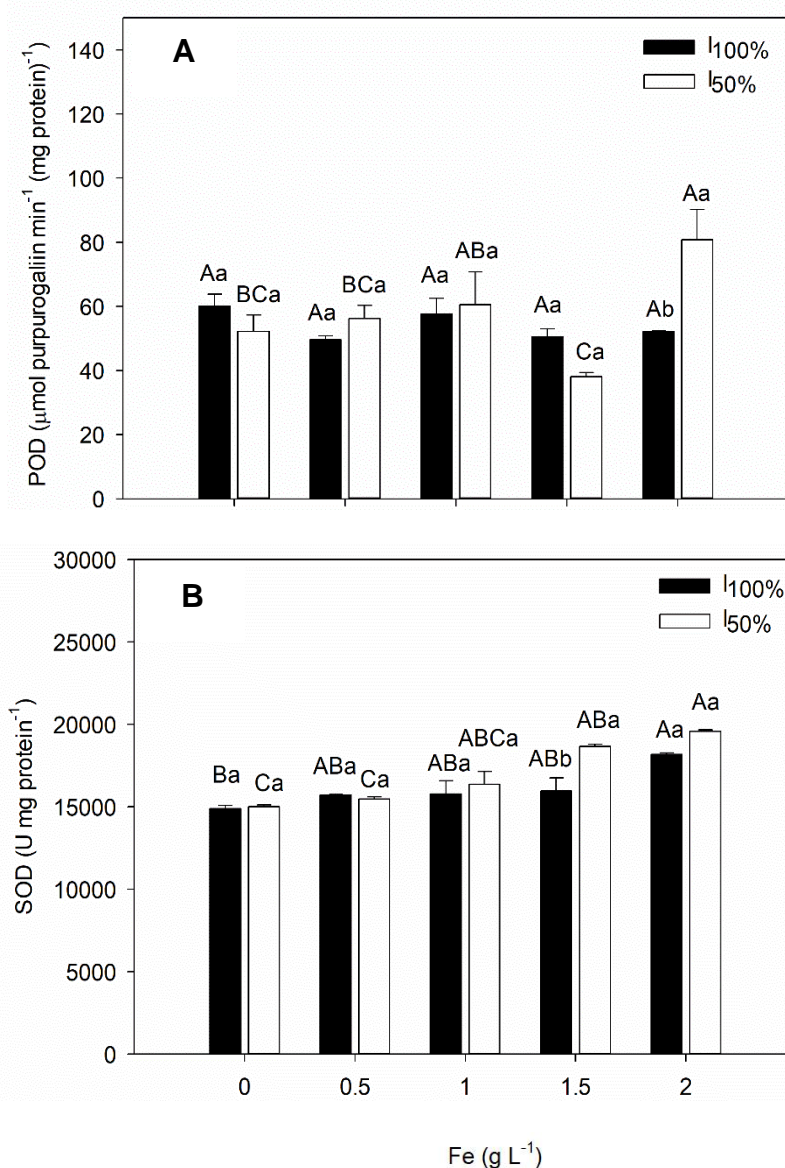


Fig. 8 Activity of the enzyme peroxidase (POD, µmol of purpurogallin min⁻¹ mg⁻¹ of protein) (A) and superoxide dismutase (SOD, U mg⁻¹ of protein) (B) in *M. piperita* plants subjected to treatments with 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 g L⁻¹ of Fe under two irradiance conditions, $I_{100\%}$ (full sunlight) and $I_{50\%}$ (50% irradiance), within 48 hours after Fe application. Letters show the difference between treatments by the Tukey test (P < 0.05). Values represent means ±

standard deviation of 5 repetitions. Uppercase letters compare Fe concentration averages and lowercase letters compare irradiance averages

Within 48 hours after Fe application, it was noticed that the $I_{100\%}$ and the highest Fe concentration increased SOD activity, whereas the two highest concentrations of Fe (1.5 and 2 g L⁻¹) increased this enzyme activity in shaded environment. With regards to the chemical stress signaling, SOD remained higher in plants in the lowest light condition ($I_{50\%}$) (Fig. 8B).

1.4 Discussion

Peppermint plants (*M. piperita* L.) have higher gas levels and CO₂ assimilation (*A*) between 9 and 11 am. Therefore, it appears that CO₂ absorption and photosynthetic yield increases proportionally to the continuously increase in radiation (Larcher 2006; Schock et al. 2014). However, the plant does not respond, in photosynthetic terms, under intense radiation; thus, reaching the so-called saturation point (Fig. 2). At this point, the plant is no longer limited by light, but by other factors such as the activity of Rubisco (RuBP), an enzyme responsible for assimilation and/or the CO₂ availability (Vieira et al. 2010).

The Fe application does not modify the CO₂ assimilation rate in *M. piperita* plants (Table 1). Although this element is closely related to the photosynthetic apparatus, it is therefore a basic constituent of chloroplasts (Jeong and Guerinot 2009). Plants that received 0.5 g L⁻¹ of Fe also tend to present a reduction in the rate of transpiration (*E*), minimizing possible damage resulted from this process (Table 1).

The results reveal the importance of the presence of light ($I_{100\%}$) in increasing the efficiency of photosynthesis, despite not modifying the *gs*. Therefore, *M. piperita* plants have a specific and different response to gas and *A* in different treatment conditions (Table 1). Kumar et al. (2013) reported that low irradiance causes a reduction in *gs* and liquid photosynthesis rate and stomatal responses are slower than *A*, which can cause an imbalance between *gs* and *A*. In addition, the loss of water vapour, that is, perspiration (*E*), is not proportional to *gs*. If no other environmental factors limit gas exchange, after the point of light compensation, the absorption of CO₂ linearly follows the increase in radiation until reaching the saturation point (Larcher 2006; Floss 2008) (Table 1).

The Fe application does not alter *A/Ci* and, therefore, like the result of *A*. While, the presence of light is essential to increase the fixation and use of CO₂ by RuBP (Table 1; Fig. 4B). This result can be justified, since the higher incidence of radiation intensifies the plants metabolism, which reflects in greater efficiency of fixation and use of CO₂, justifying even

higher values of internal CO₂ in plants under shading conditions, due to the low RuBP activity (Table 1; Fig 5A) and may also be related to the reduction in *g_s* at the same time, as it perceives a tendency to increase under high irradiance conditions (I_{100%}) (Table 1).

In shadowless condition (I_{100%}), the application of the lowest concentration of Fe (0.5 g L⁻¹) and the highest (2 g L⁻¹) reduces the internal CO₂ concentration (Fig. 5A), coinciding in part by the reduction in *g_s*. In conditions of shaded environment, regardless of the Fe concentration, WUE and *C_i* do not change (Figs. 5A, B). However, it increases the values of chlorophyll *a* and *b*, with 0.5 and 1 g L⁻¹ of Fe in I_{50%} (Figs. 3 A, B). Thus, the presence of Fe affects the production of photosynthetic pigments, confirming the importance of such element for chlorophyll biosynthesis (Msilini et al. 2011). Pinto et al. (2016) found a reduction in the levels of chlorophylls *a* and *b* in rice cultivars after seven days of exposure to Fe (7 mM), that is, the applications of 0.5 and 1 g L⁻¹ of Fe in the present study do not cause toxicity to the species.

The I_{50%} condition increases the carotenoid values, similarly to those observed for chlorophylls *a* and *b* (Fig. 4A; Figs. 3A, B). The reductions in the content of these light collectors demonstrate their possible degradation due to the high light intensity. In addition, the increase in the levels of chlorophylls in the leaves in shading condition characterizes a plant strategy to this limiting condition, that is, of less incident photosynthetically active radiation. Thus, reductions in carotenoids reveal that excess energy caused the excitation of chlorophyll to dissipate to avoid photoinhibition damage. Souza et al. (2016) found in plants such as *Heliconia psittacorum* cv. Golden Torch and *H. bihai* cv. *Humilis* that chlorophyll *a*, *b* and total indices were higher in treatments corresponding to 50% shading, compared to those with higher light levels. These authors also reinforce that full sunlight can harm or inactivate the photosynthetic system (photoinhibition). Wondracek et al. (2011) observed higher values of carotenoids under high irradiance, due to their action as a mitigating agent for the photooxidation of chlorophylls.

In this study, the responses of anthocyanins are dependent on the environment and Fe concentration. The association of 0.5 and 1 g L⁻¹ of Fe and I_{50%} increased anthocyanins values, but a reduction was observed at 1.5 g L⁻¹ in I_{100%}. Anthocyanins were therefore higher in shaded environment (Fig. 4B). Thus, the changes of light exposure in cultivation area provide adjustments to the photosynthetic apparatus of *M. piperita* plants; thus, resulting in greater efficiency in the absorption and transfer of energy to the photosynthetic processes.

The fluorescence of chlorophyll *a* is strongly influenced by the amount of light (Baker and Rosenqvist 2004; Pietrini et al. 2005), according to the values of *F_m*, *F_o'*, *F_o*, *F_m'*, *F_v'/F_m'* and *F_v'* (Table 2), demonstrating that the species is more sensitive to irradiance changes than Fe application. Regarding the high irradiance (I_{100%}), this result can be explained because the

plant has a limit of light energy absorption capacity (Gonçalves et al. 2012), possibly due to the saturation of photosynthetic machinery under high irradiance conditions.

The lowest values of the Fv/Fm ratio occurred in plants subjected to the full sunlight exposure (0.678), increasing under shaded environment (0.736) (Table 2). Maximum quantum yield (Fv/Fm) is widely used to detect disturbances induced by stress in the photosynthetic apparatus (Maxwell and Johnson 2000; Baker and Rosenqvist 2004). In non-stressful conditions, the value of maximum quantum efficiency Fv/Fm varies between 0.78 and 0.83 for most species (Osmond 1994). Pinto et al. (2016) found in rice cultivar that Fe application reduces Fv/Fm and increases Fo values ($p < 0.05$). Such changes also occurred with the reduction of chlorophyll values. These changes also indicate impairment in the energy transfer from the antenna pigments to the reaction center; and an increase in susceptibility to photoinhibition with a reduction in the efficiency of PSII in primary photochemical reactions (Table 2; Figs. 3 A, B).

The rates of ETR of *M. piperita* plants considerably increase in conditions of greater irradiance, presenting a pattern like the CO_2 assimilation curve (Table 2; Fig. 2). The lower ETR values were not associated with the qP values, suggesting greater use of the radiant energy absorbed in photochemical processes, as well as greater energy dissipation in the form of heat, as observed by the decreases in Fv'/Fm' ; therefore, the Fv/Fm ratio remained above 0.90 (Table 2; Fig. 6), photosynthetic photoinhibition under excess Fe is unlikely to have occurred (Logan et al. 2007). Rezende (2012) found a reduction in the Fv/Fm and ETR ratio in jatoba plants under irradiance of $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$, indicating that the species had little protection against light stress.

High Fe application (2 g L^{-1}) increases qP and NPQ (Figs. 6, 7A). Pinto et al. (2016) found that the excess Fe also reduced the NPQ values, even after the first day of plant exposure. NPQ reduces the efficiency of photochemical reactions and is one of the main photoprotection components, as observed in the present study under full sunlight ($I_{100\%}$) (Fig. 7A). However, the excess energy can reduce quantum efficiency and lead to photoinhibition under certain environmental conditions (Essemine et al. 2012; Kim and Apel 2013; Sáez et al. 2013; Wituszynska et al. 2013). Another parameter of rapid fluorescence kinetics is called variable fluorescence (Fv). Fv represents an increase in fluorescence from Fo to Fm (Campostrini 2001). Fv has been widely used as a measure of the efficiency of PSII photochemistry (Krause and Weis 1991; Govindjee 2004), since PSI fluorescence is very low and constant (Giovagnetti et al. 2015), the $I_{100\%}$ condition causes a reduction in the mean Fv values (Fig. 7B).

The $I_{50\%}$ and 2 g L^{-1} of Fe increased the POD activity. In $I_{100\%}$, the Fe application also increased SOD activity, similarly, to shaded environment (Figs. 8A, B). In the presence of Fe,

POD and SOD must be co-regulated during stress because an imbalance in their ratio can cause the conversion of H₂O₂ into hydroxyl radicals, via Fenton reactions (Kültz 2005), affecting the integrity of the membranes. The results indicate that the species studied increases the activity of antioxidant enzymes against ROS in shaded environment, possibly due to the more unfavorable condition for the species production, including the photosynthetic photon flux density (Chang et al. 2013).

1.5 Conclusions

The responses to different iron concentrations in *M. piperita* plants are related to the antioxidant system and the plasticity in the light use. The greater sensitivity to the higher iron concentrations are caused by the impairment in the internal CO₂ concentration, water use efficiency, non-stomatal limitation as triggered by oxidative damage and, consequently, inability to extinguish the excess energy between the photosystems. The levels of chlorophyll (*a* and *b*), carotenoids and anthocyanins can be initially used as important markers of the species in the environment. In addition, peroxidase and superoxide dismutase play an associated role to minimize oxidative damage.

The responses of *M. piperita* plants are more sensitive to the variation of irradiance conditions than Fe application in a short evaluation period.

References

- Asensio AC, Gil-Monreal M, Pires L, Gogorcena Y, Aparicio-Tejo PM, Moran JF (2012). Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *J. Plant Physiol* 169:1253–1260.
- Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Berry JA, Downton WJS (1983) Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants. *Plant Physiology* 75:364-368.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25:173–185.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

- Brant RS, Pinto JEBP, Rosa LF, Albuquerque CJB, Feri PH, Corêa RM (2009) Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. *Ciência Rural* 39:1401-1407.
- Briat JF, Ravetk, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* 105:811-822.
- Caemmerer SV, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387.
- Campostrini E (2001) Fluorescência da clorofila a: Considerações teóricas e aplicações práticas. Univ. Estadual do Norte Fluminense. Apostila.
- Chang HL, Kang CY, Lee TM (2013) Hydrogen peroxide production protects *Chlamydomonas reinhardtii* against light-induced cell death by preventing singlet oxygen accumulation through enhanced carotenoid synthesis. *Journal of plant physiology* 170:976-986.
- Chen L, Ding C, Zhao X, Xu Junxu, Mohammad AA, Wang S, Ding Y (2015) Differential regulation of proteins in rice (*Oryza saliva* L.) under iron deficiency. *Plan Cell Reports* 34:83-96.
- Da Costa PHA, Neto ADA, Bezerra MA, Prisco JT, Gomes-Filho E (2005) Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Brazilian J Plant Physiol* 17:353–362
- El-ernary FA, Abd EL-AAL, M. M, Abd EL-Dayem HM, Ismaeil Faten HM, Abou-Shlell MK (2018) Morphophysiological and anatomical studies on moringa (*Moringa oliefera* L.). *Plant Archives* 18:1421-1442.
- Essemine J, Govindachary S, Joly D, Ammar S, Bouzid S, Carpentier R (2012) Effect of moderate and high light on photosystem II fuction in *Arabidopsis thaliana* depleted in digalactosyl-diacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1817:1367-1373.
- Floss EL (2008) Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo do que está por trás do que se vê. 4. ed. atualiz. ampl. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 733 p.
- Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, Savirón M, Reyt G, Gaymard F, Briat JF (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytologist* 201:155-167.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Giovagnetti V, Ware MA, Ruban AV (2015) Assessment of the impact of photosystem I chlorophyll fluorescence on the pulse-amplitude modulated quenching analysis in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res* 125: 179–189.

- Gonçalves JFC, Melo EGF, Silva CEM, Ferreira MJ, Justino GC (2012) Estratégias no uso da energia luminosa por plantas jovens de *Genipás pruceana* Steyererm submetidas ao alagamento. *Acta Botanica Brasilica* 26:391-398.
- Gonçalves FCM, Parreiras NS, Campos FG, Mantoan LOB, Boaro CSF (2020) Exogenous salicylic acid modifies gas exchange and biomass production of *Mentha x piperita* L. *Australian Journal of Crop Science* 14:98-107.
- Govindjee (2004) Chlorophyll a fluorescence: a bit basics and history. In: PAPAGEORGIU, G.C.; GOVINDJEE (Ed.). *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, Netherlands, p.1-42.
- Grisi MCM et al (2006) Avaliação de genótipos de Menta (*Mentha* spp) nas condições do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8:33-39.
- Habibi GE (2018) Effects of mild and severe drought stress on the biomass, phenolic compounds production and photochemical activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *Acta Agric Slov* 111:463-476.
- Jeong J, Guerinot ML (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 14:280-285.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
- Khalid et al (2019) Effect of shade treatments on morphology, photosynthetic and chlorophyll fluorescence characteristics of soybeans (*Glycine max* L. Merr.) - 2551 - *Applied Ecology And Environmental Research* 17:2551-2569.
- Kim C, Apel K (2013) Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity. *Photosynthesis Research* 116:455-640.
- Kitajima M, Butler WL (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 376:105–115.
- Kobayashi T, Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63:131-152.
- Kong DX, Li YQ, Wang ML, Bai M, Zou R, Tang H, Wu H (2016) Effects of light intensity on leaf photosynthetic characteristics, chloroplast structure, and alkaloid content of *Mahonia bodinieri* (gagnep.) laferr. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:120.
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Reviews Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 42:313-349.
- Kültz D (2005) Molecular and Evolutionary bases of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology* 67:225–257.

- Kumar P, Pal M, Joshi R, Sairam RK (2013) Yield, growth and physiological responses of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes to waterlogging at vegetative stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19:209-220.
- Larcher W (2006) *Ecofisiologia vegetal*. 3 ed. São Carlos: Rima, 2006. 550p.
- Logan BA, Adams WW III, Demmig-Adams B (2007) Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Funct Plant Biol* 34: 853–859.
- López-Millán AF, Grusak MA, Abadía A, Abadía J (2013) Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science* 4:1-8.
- Mahender A, Swamy BPM, Anandan A, Ali J (2019) Tolerance of Iron Deficient and -Toxic Soil Conditions in Rice. *Plants*, [s. l.] 8:31.
- Malaquias G et al (2014) Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* 7:50-68.
- Martins JR, Alvarenga AA, Castro EM, Silva APO, Oliveira C, Alves E (2009) Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. *Ciência Rural* 39:82-87.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-668.
- Msilini N, Zaghdoudi M, Govindachary S, Lachaâl M, Ouerghi Z, Carpentier R. 2011. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution and electron transfer from the quinone acceptor QA – to QB by iron deficiency. *Photosynthesis Research* 107: 247-256.
- Ni Yu-Wan, Lin Kuan-Hung, Chen Kai-hsien, Wu Chun-Wei, Chang Yu-Sen (2020) Flavonoid Compounds and Photosynthesis in *Passiflora* Plant Leaves under Varying Light Intensities. *Plants* 9: 633.
- Osmond CB (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. (Ed.). *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Lancaster: Scientific Publishers, p.1-24.
- Peixoto HPP, Cambraia J, Sant'anna R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in *Sorghum*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:137-143.
- Pereira EG, Oliva MA, Rosado-Souza L, Mendes GC, Colares DS, Stopato CH, Almeida AM (2013) Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Science* 201-202:81-92.
- Pietrini F, Chaudhuri D, Thapliyal AP, Massacci A (2005) Analysis of chlorophyll fluorescence transients in mandarin leaves during a photo-oxidative cold shock and recovery. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106:189-198.

- Pinto SS, Souza AE, Oliva MA, Pereira EG (2016) Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Scientia Agricola* 73:217-226.
- Pompelli MF, Martins SCV, Agnaldo WCA, Chaves RM, Damatta FM (2010) Photosynthesis and photoprotection in Coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *Journal of Plant Physiology* 167:1052-1060.
- Rezende SL (2012) Alterações fotossintéticas de plantas jovens de jatobá em condições contrastantes de irradiâncias e disponibilidade hídrica. Dissertação, Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO.
- Robello E, Galatro A, Puntarulo S (2007) Iron role in oxidative metabolism of soybean axes upon growth effect of iron overload. *Plant Sci* 172:939-947
- Sáez PL, Bravo LA, Latsague MI, Toneatti MJ, Sánchezolarte M, Ríos DG (2013) Light energy management in micropropagate plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. *Plant Science* 201-202:12-24.
- Schock AA, Ramm A, Martinazzo EG, Silva DM, Bacarin MA (2014) Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-mansão cultivadas em diferentes condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18:3-9.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Registro contínuo de extinção de fluorescência de clorofila fotoquímica e não fotoquímica com um novo tipo de fluorômetro de modulação. *Photosynthesis Research* 10:51-62.
- Schreiber U, Klughammer CH (2008) Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields of PS I and PS II: analysis of heat-induced limitations measured by Maxi-Imaging-PAM and DualPAM-100. *PAM Application Notes* 1:15–18.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botany* 1–26.
- Sims DA, Gamon JA (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.
- Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62:1340–1350.
- Siqueira JBV et al (2017) Uso de plantas medicinais por hipertensos e diabéticos de uma estratégia saúde da família rural. *Revista Contexto & Saúde* 17.

- Souza RR, Cavalcante MZB, Silva EM, Amaral GC, Brito LPS, Avelino RC (2016) Alterações morfofisiológicas e crescimento de helicônias em função de diferentes ambientes de sombreamento. *Comunicata Scientiae* 7:214-222.
- Su B, Song Y, Song C, Cui L, Yong T, Yang W (2014) Growth and photosynthetic responses of soybean seedlings to maize shading in relay intercropping system in southwest china. *Photosynthetica* 52:332-340.
- Teisseire H, Guy V (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* 153:65-72.
- Vieira EL et al (2010) *Manual de Fisiologia Vegetal*. São Luiz: EDUFMA, 230p.
- Wang L, Liang W, Xing J, Tan F, Chen Y, Huang L, Cheng CL, Chen W (2013b) Dynamics of chloroplast proteome in salt-stressed mangrove *Kandelia candel* (L.) Druce. *Journal of Proteome Research* 12:5124-5136.
- Wituszynska W, Galazka K, Rusaczek A, Vanderauwera S, Breusegem FV, Karpinski S (2013) Multivariable environmental conditions promote photosynthetic adaptation potential in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 170:45-49.
- Wondracek, D. C., Faleiro, F. G. e Sano, S. M. (2011). Composição de carotenoides em passifloras do cerrado. *Revista Brasileiro de Fruticultura* 33:1222-1228.
- Wu Y, Gong W, Yang W (2017) Shade inhibits leaf size by controlling cell proliferation and enlargement in soybean. *Scientific Reports* 7:9259.
- Yang F, Huang S, Gao R, Liu W, Yong T, Wang X, Wu X, Yang W (2014) Growth of soybean seedlings in relay strip intercropping systems in relation to light quantity and red: Far-red ratio. *Field Crops Research* 155:245–253.
- Yang F, Feng L, Liu Q, Wu X, Fan Y, Raza MA, Cheng Y, Chen J, Wang X, Yong T (2018a) Effect of interactions between light intensity and red-to-far-red ratio on the photosynthesis of soybean leaves under shade condition. *Environmental and Experimental Botany* 150:79-87.
- Yao X, Li C, Li S, Zhu Q, Zhang H, Wang H, Yu C, Martin SKS, Xie F (2017) Effect of shade on leaf photosynthetic capacity, light-intercepting, electron transfer and energy distribution of soybeans. *Plant Growth Regul* 83:409-416.
- Zhang S et al (2001) Temperature-Dependent Gas Exchange and Stomatal/NonStomatal Limitation to CO₂ Assimilation of *Quercus Liaotungensis* under Midday High Irradiance. *Photosynthetica* 39:383-388.

CAPÍTULO 2

FERRO EXÓGENO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODIFICA RESPOSTAS DO METABOLISMO PRIMÁRIO DE *Mentha piperita* L.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo analisar a produção de biomassa, carboidratos, pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) submetidas à aplicação de ferro (Fe) exógeno em diferentes condições de irradiância. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com 2 fatores: concentrações de Fe (5 concentrações) e 2 condições de irradiância I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). As concentrações de Fe aplicados via foliar foram: 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e duas condições de irradiância, I_{100%} e I_{50%}. Foram realizadas avaliações de crescimento, teores de pigmentos, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e de carboidratos. Os resultados revelam que plantas de *M. piperita* com aplicações de baixas concentrações de Fe modificam positivamente a produção de clorofila *b* e a taxa de assimilação e uso de CO₂, incrementando o rendimento em biomassa total. Concentrações mais elevadas de Fe tendem a reduzir a concentração interna de CO₂, bem como a eficiência de uso de água, além de afetar a eficiência quântica da antena (Fv'/Fm') e coeficiente de dissipação fotoquímica (qP), refletindo negativamente na produtividade de plantas de *M. piperita*. No entanto, concentrações mais elevadas de Fe tendem a elevar a produção de açúcares, em ambas as condições de irradiância. A condição com nível mais elevado de irradiância (I_{100%}), altera consideravelmente a alocação de carboidratos, permitindo maior produção de massa seca da parte aérea, caule e raízes em resposta a maior eficiência de assimilação e uso de CO₂ e da taxa de transporte de elétrons (ETR). Em condição de ambiente sombreado (I_{50%}), as plantas de *M. piperita* investem mais em complexos coletores de luz. Essa condição eleva ainda os valores de fluorescência mínima da folha adaptada ao claro (F_0'), fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (Fm) e ao claro (Fm'), eficiência quântica da antena (Fv'/Fm') e fluorescência variável adaptada ao claro (Fv'). Conclui-se que, a aplicação de Fe e as diferentes condições de irradiância promovem importantes mudanças no crescimento, teores de pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e a produção de carboidratos. De maneira geral, a produção de *M. piperita* pode ser realizada com aplicações menores de Fe e em condição com maior radiação solar para obter o melhor crescimento e rendimento de folha seca, caule e raiz.

Palavras-chave: Menta. Ion divalente. Energia da luz. Metabolismo primário.

CHAPTER 2

EXOGENOUS IRON AND SOLAR RADIATION INTENSITY CHANGES THE
PRIMARY METABOLISM OF *Mentha piperita* L. PLANTS

ABSTRACT

This study aims to analyze the production of biomass, carbohydrates, photosynthetic pigments, gas exchange and chlorophyll a fluorescence in peppermint plants (*Mentha piperita* L.) submitted to the application of exogenous iron (Fe) under different irradiance conditions. The experiment was carried out in a greenhouse, with humidity and temperature control. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme with 2 factors: concentrations of Fe (5 concentrations) and 2 conditions of irradiance $I_{100\%}$ (full sun) and $I_{50\%}$ (irradiance 50%). The concentrations of Fe applied via leaf were: 0 (control), 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g L⁻¹ and two irradiance conditions, $I_{100\%}$ and $I_{50\%}$. Growth evaluations, pigment levels, gas exchange, chlorophyll a fluorescence and carbohydrates were carried out. The results reveal that plants of *M. piperita* with applications of low concentrations of Fe positively modify the production of chlorophyll *b* and the rate of assimilation and use of CO₂, increasing the yield in total biomass. Higher concentrations of Fe tend to reduce the internal concentration of CO₂, as well as the efficiency of water use, in addition to affecting the antenna's quantum efficiency (Fv'/Fm') and photochemical dissipation coefficient (qP), reflecting negatively on the productivity of *M. piperita* plants. However, higher concentrations of Fe tend to increase sugar production, under both irradiance conditions. The condition with the highest level of irradiance ($I_{100\%}$), considerably alters the allocation of carbohydrates, allowing greater production of dry matter of the aerial part, stem and roots in response to greater efficiency of assimilation and use of CO₂ and the rate of transport of electrons (ETR). In a shaded environment ($I_{50\%}$), *M. piperita* plants invest more in complex light collectors. This condition also increases the values of minimum fluorescence of the sheet adapted to light (Fo'), maximum fluorescence of the sheet adapted to dark (Fm) and to light (Fm'), quantum antenna efficiency (Fv'/Fm') and fluorescence variable adapted to the light (Fv'). It is concluded that the application of Fe and the different conditions of irradiance promote important changes in growth, levels of photosynthetic pigments, gas exchange, chlorophyll a fluorescence and carbohydrate production. In general, the production of *M. piperita* can be carried out with smaller applications of Fe and in conditions with greater solar radiation to obtain the best growth and yield of dry leaf, stem and root.

Keywords: Mint. Divalent ion. Light energy. Primary metabolism.

2.1 INTRODUÇÃO

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) é uma espécie da família Lamiaceae que produz óleo essencial (OE) amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, possuindo propriedades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica e imunomoduladora, além de ação no trato digestivo (LV et al., 2012; MCKAY; SAHARKHIZ et al., 2012; SHABRANGI; BEIGIJAZI, 2014).

Atividades metabólicas das plantas medicinais são influenciadas pelas condições ambientais que, influenciam a fotossíntese e a respiração e, eventualmente, a produtividade biológica e econômica dessas plantas (GOBBONETO et al., 2007; MORAIS, 2009; PEDO et al., 2014). Nas reações luminosas, a energia da luz é usada para produzir adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que são então usados para a fixação de carbono, que, por sua vez, são transformados em carboidratos e produção de oxigênio durante a fase independente de luz (CHEN; MURATA, 2011). Dessa maneira, a radiação solar é um fator ambiental fundamental para as plantas devido à sua ação direta ou indireta na regulação do crescimento e desenvolvimento (SOUZA et al., 2010; DALMOLIN et al., 2015).

Estudos realizados por Lima et al. (2011) verificaram que a intensidade de luz influencia o crescimento de mil-folhas (*Achillea millefolium*), sendo que o sombreamento reduz o acúmulo de biomassa seca da parte aérea, caule, folhas e flores. Pompelli et al. (2010) verificaram elevação do valor do quociente F_v/F_0 e de F_v/F_m em plantas cultivadas a pleno sol em comparação às plantas cultivadas à sombra. Mielke et al. (2010) observaram na espécie *Eugenia uniflora* alteração no teor de clorofilas *a*, *b* e total em plantas sob diferentes níveis de radiação luminosa.

Adicionalmente, é amplamente relatado que aplicação foliar de micronutrientes melhora a produtividade das plantas cultivadas (KALIDASU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011), inclusive medicinais. O micronutriente ferro (Fe) é o terceiro nutriente mais limitante para o metabolismo vegetal (ZUO; ZHANG, 2011; SAMARANYKE et al., 2012), pois influencia diretamente à produção vegetal, exercendo papel essencial no funcionamento de múltiplos processos metabólicos e enzimáticos, relacionados ao transporte de oxigênio e elétrons, fixação de nitrogênio e divisão celular (BRIAT, 2007; JEONG; GUERINOT, 2009; BASHIR et al, 2011; THOMINE; VERT, 2013). No entanto,

o Fe encontra-se pouco disponível na maioria dos solos (MARSCHNER et al., 2011) e sua absorção pela planta ocorre preferencialmente na forma iônica de Fe^{2+} (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2013). Uma vez absorvido pelas raízes, o Fe é carregado no xilema e translocado para a parte superior através do fluxo transpiratório (BECKER; ASCH, 2005; KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012).

O excesso de Fe afeta o crescimento, causando distúrbios nutricionais e danos oxidativos que afetam negativamente a produção agrícola (DE DORLODOT et al., 2005; PEREIRA et al., 2014; STEIN et al., 2014; MÜLLER et al., 2015; WU et al., 2017). O excesso de Fe também eleva coeficientes de extinção não-fotoquímica (NPQ), indicando que existe ativação de mecanismos fotoprotetores, que não são suficientes para evitar o processo de fotoinibição, indicado por uma redução significativa na eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (PSII) (Fv/Fm) e extinção fotoquímica (qP). Além disso, folhas com deficiência de Fe revelam redução da eficiência do PSII, após adaptação ao escuro (MORALES et al., 2000).

Portanto, estudos com o elemento Fe merece destaque por sua influência no metabolismo vegetal. No entanto, a eficiência quanto à resposta das plantas ao Fe é influenciada também pelos fatores ambientais, como a radiação solar que, por sua vez, afetam não somente o crescimento e desenvolvimento, mas, também, causa impacto na fotossíntese e respiração das plantas. Dessa forma, considerando a análise de produtividade vegetal, a aplicação foliar de Fe e em associação com diferentes condições de radiação solar podem atuar como importantes fatores para regular diversas respostas fisiológicas das plantas, contribuindo inclusive com a produtividade da *M. piperita*.

Tendo em vista a importância econômica e medicinal da *M. piperita*, investigações a respeito do comportamento fisiológico dessa espécie e suas respostas às condições ambientais são necessárias para avaliar métodos de cultivo e os fatores que afetam a sua produtividade. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo analisar a produção de biomassa, pigmentos fotossintéticos, carboidratos, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de plantas de *M. piperita* submetidas à aplicação foliar de Fe em diferentes condições de irradiância.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local de estudo

O experimento foi conduzido no Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia - Setor de Biologia Vegetal, IBB, UNESP, Botucatu/SP, em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura e com as seguintes coordenadas geográficas: 22°53'12.2"S, 48°29'52.5"W.

Durante o desenvolvimento do experimento, as temperaturas médias máximas, mínimas e médias foram, respectivamente, 27°C, 18°C e 22°C.

2.2.2 Material vegetal e tratamentos

As estacas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) foram obtidas de plantas matrizes cultivadas em vasos contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças® + Carolina soil® + Solo, na proporção 1:1:1, conforme Gonçalves et al. (2020).

Ramos aéreos das plantas foram selecionados e a partir deles, estacas com 8 cm de comprimento e com os quatro primeiros pares de folhas mantidos foram confeccionadas e, em seguida, colocadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças®. Essas estacas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente até o enraizamento, conforme Gonçalves et al. (2020).

Aos 30 dias após o plantio das estacas e enraizadas foram transferidas definitivamente para vasos com capacidade de 2,6 L, utilizando Tropstrato HT Hortaliças® como substrato.

Os tratamentos com soluções contendo ferro (Fe) foram preparadas utilizando a partir do fertilizante foliar contendo 13% de FeEDTA solúvel, que foi dissolvido em água destilada. As concentrações de Fe utilizadas foram iguais a 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹. Essas concentrações de Fe foram escolhidas com base na recomendação ótima do fertilizante foliar, trabalho realizado por El-Emary et al. (2018) e por meio de testes preliminares.

O pH da solução de Fe foi ajustado aproximadamente a 5,0. Essa faixa representa maior solubilidade e eficácia da atividade do fertilizante foliar. A primeira aplicação de Fe foi realizada dez dias após aclimação das plantas em substratos e quatro dias após a aclimação das plantas as diferentes condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). A aplicação de Fe foi realizada via foliar com auxílio de pulverizador manual de CO₂ pressurizado, com bico do tipo “Leque”, com taxas de vazão de 0,025 a 2500 gpm (0,09 a 9464 l/min) e pressões até 4000 psi (276 bar), utilizando como agente espalhante o produto comercial Agral® (Nonil Fenoxi Poli (Etilenoxi) Etanol) na proporção de 800 µL por litro de solução de ferro.

As concentrações de Fe utilizadas nos diferentes tratamentos foram parceladas em cinco aplicações realizadas uma vez por semana, sendo a primeira em plantas com 44 dias após a semeadura das estacas. Todas as pulverizações foram realizadas pela manhã (9:00 h) com temperaturas médias próximas a 18°C e umidade relativa do ar de 80%.

As plantas foram fertirrigadas com solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, com força iônica reduzida a 70%, pH ajustado para 5,5 - 6,5 e a condutividade elétrica mantido entre 1,5 - 2,5 mS cm⁻¹, conforme Gonçalves et al. (2020).

2.2.3 Avaliação de variáveis fisiológicas

2.2.3.1 Análise de crescimento

As plantas foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes. As lâminas foliares foram levadas ao integralizador de área foliar LI-3100 da LI-COR para a determinação da área foliar em dm². A seguir, todo o material foi acondicionado em sacos de papel, etiquetado e colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até obtenção de massa seca constante. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica Ohaus® tipo Analytical Standard com sensibilidade de até 0,1 mg para determinação da matéria seca pela pesagem. A matéria seca das lâminas foliares, caule, raiz e a matéria seca total (MST), em cada época de colheita, foram expressas em gramas, conforme Gonçalves et al. (2020).

A área foliar (AF) foi definida como a somatória da área de todas as lâminas foliares da planta, em decímetros quadrados.

2.2.3.2 Volume radicular

O volume radicular (cm^3) foi determinado por meio da medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocando-se as raízes, após lavagem, em proveta contendo volume conhecido de água (100 mL). Pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ($1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$), segundo metodologia descrita por Basso (1999).

2.2.3.3 Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram determinadas utilizando equipamento com sistema aberto portátil de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha (“*Infra Red Gas Analyser - IRGA*”, modelo GFS-3000 - Walz).

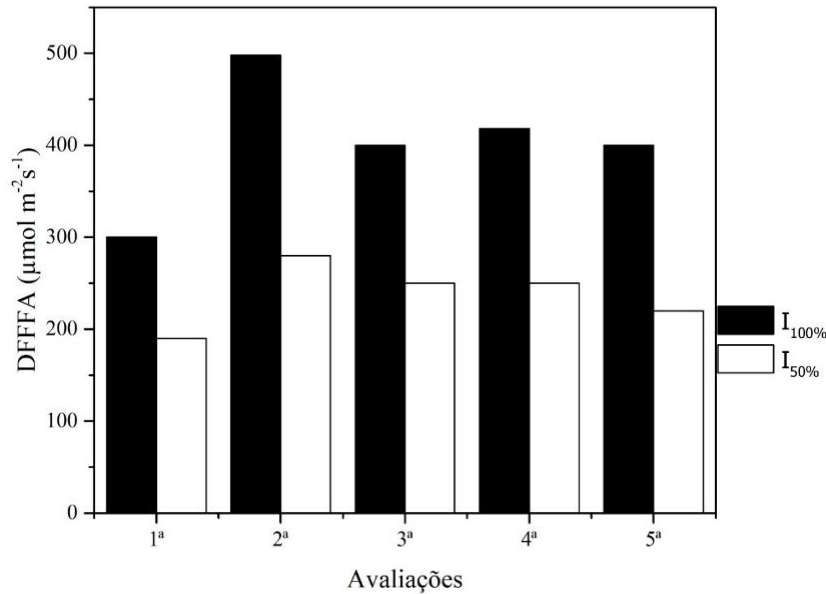
As avaliações de trocas gasosas foram realizadas entre 09:00 e 11:00 horas da manhã, selecionando-se uma planta por repetição, de cada tratamento, nas quais foram escolhidas e padronizadas as 2ª ou 3ª folhas, com o limbo completamente expandido e fotossinteticamente ativas. As características de trocas gasosas avaliadas foram: taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração interna de CO_2 na folha (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), conforme Caemmerer e Farquhar (1981).

A eficiência de uso da água (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) foi determinada pela relação entre assimilação de CO_2 e taxa de transpiração (A/E) e calculada de acordo com Berry e Downton (1983). A eficiência instantânea de carboxilação da enzima ribulose 1,5 - bifosfato carboxilase (Rubisco) foi calculada pela relação da taxa de assimilação de CO_2 e concentração interna de CO_2 na folha (A/C_i), de acordo com Zhang et al. (2001).

Foi elaborado também uma curva de resposta de assimilação de CO_2 em relação ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, em intervalos de aproximadamente $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ até atingir $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e, depois, em intervalos

de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e, assim, mostrando a DFFFA (μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para a espécie (Figura 2).

Figura 1 - Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) das condições do experimento, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%), durante as cinco avaliações



2.2.3.4 Fluorescência da clorofila a

As avaliações de fluorescência da clorofila a foram realizadas no período da manhã, por meio de fluorômetro de pulso modulado acoplado ao equipamento de sistema aberto portátil de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha ("Infra Red Gas Analyser - IRGA", modelo GFS-3000 - Walz). As avaliações foram realizadas no período da manhã. As folhas foram aclimatadas durante um período de 30 minutos no escuro cobrindo-as com papel alumínio.

Foram obtidos os valores de Fv'/Fm' (eficiência quântica da antena), Fv/Fm (eficiência fotoquímica máxima), ETR (taxa de transporte de elétrons), qP (coeficiente de dissipação fotoquímica) e o NPQ (quenching não fotoquímico), conforme Kitajima; Butler (1975); Schreiber et al. (1986); Bilger; Björkman (1990) e Schreiber; Klughammer (2008).

2.2.4 Avaliação de variáveis bioquímicas

2.2.4.1 Concentração de clorofilas *a* e *b*

As concentrações de clorofilas (*a* e *b*) foram determinadas segundo metodologia descrita por Sims e Gamon (2002). As concentrações de clorofilas *a* e *b* foram calculadas segundo as equações abaixo e expressas em µg de pigmento por g de matéria fresca:

$$\text{Clorofila } a = 0,01373. (A663) - 0,000897. (A537) - 0,003046. (A 647);$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405. (A647) - 0,004305. (A537) - 0,005507. (A663).$$

2.2.4.2 Análise de carboidratos

A extração de açúcares solúveis foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Garcia et al. (2006). Foi colocada 100mg de folhas frescas congeladas em almofariz, no qual foram trituradas em nitrogênio líquido. O material vegetal foi colocado em microtubos com capacidade de 2 mL, aos quais foram adicionados 1mL de etanol 80% e, em seguida, esses foram incubados em banho-maria a 80°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos à 4°C. Ao término da centrifugação foi coletado o sobrenadante, reservando-o. Esse procedimento foi realizado três vezes para a retirada completa de todos os açúcares solúveis, unindo os sobrenadantes das três extrações ao final. Depois, o volume foi completado com água deionizada para 3 mL. O extrato obtido foi armazenado, separado em microtubos e armazenado a -20°C até a determinação.

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais foram utilizadas as metodologias de Morris (1948) e Yemm e Willis (1954). Para tanto, foram adicionados 100µL do extrato alcoólico+ 900µL de água deionizada (volume final 1000µL) em tubos de ensaio, mantidos em banho de gelo, aos quais foram acrescentados 2000 µL de solução de antrona gelada. Em seguida, esses tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 3 minutos. Após resfriamento, realizou a

leitura de absorbância em espectrofotômetro a 620nm. Utilizou solução de glicose para a confecção da curva padrão. Os açúcares solúveis totais foram expressos em miligramas por grama de massa fresca.

A quantificação de açúcares redutores foi realizada, segundo metodologia de Miller (1959). Adicionou 500µL do extrato alcoólico + 250µL de água deionizada (volume final 750µL) em tubos de ensaio, mantidos em banho de gelo, aos quais foram acrescentados 500µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) gelado. Em seguida, esses tubos foram colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento, foram acrescentados 1000 µL de água deionizada e realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540nm. Utilizou solução de glicose para a confecção da curva padrão. Os açúcares redutores foram expressos em miligramas por grama de massa fresca.

Para a determinação da sacarose foram empregados 75 µL de extrato e adicionado 25 µL de água deionizada e 100 µL de solução de KOH (30%). Após agitação os tubos de ensaios contendo o extrato e os reagentes foram agitados e colocados em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Aguardou-se o esfriamento dos tubos e adicionaram-se 2000 µL de solução de antrona, levando-os novamente para banho-maria a 40°C por 10 minutos. A solução antrona foi preparada com a diluição de 0,1 g de antrona em 45 mL de ácido sulfúrico p.a. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm. Para obter-se o volume ideal de extrato foi utilizada a curva padrão com sacarose p.a, seguindo a metodologia de Passos (1996).

Após extração dos açúcares e sacarose realizou-se a extração de amido a partir do pellet resultante da extração dos açúcares. A esses foram adicionados 500µL de água deionizada e 650µL de ácido perclórico (52%), sendo mantidos em banho de gelo e agitação durante 15 minutos. Em seguida todo o material foi transferido para tubos falcon com capacidade de 15 mL e adicionados 2000 µL de água deionizada. Foi realizada a centrifugação a 10.000x g por 5 minutos a 4°C e coletado o sobrenadante. Esses procedimentos foram realizados duas vezes para a obtenção do substrato empregado na determinação do amido (GARCIA et al., 2006).

Para a determinação amido foram empregados 150 µL de extrato, sendo adicionados 850 µL de água deionizada e 2000 µL do reativo antrona. Após agitação os tubos de ensaios contendo o extrato e os reagentes foram agitados e colocados

em banho-maria em ebulição por 3 minutos. Aguardou-se o esfriamento dos tubos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 620 nm. Para obter-se o volume ideal de extrato foi utilizada a curva padrão com glicose p.a (MORRIS, 1948).

2.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x2, cinco concentrações de Fe, constituindo os diferentes tratamentos com concentrações iguais a 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). Foram realizadas colheitas de material vegetal aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após à aplicação de Fe. Cada parcela experimental foi constituída de um vaso contendo uma planta.

Os dados foram submetidos à análise de regressão, considerando o coeficiente de determinação, comportamento biológico e significância dos parâmetros do modelo pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

As variáveis foram submetidas à análise multivariada utilizando-se Análise de Componentes Principais, sendo utilizado o software XLSTAT versão 19.4 (Addinsoft, NY, EUA).

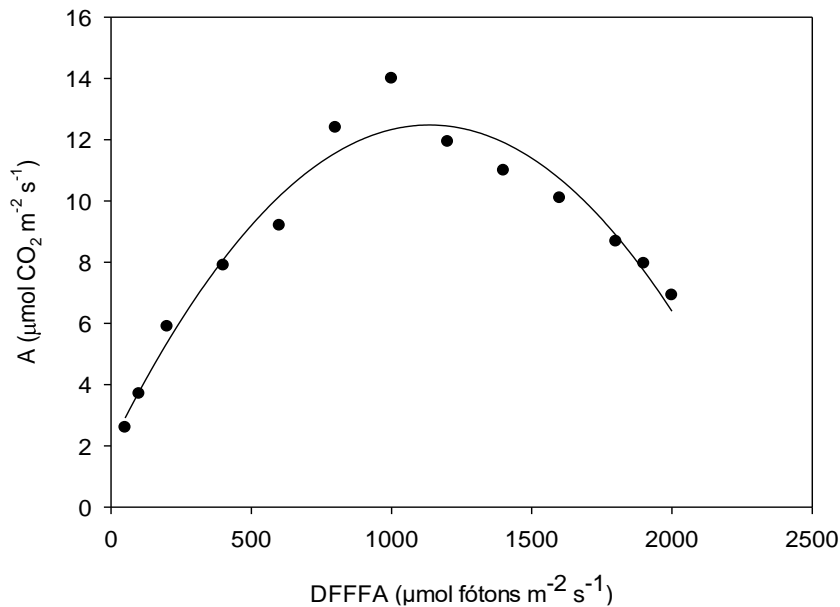
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de CO₂

Plantas de *M. piperita* apresentam assimilação de CO₂ aparente com 50 μmol fótons m⁻² s⁻¹, indicando o ponto de compensação de CO₂, no qual a quantidade de CO₂ assimilada é a mesma liberada pelas folhas. Apresentam pico de assimilação em 1000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (Figura 2), com redução de acordo com aumento da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), chegando a ser mais pronunciado com 2000 μmol fótons m⁻² s⁻¹. A queda na taxa de assimilação de CO₂, também ocorreu em torno das 12 horas, em virtude do fechamento gradual dos estômatos. O aumento da absorção de CO₂ e do rendimento fotossintético é

proporcional a elevação da radiação (LARCHER, 2006; SCHOCK et al., 2014). Contudo, sob radiação intensa a planta não responde, em termos fotossintéticos, chegando ao chamado ponto de saturação. Neste ponto, a planta não é mais limitada pela luz e sim, por outros fatores como a atividade da Rubisco (RuBP), enzima responsável pela assimilação e/ou pela disponibilidade de CO_2 (VIEIRA et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Taxa de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de acordo com a radiação da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em plantas de *M. piperita*



A partir das informações obtidas pela curva foi definido o período das 9 às 11 horas para realizar as avaliações de trocas gasosas, período onde as plantas de *M. piperita* tiveram maior abertura estomática e, conseqüentemente, maior taxa de assimilação de CO_2 (Figura 2). Isso deve-se ao fato, da luz ser um dos fatores mais importantes no processo da abertura estomática, quando as plantas estão em boas condições de suprimento de água (LARCHER, 2006). No entanto, apesar das plantas apresentarem pico de CO_2 com $1000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2), adotamos a quantidade de DFFFA de acordo com as condições de irradiância das respectivas avaliações (Figura 1).

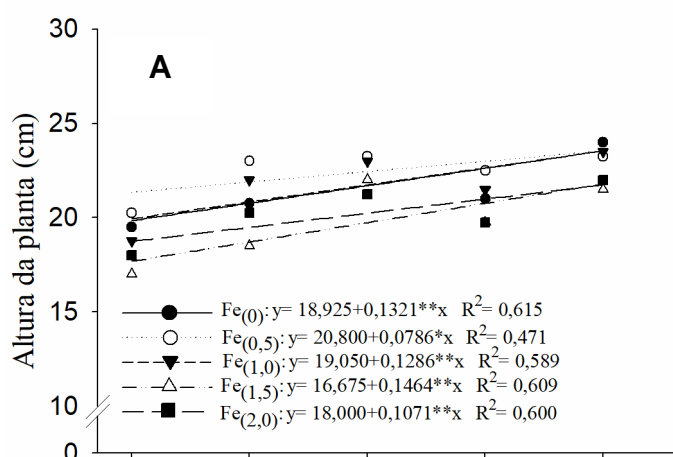
2.3.1 Variáveis fisiológicas

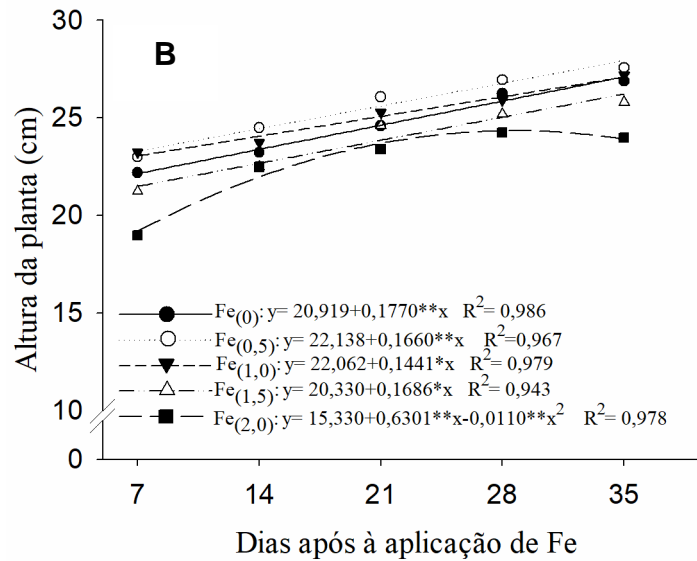
2.3.2 Análise de crescimento

Altura de planta (cm)

Aplicação exógena de ferro (Fe) em concentrações mais elevadas (1,5 e 2,0 g L⁻¹) diminuiu a altura das plantas (Figuras 3 A, B). Esse resultado pode ser justificado, pois concentrações elevadas de Fe leva a formação de espécies reativas de oxigênio, causando danos e, conseqüentemente, reduções no crescimento das plantas (SILVEIRA et al., 2007; JUCOSKI et al., 2013). Além disso, essas concentrações tendem a reduzir a eficiência e uso de CO₂ (Figuras 13 A, B; 17 A, B). Jucoski et al. (2016) verificaram que plantas de *Eugenia uniflora* L. submetidas às concentrações de 1,0 e 2,0 mM de Fe apresentaram sintomas típicos de toxidez, como redução na parte aérea, redução da área foliar e escurecimento das raízes. Deve-se destacar que níveis de toxicidade por Fe variam de espécie para espécie e podem ser atingidos em concentrações relativamente baixas, dependendo de uma combinação de fatores relativos às plantas e ao meio (AUDEBERT; FOFANA, 2009).

Figura 3 - Altura, em cm, em plantas de *M. piperita* submetidas aos seguintes tratamentos: 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



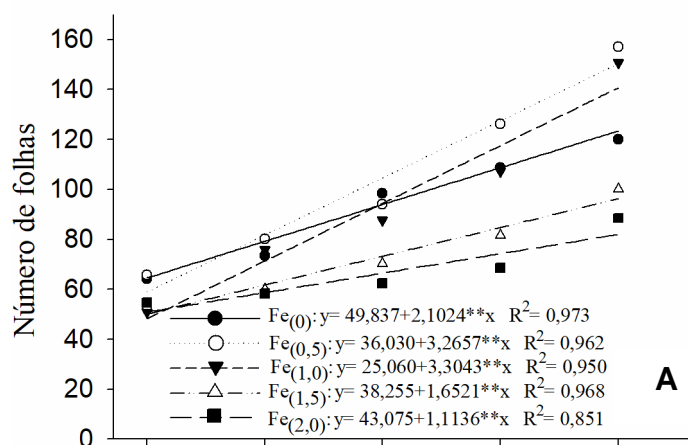


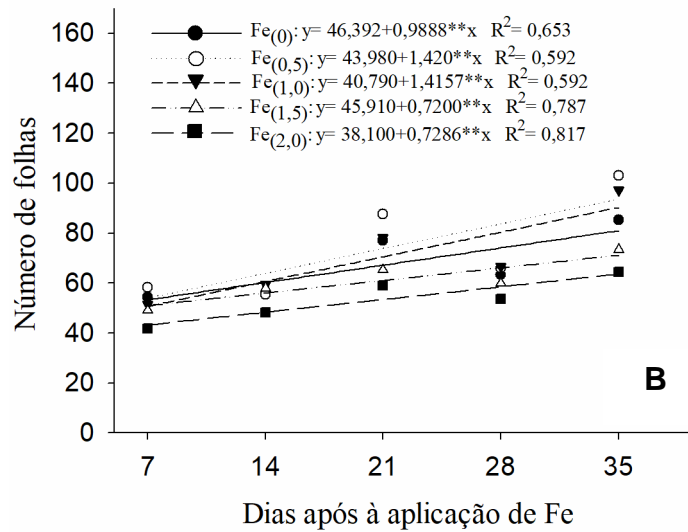
O maior crescimento em altura foi observado no ambiente sombreado (25,629 cm) e com 0,5 de g L⁻¹ de Fe, superando em 22,45 cm das plantas cultivadas na condição de maior irradiância (I_{100%}) (Figuras 3 A, B). Apesar dessas plantas ter maior capacidade fotossintética, o que nos permite dizer que nem sempre maiores taxas fotossintéticas serão convertidas em biomassa ou demais fatores relacionados à produção (Figura 13 A; 17 A). Deve-se destacar ainda que, não podemos atribuir a altura da planta a sua característica de adaptação, uma vez que a *M. piperita* é uma planta que prefere dias mais quentes, sendo que estas condições climáticas irão determinar um melhor desenvolvimento e, conseqüentemente, uma maior produtividade vegetal (SOUZA et al., 2014). Além disso, o crescimento em altura das plantas não esteve ligado a incrementos da fotossíntese, processo em que há produção de fotoassimilados e esses transcolados para outros órgãos auxiliando no desenvolvimento vegetal. Resultados semelhantes foram observados por Felseburgh et al. (2016) em *Aniba parviflora* (Meisn.) Mez (macacaporanga) em níveis de sombreamento de 50% e a pleno sol. Os autores observaram maior crescimento das plantas jovens em altura em condição de ambiente sombreado. Os autores justificaram que esse resultado pode ter ocorrido em razão do estiolamento induzido pela baixa intensidade luminosa, ou, porque foi favorecido pelas temperaturas mais amenas nas folhas, devido a maior abertura dos estômatos e à fixação de carbono pelas plantas.

Número de folhas (Unid.)

Aplicações de concentrações mais elevadas de Fe empregadas neste trabalho tendem à redução da emissão de folhas novas, independentemente do ambiente de cultivo (Figuras 4 A, B). Carvalho Filho et al. (2003), estudando o efeito de dois ambientes luminosos, misturas de substratos e dois tamanhos de recipientes, na produção de mudas de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), observaram que o número de folhas por plantas foi maior no ambiente à pleno sol, não havendo efeito dos substratos.

Figura 4 - Número de folhas (Unid.), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



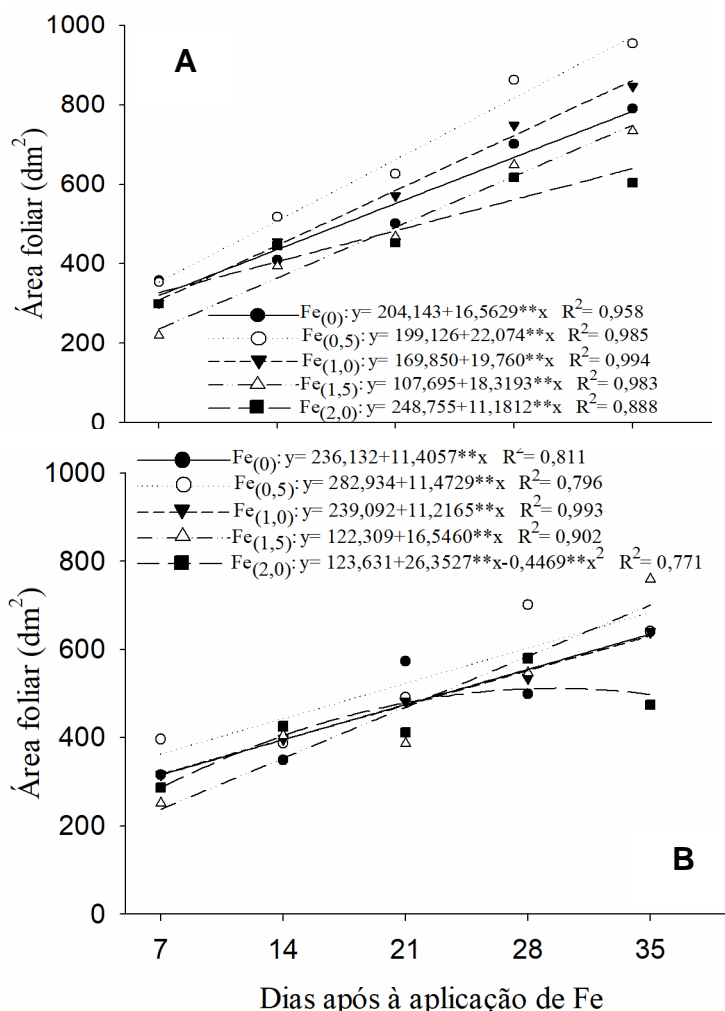


As plantas cultivadas sob sombreamento (I_{50%}) apresentaram redução significativa em seu número de folhas, com média de 65 folhas planta⁻¹, destacando o potencial da planta de *M. piperita* às condições de irradiância mais elevadas com 85 folhas planta⁻¹ (Figuras 4A, B). Plantas mantidas sob maior incidência luminosa tendem a apresentar maior número de folhas (DOUSSEAU et al., 2007), fato que corrobora com o presente trabalho e vários outros estudos como observados por Lima et al. (2013) em capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e por Gazolla-Neto et al. (2013) em acesso de maria-pretinha (*Solanum americanum*). Isso pode ter ocorrido devido ao fato das plantas que estavam no ambiente à pleno sol aumentarem a produção de folhas para captar mais luz e, conseqüentemente, produzir mais fotoassimilados, resultando assim, na manutenção do sistema da planta.

Área foliar (dm²)

A maior área foliar (AF) se reflete em uma adaptação morfológica da planta na tentativa de aumentar a captação de energia luminosa sob condições de restrição de luz (GONDIM et al., 2007). Além disso, outros fatores podem afetar a AF, inclusive a nutrição das plantas. Os tratamentos com Fe, 2,0 g L⁻¹, tendem a reduzir a AF em comparação às plantas que não receberam pulverização de Fe, destacando ainda, a aplicação de 0,5 g L⁻¹ de Fe, sobretudo sob condição de maior incidência de luz (Figuras 5A, B).

Figura 5 - Área foliar, em dm², em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



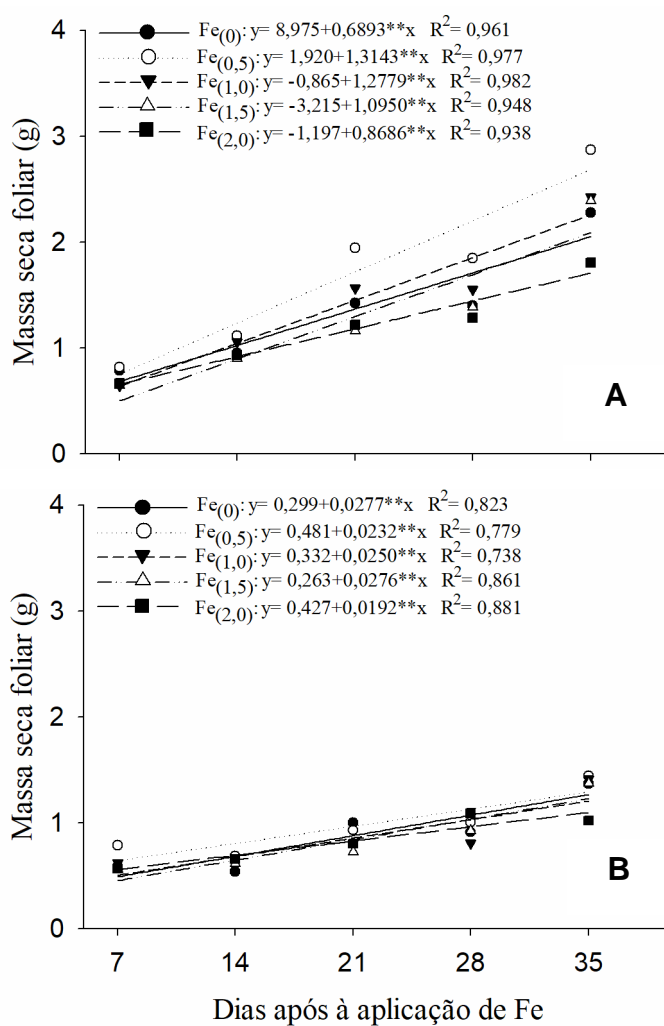
O valor médio da AF obtido pelas plantas de *M. piperita* cultivadas I_{100%} foi igual a 555,083 dm², ou seja, maior que os valores médios obtidos nas plantas cultivadas sob I_{50%} (476,014 dm²) (Figuras 5A, B), o que, justifica a maior capacidade fotossintética das plantas em condição de maior irradiância, coincidindo com os valores maiores de massa seca total (Figura 13 A; 9 A). Perini et al. (2011) compararam a AF de plantas de capim *Citronela* cultivadas à pleno sol e sob sombrite com 50% de sombreamento e também verificaram que o sombreamento proporcionou redução nesses valores.

É importante destacar, o fato de que a maior AF apresentada pelas plantas em condição de maior irradiância pode ter sido favorecida pelo aumento da média do número de folhas por planta e não pelo aumento da AF individual, revelando ser uma característica de adaptação da planta à luminosidade do ambiente, modificando a sua morfologia em benefício de seu metabolismo em face do ambiente luminoso ao qual as plantas jovens foram submetidas (Figuras 5A; 4A, B).

Massa seca foliar (g)

Para massa seca das folhas, em g, observa-se tendência de redução com a aplicação da maior concentração de Fe, em ambas as condições de cultivo (I_{100%} e I_{50%}) sendo que os menores valores foram verificados nas plantas crescidas com I_{50%} (Figuras 7A, B), indicando que houve menor alocação de fotoassimilados para as folhas e de biomassa total produzida (Figuras 6 A, B; 9 A, B). Além disso, a baixa radiação solar em condição de ambiente sombreado pode afetar a síntese de auxina, refletindo no crescimento das plantas e, conseqüentemente seu acúmulo de biomassa (HINDT; GUERINOT, 2012). A biomassa seca retida nas folhas e aquela exportada para as demais partes das plantas aumenta com a redução da radiação solar. Para as plantas de *M. piperita* esta proporção foi alterada pelos níveis irradiância e aplicação de ferro (Figuras 6A, B).

Figura 6 - Massa seca foliar, em g, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



Plantas de *M. piperita* cultivadas com média de 403 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram incrementos no n\u00famero de folhas e AF, ao longo do experimento (Figuras 4A; 5 A), com incremento pr\u00f3ximo de 40% na massa seca das folhas (1,404 g), em rela\u00e7\u00e3o ao ambiente com I_{50%}, com m\u00e9dia de 0,876 g, ou seja, com baixos regimes de luminosidade, em m\u00e9dia de 238 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras 6A, B). Esse resultado, pode ser justificado pelo maior balan\u00e7o de carbono, que resulta em aumento no rendimento de produ\u00e7\u00e3o de mat\u00e9ria seca foliar sob boas condi\u00e7\u00f5es de radia\u00e7\u00e3o (LARCHER, 2000).

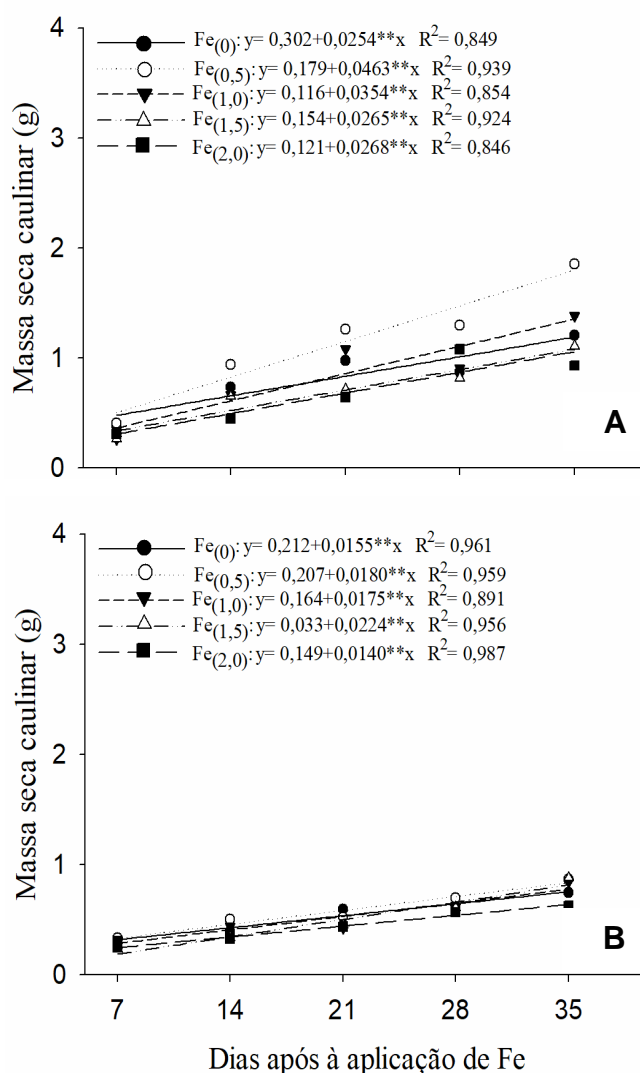
Lima et al. (2011) verificaram que a intensidade de luz influencia o crescimento de mil-folhas (*Achillea millefolium*), sendo que o sombreamento reduz o acúmulo de biomassa seca foliar. Entretanto, segundo Castro et al. (2005), o inverso também pode ocorrer, ou seja, a redução da biomassa seca da parte aérea à pleno sol. Provavelmente, isso se deva à fotoinibição e à capacidade fotossintética que pode ser severamente reduzida, quando as plantas são expostas a altos níveis de radiação, superiores aos requeridos para saturar a fotossíntese.

Massa seca caulinar (g)

As massas secas do caule de plantas de *M. piperita* foram influenciadas pelas condições de tratamentos, ou seja, pela aplicação de Fe e condição de irradiância. Destaca-se a aplicação das menores concentrações de Fe (0,5 e 1,0 g L⁻¹) e a condição de pleno sol (I_{100%}) (Figuras 7 A, B).

O aumento da radiação luminosa incrementa a taxa fotossintética, aumentando a produção de carboidratos e o teor de massa seca, enquanto a deficiência de radiação previne a fo-oxidação da auxina (Ax), assim, mantendo alta concentração da Ax, que proporciona alongamento celular e estiolamento, sem alterar a massa seca foliar (Figuras 13 A; 24 A; 9 A; 3 B; 7 A, B) (PINTO et al., 2007).

Figura 7 - Massa seca caulinar, em g, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t

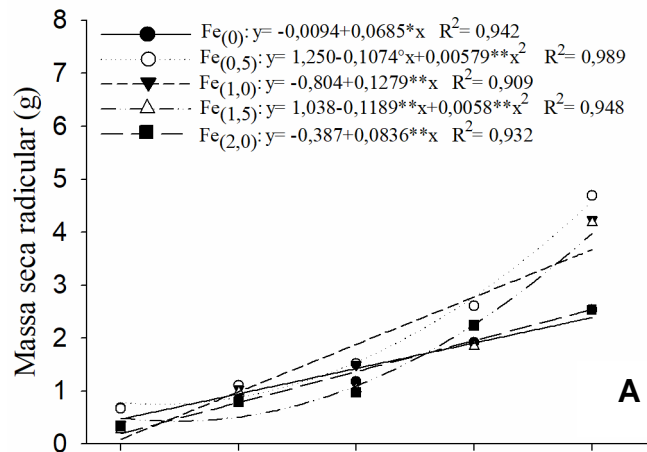


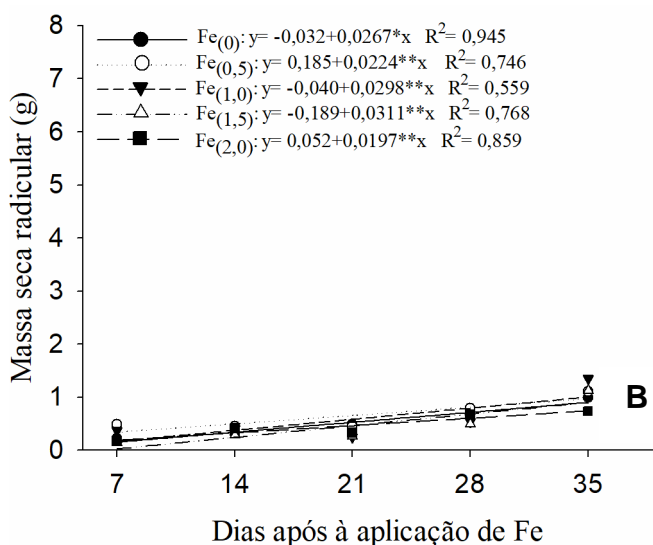
O ganho na massa seca de caule acompanhou o ganho dos outros órgãos das plantas, sobretudo em relação a menor concentração de Fe, evidenciando também a superioridade das plantas em condição de I_{100%} (Figuras 7 A, B). A intensidade de luz é um fator importante para o crescimento das plantas. Em condições de pouca luz ocorre redução de massa seca, pois as trocas gasosas são diretamente relacionadas à luminosidade disponível, conseqüentemente, afetando a produção de biomassa (LARCHER, 2005; FAN et al., 2013), inclusive do caule (7 A).

Massa seca radicular (g)

A massa seca da raiz das plantas de *M. piperita* foi influenciada pelo ambiente e aplicação de Fe, sendo maior na condição em pleno sol ($I_{100\%}$) ($1,692 \text{ g planta}^{-1}$), comparativamente com $I_{50\%}$, cuja média foi de $0,540 \text{ g planta}^{-1}$ (Figuras 8 A, B). O decréscimo na produção de matéria seca de raízes em condição com sombreamento 50% pode estar relacionado com o excesso de Fe, sobretudo na parte aérea. De maneira geral, o excesso de Fe induz a deficiência de P, K, Ca, Mg e Zn provocando desordens nutricionais múltiplas (PEREIRA et al., 2013; MÜLLER et al., 2015), refletindo na redução no crescimento, escurecimento de raízes e formação de placa de Fe na superfície desse órgão (SANTANA et al., 2014), influenciando a produção de massa radicular (Figuras 8 A, B).

Figura 8 - Massa seca radicular, em g, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



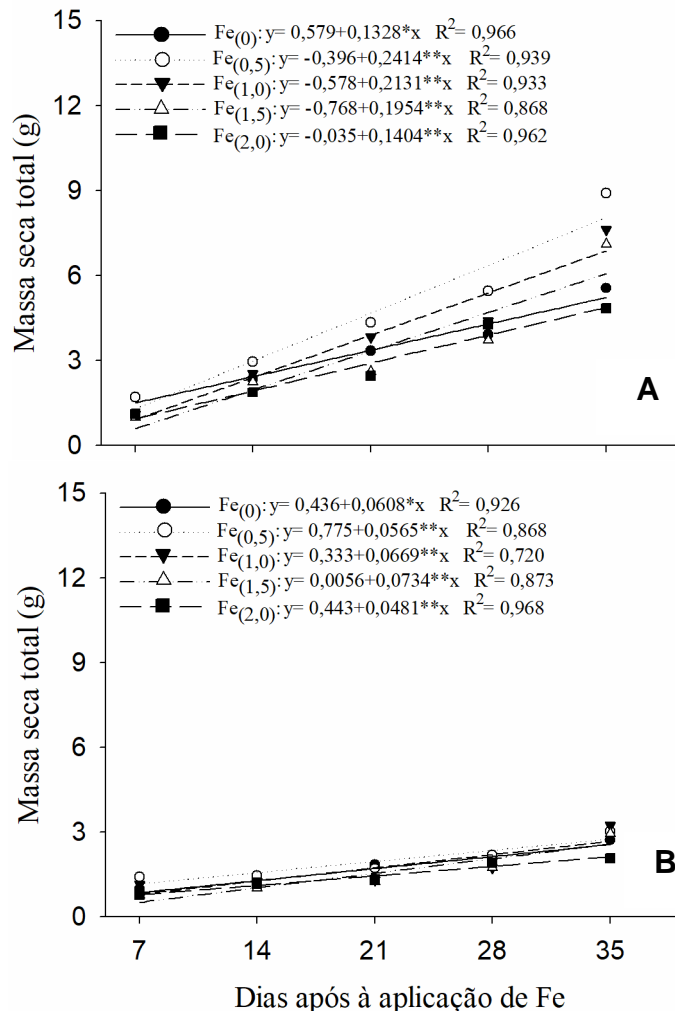


Apesar do ambiente com I_{50%} apresentar maior disponibilidade de água no solo e, conseqüentemente, favorecer a absorção pelas plantas, o ambiente com maior nível de irradiância favorece a evaporação constante. Os maiores valores para massa seca de raízes em condição de maior DFFFA indicam que a irradiância é um dos fatores determinantes para a produtividade das plantas, por interferir na morfologia, exportação e distribuição de fotoassimilados (Figuras 8 A, B) (FAN et al., 2013). Corrêa et al. (2012) ao estudarem o desempenho produtivo de *Origanum vulgare* (orégano), sob malhas coloridas e ambiente a pleno sol, concluíram que plantas de orégano são sensíveis à qualidade de luz, visto que sob luz azul as plantas produziram menor biomassa seca da raiz e total, em relação às malhas vermelha e preta. Martins et al. (2008) verificaram em plantas de manjerição (*Ocimum gratissimum* L.) que plantas crescidas a pleno sol se destacaram na produção de biomassa translocando essa matéria seca para as raízes.

Massa seca total (g)

Em relação à biomassa total observa-se que as plantas de *M. piperita* submetidas as duas maiores concentrações de Fe apresentaram menores valores médios (Figuras 9 A, B). Chatteree et al. (2006) verificaram que, após 110 dias de exposição a 2,0 mM de Fe, plantas de *Solanum tuberosum* apresentaram queda de 70% na produção da matéria seca quando comparadas ao controle (Fe 0,1 mM).

Figura 9 - Massa seca total, em g, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



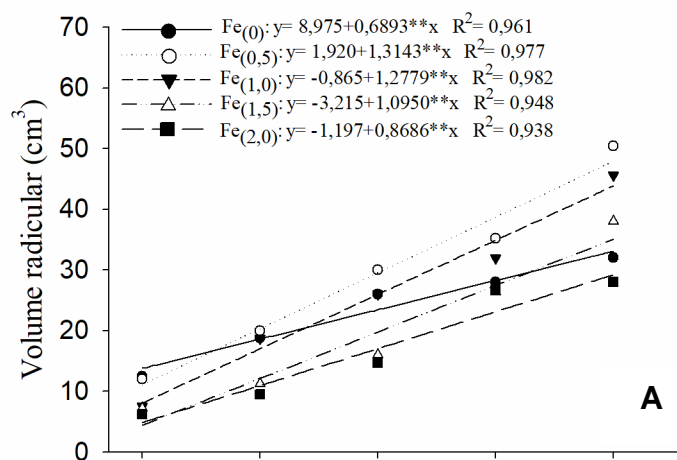
A condição de maior intensidade luminosa (I_{100%}) melhora os valores de crescimento e de massa seca total, com média de 3,639 g, enquanto, a menor média para I_{50%}, foi igual a 1,683 g planta⁻¹ (Figuras 9 A, B). Gonçalves et al. (2012) verificaram que a maior capacidade fotossintética (*A_{max}*) foi encontrada nas plantas de melissa conduzidas em condição de maior luminosidade, conseqüentemente, maior produção de biomassa seca. No entanto, a produtividade vegetal não será determinada apenas pela capacidade de assimilação de carbono, mas por uma série de outros fatores, como a eficiência na partição de fotoassimilados, cujo resultado final será o acúmulo de biomassa (VIEIRA et al., 2010). Silva et al. (2016) verificaram que

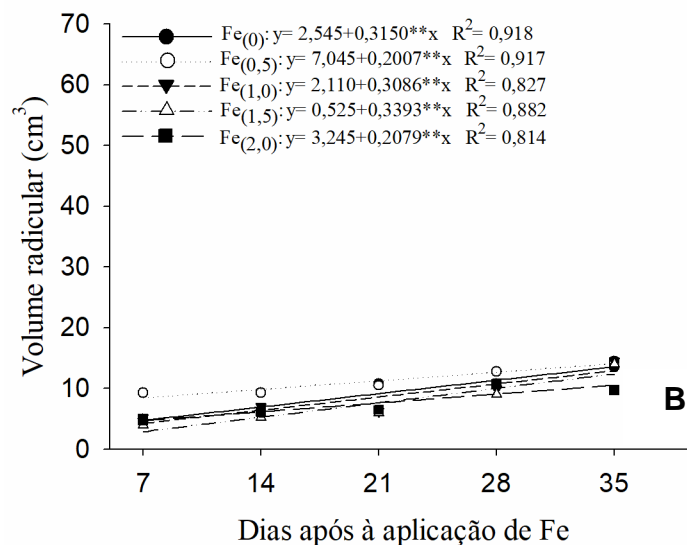
plantas de *M. piperita* expostas a pleno sol apresentaram melhor desempenho em relação a avaliação do comprimento, diâmetro e número de folhas. Chagas et al. (2010b) em *Mentha arvensis* obtiveram maior produção de biomassa seca quando as plantas foram cultivadas a pleno sol, reduzindo linearmente com o aumento do sombreamento.

Volume radicular (cm³)

A arquitetura do sistema radicular, na dependência de Fe e das condições de luz, foi modificada por concentrações mais elevadas de Fe. As principais alterações morfológicas foram relacionadas à redução do comprimento e, possivelmente, pela emissão de raízes laterais, resultando em redução na área de superfície que promoveu, conseqüentemente, decréscimo no volume total (Figuras 10 A, B), sobretudo em condição de menor irradiância (I_{50%}).

Figura 10 - Volume radicular, em cm³, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 8 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





O Fe impacta negativamente a arquitetura radicular por reduzir o crescimento, sendo esta redução evidenciada, principalmente, na iniciação e desenvolvimento de raízes laterais e tais alterações são reguladas pelos hormônios etileno e auxina (LI et al., 2015a). Com efeito, o etileno atua na formação de raízes laterais por induzir a expressão de transportadores de auxina (e.g., *AUX1*) e, sob condições de excesso de Fe, o aumento na produção de etileno em raízes é considerado um mecanismo de tolerância, pois preveniria o declínio excessivo da emissão de raízes laterais, reduziria o acúmulo de Fe nos tecidos celulares e aumentaria a expressão de ferritinas (FER1 e FER2) (LI et al., 2009; LI et al., 2015). Dessa forma, os nossos resultados em parte, pode ser justificado pelo balanço de auxina e etileno, pois sob condições de excesso de Fe ocorre aumento na produção de etileno e de auxina em raízes como um mecanismo de tolerância, que, por sua vez, o etileno é um potente hormônio inibidor do crescimento de raízes e a auxina, em altas concentrações também inibe o crescimento radicular (LI et al., 2009; LI et al., 2015; JUNQUEIRA, 2018).

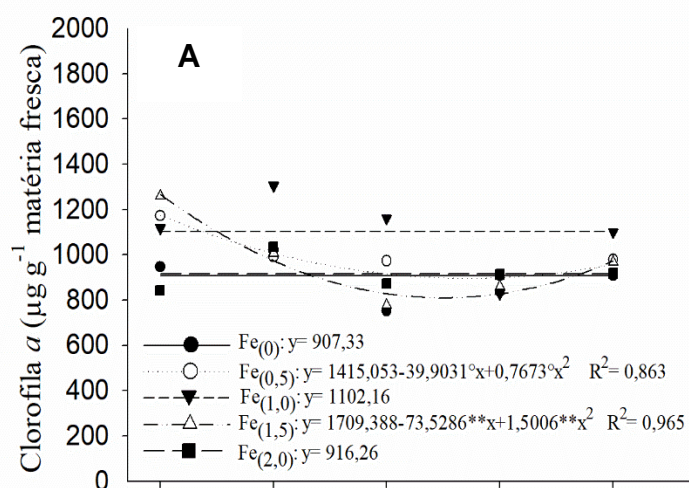
2.3.3 Pigmentos fotossintéticos

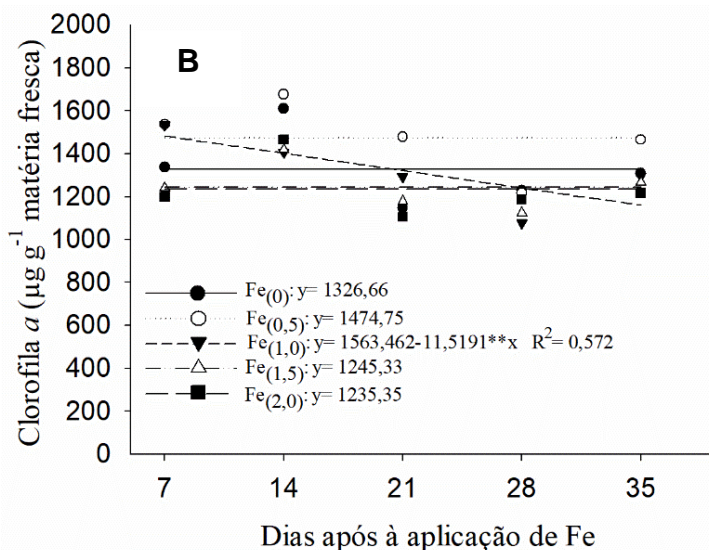
Clorofila a

Vários estádios do metabolismo dos pigmentos fotossintéticos são dependentes de Fe (BRIAT et al., 2010), exercendo, portanto, papel essencial no

metabolismo das clorofilas (SULTANA et al., 2001). Nas figuras 11 A e B são demonstrados os resultados dos teores de clorofila *a* das plantas de *M. piperita* submetidas as diferentes concentrações de Fe e as diferentes condições de irradiância, nas várias épocas de avaliações. A aplicação exógena de Fe modificou o conteúdo de clorofila *a* independentemente da época de avaliação. Os resultados dos teores foliares de pigmentos fotossintéticos revelam que houve efeito significativo do tratamento com Fe a 1,5 g L⁻¹ e condições de I_{100%}, diminuindo os valores de clorofila *a* (Figura 10 A). As plantas cultivadas sob I_{50%}, com aplicação de 1,0 g L⁻¹ de Fe apresentaram redução nos teores de clorofila *a* ao longo do tempo (Figura 11 B). Esse resultado corrobora com os observados por Jucoski et al. (2016) que verificaram nas plantas de *Eugenia uniflora* L. expostas às concentrações de 1,0 e 2,0 mM de Fe, decréscimos significativos nos teores de clorofila *a* e de carotenoides

Figura 11 - Teores médios de clorofila *a* (µg g matéria fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





O valor de clorofila *a* foi de 978,102 $\mu\text{g g matéria fresca}^{-1}$ em condição de $I_{100\%}$ e de 1320,732 $\mu\text{g g matéria fresca}^{-1}$ com $I_{50\%}$. Dessa forma, maiores teores de clorofilas nas folhas de *M. piperita* foram verificados nas plantas que cresceram sob ambiente com menor intensidade de luz (Figuras 11 A, B), o que pode representar um mecanismo de resposta à baixa luminosidade. De acordo com Poudel et al. (2008), a luz é essencial para o desenvolvimento de cloroplastos e síntese de clorofilas em células vegetais.

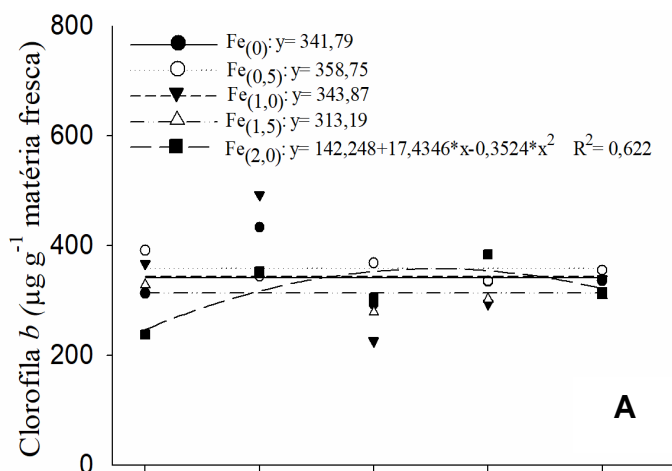
O conteúdo de clorofila na folha de plantas crescidas em ambientes sombreados é uma referência eficaz para explicar a influência do mecanismo de otimização de absorção de luz por pigmentos fotossintéticos (DAÍ et al., 2009), como observado em condição de ambiente sombreado do presente estudo. Abreu et al. (2013) não encontraram efeito significativo em plantas de manjeriço (*Ocimum Basilicum* L.) para teores de clorofila *a* nas diferentes condições de luminosidade.

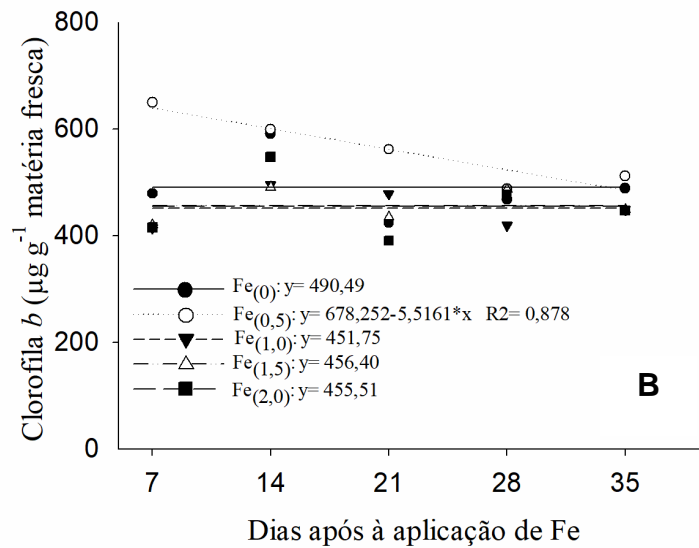
Clorofila *b*

A aplicação da maior concentração de Fe elevou a concentração de clorofila *b* de maneira mais expressiva dos 21 aos 28 DAT, com queda aos 35 DAT, em condição de $I_{100\%}$, enquanto, que em condição de $I_{50\%}$ a aplicação da menor concentração de Fe (0,5 g L^{-1}) apresentou valores elevados nas primeiras avaliações com redução dos valores ao longo do tempo (Figuras 12 A, B). Essa condição com menor incidência de

luminosidade é importante para elevar a concentração de clorofila *b* ($483,315 \mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹), que por sua vez, é importante para a captação de energia de outros comprimentos de onda e a transferência para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese e representa um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa (Figura 12 B) (SCALON et al., 2003), enquanto, em I_{100%} o valor de clorofila *b* foi de $335,208 \mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹ (Figura 12 A). Pinto et al. (2014), avaliando a produção de *Achillea millefolium* L. cultivadas sob telas coloridas, observaram que a qualidade e a intensidade espectral da luz não influenciaram os teores de clorofila *b*.

Figura 12 - Teores médios de clorofila *b* ($\mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





Portanto, plantas que cresceram sob $I_{50\%}$ apresentaram maior produção de clorofilas *a* e *b* (Figuras 11 B; 12 B). O aumento da concentração de clorofila *b* nas plantas sombreadas pode ser considerado como característica importante de adaptabilidade vegetal em ambientes sombreados, uma vez que, a clorofila *b* absorve energia em comprimentos de onda diferentes da clorofila *a* e a transfere para o centro de reação, maximizando, assim, a captura energética que efetivamente atua nas reações fotoquímicas (LIMA et al., 2011).

Liphan e Detpiratmongkol (2017) verificaram em plantas de *Andrographis paniculata* Burm. F. (Nees), cultivadas sob 80% de sombreamento, maior teor de clorofilas *a* e *b* na folha, respectivamente, 0,23 e 0,63 mg/100 g de massa fresca da folha, enquanto, que foram obtidos menores valores em plantas cultivadas sem sombreamento, 0,02 e 0,07 mg/100 g, respectivamente, de clorofilas *a* e *b*.

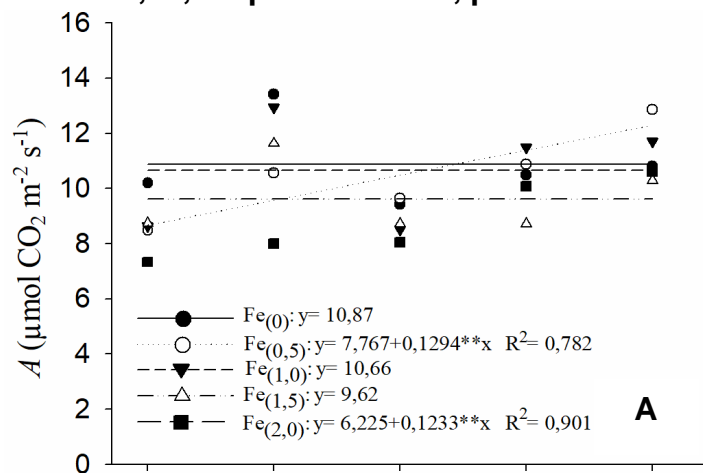
2.3.4 Trocas gasosas

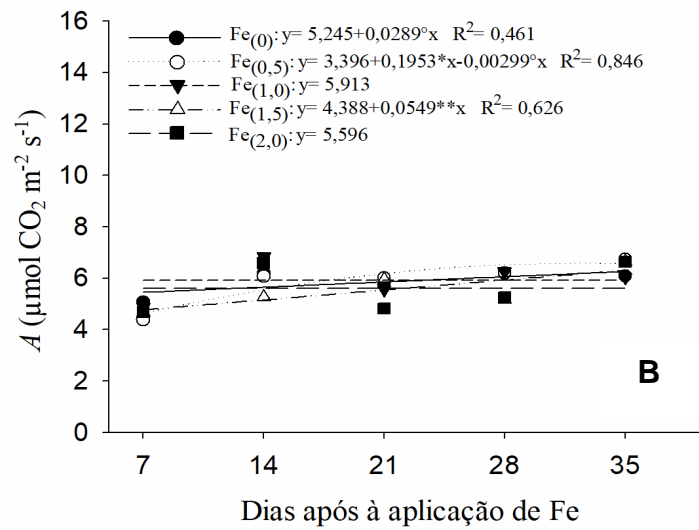
Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

A aplicação de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe aumentou os valores de fotossíntese líquida pelas plantas, resultando em maior atividade da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBP) (Figuras 13 A, B). O que pode ter refletido em

incrementos de biomassa total pelas plantas, no entanto, não modificou a concentração intracelular de CO₂ (Figuras 9 A, B; 15 A, B). Além disso, a aplicação da maior concentração de Fe em condição de maior irradiância modifica a assimilação das plantas (13 A). O excesso de Fe pode reduzir o desempenho fotossintético, fato normalmente acompanhado de fotoinibição da fotossíntese (PEREIRA et al., 2013; MÜLLER et al., 2015). Em condição de I_{50%}, a aplicação de 1,0 e 1,5 g L⁻¹ de Fe afeta a assimilação de CO₂ (Figura 13 B). A capacidade fotoquímica e bioquímica para a fixação de CO₂ foram preservadas sob elevação de Fe, em condição de I_{50%}, sugerindo que as reduções na A, ora observadas, foram fundamentalmente associadas a fatores difusivos. Ravet et al. (2011) mostraram superacumulação de mRNA de ferritina e outros transcritos alvo e, como consequência, a resposta da planta ao tratamento oxidante e pró-oxidante, como Fe e alta luz, foi prejudicada, e a fotossíntese e o crescimento da planta diminuíram.

Figura 13 - Taxa de assimilação de CO₂ (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





De maneira geral, a fotossíntese líquida eleva em condição com maior DFFFA ($403,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), resultado semelhante aos observados ao uso de CO_2 pelas plantas (Figuras 13A; 17A). No entanto, essa condição não causa alteração da condutância estomática (g_s), apesar da intensidade luminosa ser um dos principais fatores responsáveis por alterações em g_s , e, esta, refletem na taxa assimilatória líquida, concentração interna de CO_2 e eficiência de uso de CO_2 (Figuras 14A; 13A; 15 A; 17 A) (COSTA; MARENCO, 2007; SCHOCK et al., 2014). A capacidade de difusão do CO_2 através da condutância do mesófilo, juntamente com a g_s e a capacidade bioquímica (propriedades cinéticas e regulação das enzimas) são os fatores que mais limitam a fotossíntese (FLEXAS et al., 2012). Além disso, em condições de DFFFA elevadas, a assimilação de carbono declina a favor da fotorrespiração, refletindo na produção de espécie reativa de oxigênio.

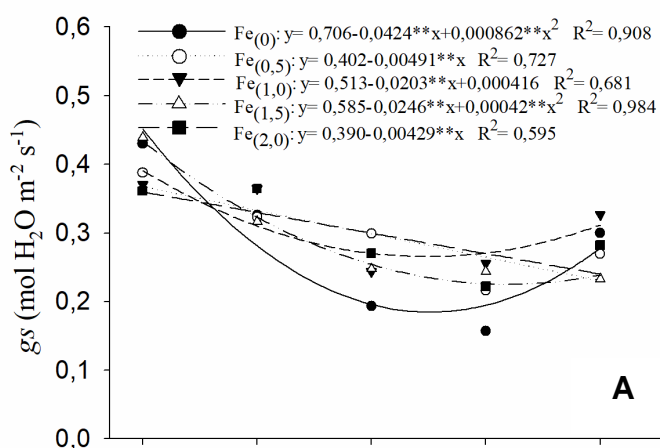
A condição de $I_{50\%}$, por apresentar menor quantidade de fótons, $238 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com maior área foliar útil, reflete em menor fotossíntese líquida, $5,757 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de A (Figuras 5 B; 13 B). Cassol et al. (2007) em *M. piperita* observaram que a redução da intensidade luminosa em 50% causou decréscimo de 60% na taxa de assimilação do CO_2 .

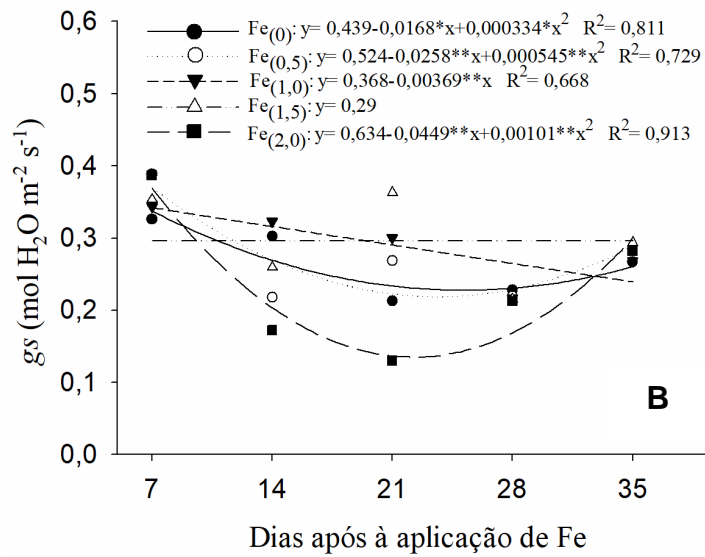
Condutância estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹)

A condutância estomática (g_s) foi afetada pela aplicação de Fe, observando-se reduções à medida que elevou a concentração aplicada de desse elemento. Em condição de I_{50%}, a aplicação da concentração mais elevada de Fe diminui essa variável a valores significativamente maiores do que aqueles das plantas cultivadas sem ferro (Figuras 14 A, B).

De maneira geral, os valores de g_s das plantas conduzidas em I_{100%} são maiores do que de plantas cultivadas a I_{50%} (Figuras 14 A, B). Nesse caso, afirmamos a importância da luz no estímulo da abertura dos estômatos, o que justifica a tendência de elevação da g_s em ambientes com maiores intensidades de luz (Figura 14 A). Sob baixos níveis de luz, as plantas apresentam valores reduzidos para taxas fotossintéticas, g_s e transpiração (E) (Figuras 13 B; 14 B e 16 B).

Figura 14 - Condutância estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





A tendência de redução dos valores de g_s em condição de $I_{50\%}$ ($0,274 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em comparação a condição de $I_{100\%}$ ($0,298 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) pode ser resultado da redução na temperatura e no déficit de pressão de vapor (DPV), que reflete em menor necessidade de fechamento estomático, em função da redução nas perdas de água pela transpiração (E), sendo que a difusão de CO_2 para o interior da folha pode ser mantida por períodos mais longos. A condição com maior DFFFA, quando em restrição na disponibilidade de água, as plantas tendem a manter os estômatos fechados na maior parte do dia, resultando em reduzidos valores de g_s (Figura 14 A, B)

O fechamento estomático limita a perda de água e, também, restringe a entrada de CO_2 , levando à redução da assimilação fotossintética de carbono (DITMAROVÁ et al., 2010), sendo esta resposta conhecida como limitação estomática da fotossíntese (YIN et al., 2005). Se o carbono interno e g_s decrescem simultaneamente, a assimilação é limitada, principalmente, pela redução da g_s (CRAMER et al., 2007; YAN et al., 2010). Em contraste, se a g_s decresce, mas o carbono interno aumenta ou apresenta-se constante, o decréscimo da assimilação de CO_2 pode ser atribuído a fatores não estomáticos (YAN et al., 2010). Além disso, a avaliação da relação A/C_i também permite a diferenciação entre a limitação estomática e não estomática (ENNAHLI; EARL, 2005). Os estômatos respondem aos fatores ambientais, atendendo à demanda de CO_2 , no entanto, essas repostas são mais lentas que o

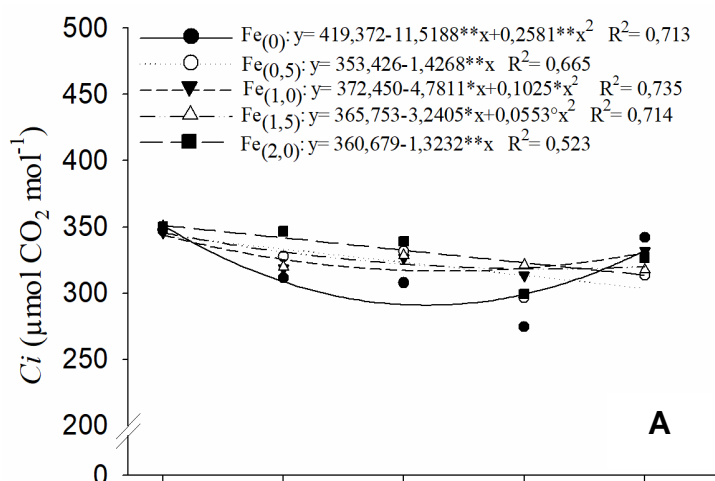
processo da fotossíntese, o que pode causar desbalanço entre a g_s e a assimilação de carbono (LAWSON et al., 2012).

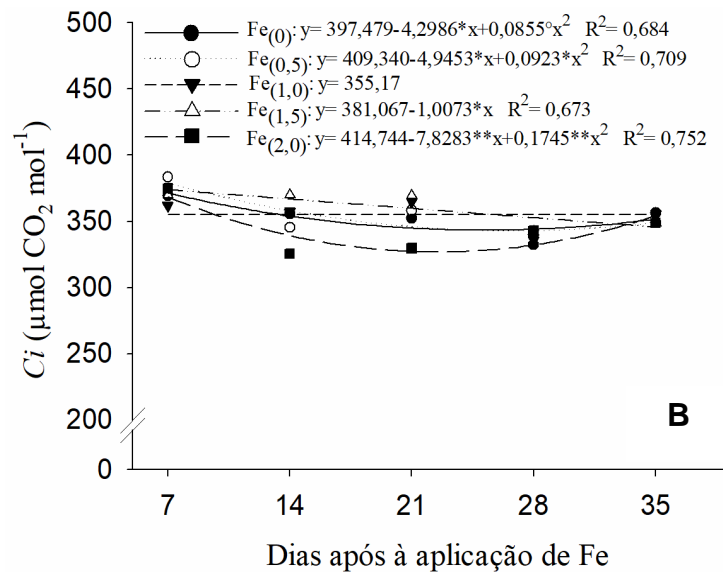
Concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$)

A redução da concentração interna de CO₂ (C_i) e o aumento das taxas de assimilação desse gás indicam maior atividade metabólica das plantas (Figuras 15 A; 13 A; 17 A), o que pode ser explicado também pela elevação da taxa de carboxilação observada nas plantas cultivadas com aplicação de concentrações iguais a 1,0 g L⁻¹ de Fe, em condição de I_{100%} (Figura 17 A) e das demais concentrações, exceto de 1,0 e 2,0 g L⁻¹, em condição de I_{50%} (Figuras 15 B; 13 B).

Como reflexo dos elevados valores de assimilação e de uso de CO₂, plantas em condição de maior irradiância apresentaram também menores valores de concentração interna de carbono (325,477 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), em comparação com plantas sob I_{50%} (353,613 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) (Figuras 13 A, B; 17 A, B; 15 A, B).

Figura 15 - Concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





Em plantas cultivadas em condição de $I_{50\%}$ é de se esperar maior concentração interna de CO₂. Isso se deve ao fato dos baixos valores de DFFFA, fechamento estomático e da baixa capacidade de assimilação de CO₂ pela RuBP, considerando que os processos de interceptação e transformação da energia luminosa são também afetados pela luz. Taiz e Zeiger (2009) relatam que em condição de ambiente sombreado, a limitação fotossintética ocorre pela redução na atividade nos mecanismos de absorção e transformação da energia luminosa, visto que a energia incidente é limitada, reduzindo a quantidade de energia (ATP) e de poder redutor (NADPH₂), formados para a síntese orgânica, visto que a entrada de CO₂ no mesofilo não é um fator limitante.

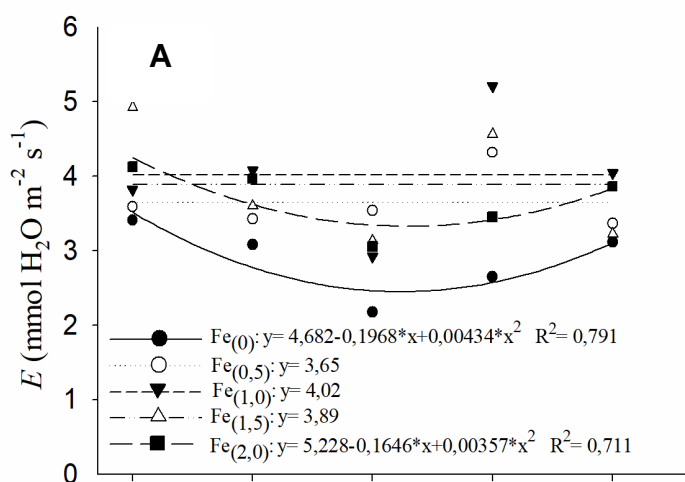
Tem sido proposto que tanto fatores estomáticos (resistência à entrada de CO₂) como fatores não estomáticos (baixa atividade enzimática na assimilação de CO₂) podem ser as principais causas da redução da assimilação de carbono, sendo reflexos das mudanças dos padrões de g_s e carbono interno (FARQUHAR; SHARKEY, 1982; MIELKE et al., 2003; HERRERA et al., 2008). Portanto, a maior concentração de carbono interno do tratamento que passou por limitação de luz não foi o fator limitante para as menores taxas de fotossíntese líquida (Figuras 15 B; 13 B).

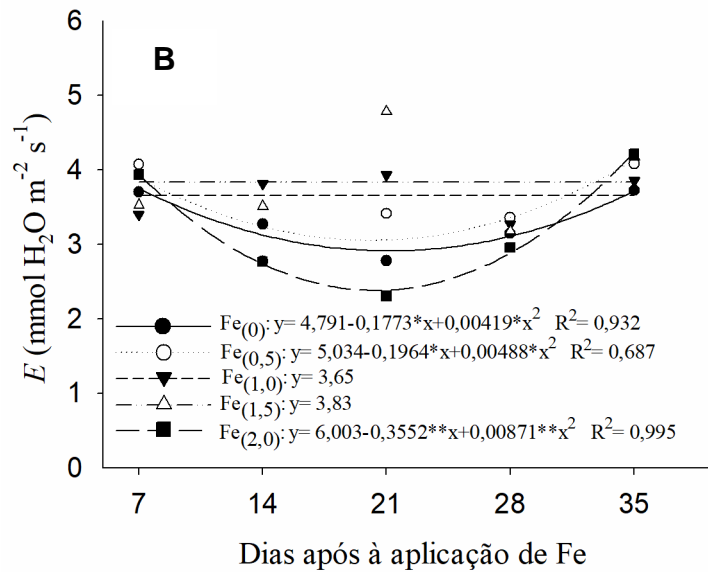
Taxa de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

A aplicação da maior concentração de Fe elevou, em média, a taxa de transpiração (E), da mesma forma que o observado para g_s , sobretudo, em condição de baixa irradiância ($I_{50\%}$) (Figuras 16 B; 14 B). Estudos sugerem que o controle estomático reflete em restrição significativa no fluxo do CO_2 e na transpiração da folha (FAVARETTO, 2009; GAMON; BOND, 2013).

De maneira geral, plantas que receberam $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe apresentam comportamento linear no decorrer do tempo em relação à E , em ambas as condições de irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$). Plantas que receberam aplicação da maior concentração de Fe apresenta queda da E , sobretudo em condição de $I_{50\%}$ (Figuras 16 A, B), refletindo inclusive na produção de biomassa total (Figura 9 B), enquanto, que em condição de $I_{100\%}$, a não aplicação de Fe diminui substancialmente à E pelas plantas (Figura 16 A).

Figura 16 - Taxa de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





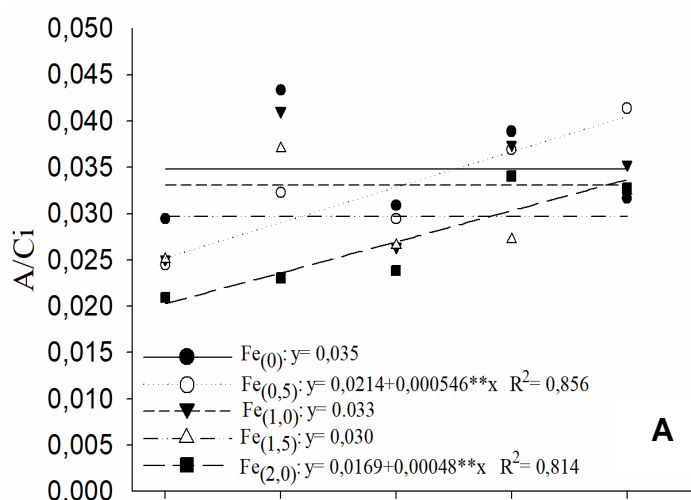
Os valores de E revelam que em condição de $I_{100\%}$ e $I_{50\%}$ tendem a ser semelhantes, respectivamente, $3,628 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $3,519 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Em média, aos 35 DAT, plantas em ambas condições de cultivo eleva a eficiência de transpiração instantânea, calculada como a razão de fotossíntese/transpiração, seguindo tendência da g_s (Figuras 16 A, B; 14 A, B). Essa condição é determinante para elevar a atividade da RuBP e eficiência de uso da água pelas plantas (Figuras 17A, B; 18 A, B).

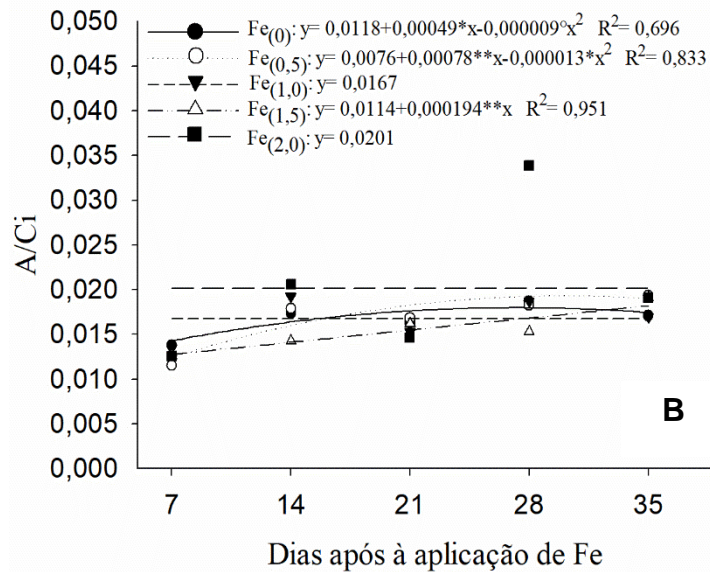
Além disso, é importante destacar que em condição de cultivo $I_{100\%}$ ocorre elevação dos valores de fotossíntese líquida, no entanto, não promove mudanças da E (Figuras 13 A; 16A), já que os valores podem ser atribuídos ao aumento significativo da mesma em plantas em condição de maior DFFFA, pois a maior incidência de radiação sobre a folha promove aumento de temperatura, aumentando assim, a diferença de pressão de vapor entre o ar e folha, o que facilita a E (SCHOCK, 2014). Kudoyarova et al. (2013) ilustraram a importância do controle da E em consequência da redução da abertura estomática. Este fato possibilita a reidratação dos tecidos através do gradiente entre os potenciais da água na planta e no solo.

Eficiência de carboxilação (A/Ci)

Plantas sem e com pulverização de 0,5 e de 2,0 g L⁻¹ de Fe apresentaram maiores taxas de carboxilação (A/Ci), com elevação dos valores no decorrer do tempo, sobretudo em condição de I_{100%}, o que, assemelha em parte os valores de concentração de carbono interno (Figuras 17 A, B; 15 A, B). De maneira geral, em condição de I_{50%} a aplicação de 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de Fe leva à resposta linear no decorrer do tempo, enquanto, a menor concentração tende a elevar, reafirmando a utilização de CO₂, respectivamente, em ambas as condições de irradiância, refletindo em ganho de produtividade (Figuras 17 A, B; 9 A, B).

Figura 17 - Eficiência de carboxilação (A/Ci), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





A condição de maior irradiância promoveu maior A (Figura 13 A), no entanto, a g_s foi o mesmo entre as condições de irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$) (Figuras 14, A, B), sugerindo que a g_s não era o fator limitante, mas sim sua A/C_i , que foi maior em condição de $I_{100\%}$ (0,031 A/C_i), em relação ao ambiente com $I_{50\%}$ (0,017 de A/C_i) (Figuras 17 A, B), discordando em parte com os valores de concentração interna de CO_2 (Figuras 15 A, B).

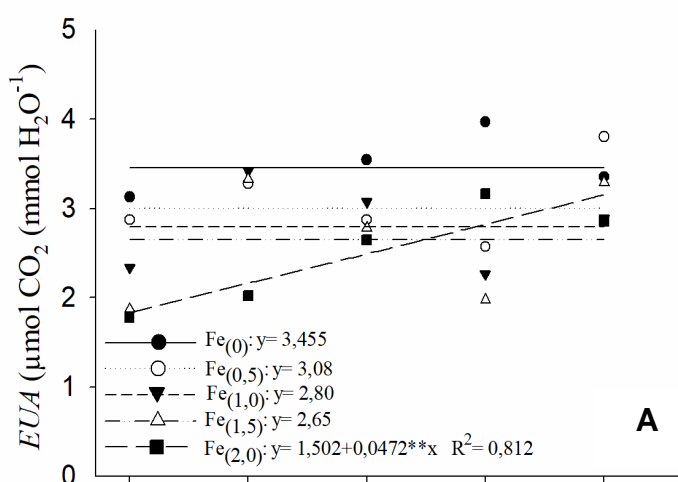
Essa diferença na A/C_i teria surgido da elevação da taxa de assimilação de carbono ao longo do tempo que acompanhou um mesmo padrão para a eficiência de A/C_i , uma vez que, o cálculo da mesma depende da assimilação de carbono (Figuras 17 A, B; 13 A, B).

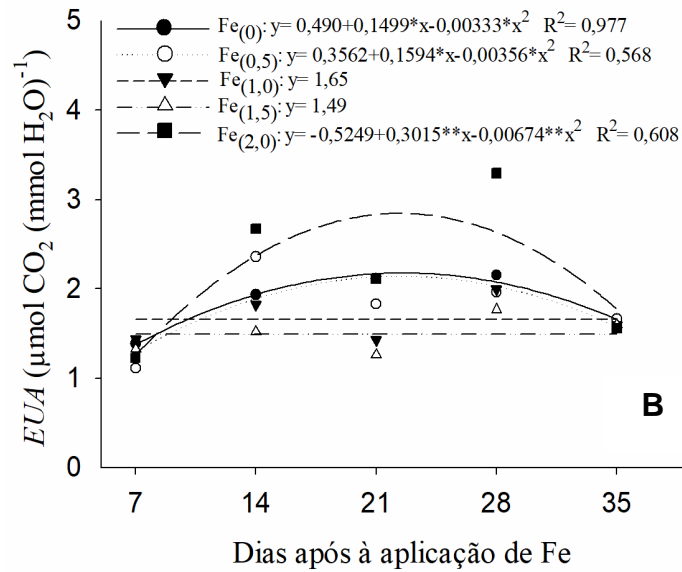
Eficiência do uso da água (EUA , $\mu\text{mol } CO_2 \text{ (mmol } H_2O)^{-1}$)

A eficiência do uso da água (EUA) é obtida pela relação entre as taxas de assimilação (A) e de transpiração (E). Dessa forma, quanto maior for à A e menor for à de E , maior será a EUA (FERRAZ et al., 2012). Portanto, a alta eficiência de carboxilação é a relação que mostra o funcionamento ou não da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase (RuBP) tão importante na fixação do CO_2 para o processo da fotossíntese que, junto com a maior abertura estomática proporcionou elevados valores de assimilação de CO_2 .

De maneira geral, plantas pulverizadas com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe apresentam elevados valores de *EUA* (Figuras 18 A, B). As plantas desse tratamento continuaram apresentando alta taxa de *E*, $3,237 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mas devido às altas taxas de *A* continuaram apresentando alta *EUA*, $1,790 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$, em condição de $I_{50\%}$ (Figuras 16B, 13B e 18 B). Em condição de $I_{100\%}$, os valores de *E* de $3,628 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foram maiores, enquanto, que *EUA* foi de $2,895 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$ (Figuras 16 A; 18 A). Deve-se destacar que a redução da atividade da RuBP resulta em elevação da *E*, que leva à redução da eficiência de uso da água.

Figura 18 - Eficiência do uso da água (*EUA*, $\mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com: 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





De maneira geral, a *EUA* também diminuiu com a redução da intensidade da luz, ou seja, a maior *EUA* foi observada sob nível maior de luminosidade ($2,895 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$), em comparação às plantas com $I_{50\%}$ ($1,790 \mu\text{mol CO}_2 (\text{mmol H}_2\text{O})^{-1}$) (Figuras 18 A, B). Em condição de $I_{50\%}$, esperava-se que, devido à maior disponibilidade de água, levaria a maior g_s , maior E , maior taxa de A e, como consequência, elevada *EUA* (Figuras 14 B; 16 B e 13 B; 18 B). No entanto, esse resultado está mais relacionado a fatores enzimáticos, ou seja, da atividade da RuBP. Em condição $I_{100\%}$, a maior A deveu-se a sua maior taxa de A/C_i , uma vez que, não houve mudanças significativas nos valores de g_s , assim como, sua E e, portanto, apresentou maior *EUA* (Figuras 13 A; 17 A; 14A; 16 A; 18 A). Em condição de $I_{50\%}$, a menor A , g_s e a menor taxa de E , sem e com pulverização de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, não levou à redução na *EUA* pelas plantas de *M. piperita* nessa condição (Figuras 13 B; 14 B; 16B; 18 B).

Os poros estomáticos também permitem a perda de vapor de água para a atmosfera pela E , enquanto ocorre a entrada de CO_2 . Assim, um rígido controle sobre a abertura estomática é essencial, para que não ocorra perda excessiva de água pela planta, ou que ela fique privada de CO_2 , pois a *EUA* é um dos fatores determinantes na produção das plantas. Esse fino controle é atingido através de uma refinada sensibilidade das células-guarda para os sinais ambientais e endógenos, incluindo luz, temperatura, umidade, CO_2 , concentração interna de CO_2 na câmara

subestomática, solutos celulares, íons específicos, pH e ácido abscísico, além da quantidade de água na planta. Assim, a melhor captação de água do solo e não somente a redução da perda de água pela *E*, também é fator importante (BLUM, 2009).

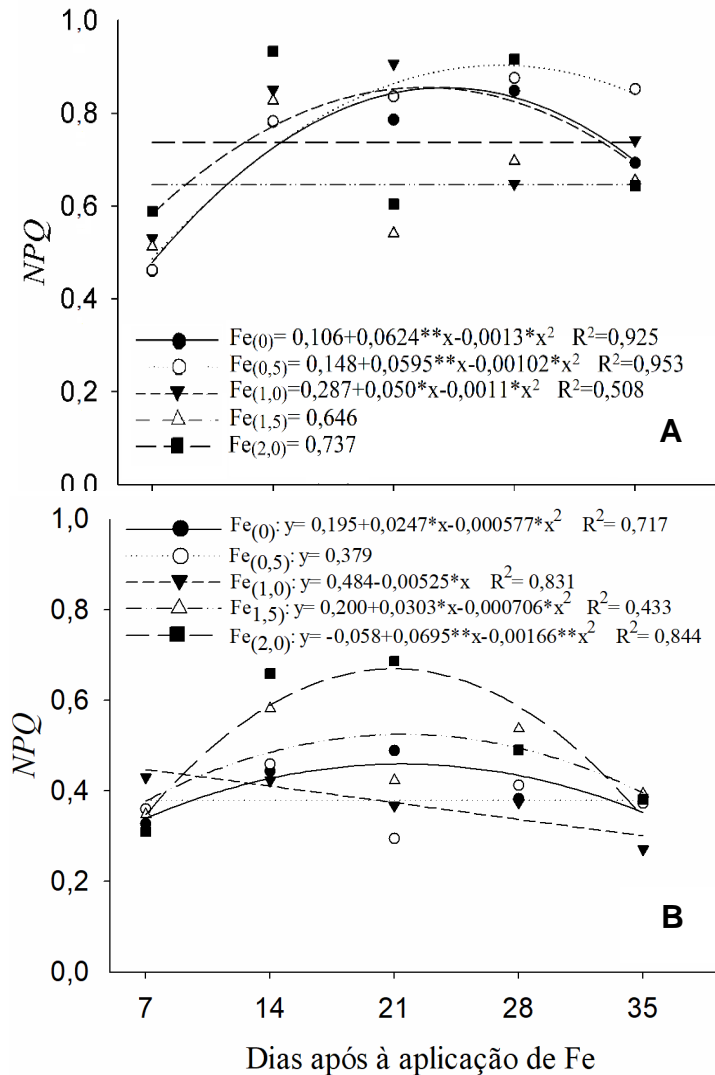
2.3.5 Fluorescência da clorofila *a*

Quenching não fotoquímico (NPQ)

Os valores de quenching não fotoquímico (NPQ) aumentaram em plantas sem e com pulverização de Fe, destacando a menor concentração com Fe, nas plantas crescidas em condição de maior irradiância ($I_{100\%}$), indicando que a maior parte da energia absorvida foi utilizada para elevação da eficiência fotossintética nessa condição (Figuras 19 A, B).

Os baixos valores de transporte de elétrons (ETR) nas plantas submetidas à aplicação de Fe, sobretudo em condição de $I_{50\%}$, justifica o aumento do NPQ com aplicações das maiores concentrações desse íon, ou seja, atua aliviando os fotossistemas pela dissipação de energia na forma de calor (Figuras 23 B; 19 B) (DEMMIG et al., 1987; CHANG et al., 2013), liberando inclusive, a energia térmica através do ciclo das xantofilas (SMIRNOFF, 1993; BAKER, 2008). Entre os mecanismos de fotoproteção, o ciclo das xantofilas desempenha papel importante, tendo em vista que protege o maquinário fotossintético pela dissipação do excesso de energia via interconversão das formas de violaxantina a zeaxantina, com gasto de energia (GUIRAO et al., 2013), como observado no presente estudo pelos valores de NPQ, com as duas maiores concentrações de Fe, em condição de ambiente de $I_{50\%}$ (Figura 19 B).

Figura 19 - Quenching não fotoquímico (NPQ), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



A redução de NPQ (0,442) em condição de I_{50%} indica elevação no uso da energia absorvida pelos pigmentos no PSII para processos fotoquímicos (GUO et al., 2006), em comparação à condição I_{100%} (0,738) (Figuras 19 A, B). A incapacidade de extinguir a energia com segurança por mecanismos reguladores de proteção ou por fotoquímica também foi demonstrada pelos valores de NPQ reduzidos, na última avaliação para a maioria dos tratamentos com Fe e em ambas as condições de cultivo (Figuras 19 A, B).

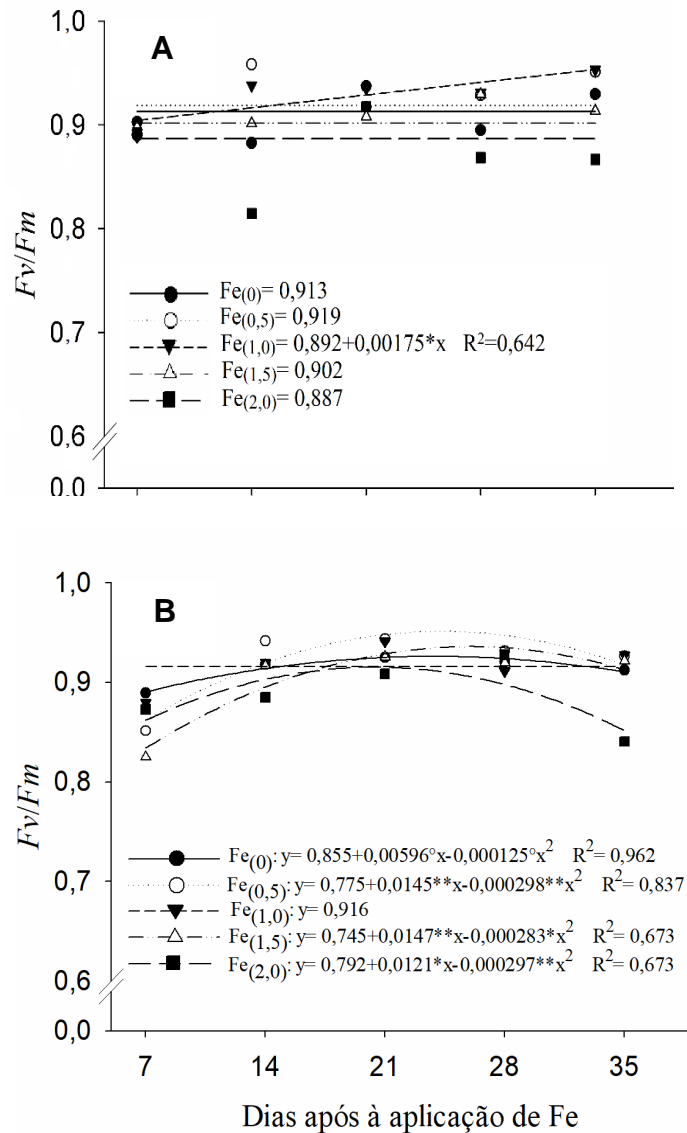
Eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m)

Para F_v/F_m apenas a aplicação de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe tendeu a elevar seus valores, em condição $I_{100\%}$ e de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ com $I_{50\%}$. Portanto, menores concentrações de Fe, em condição de $I_{50\%}$ minimiza danos decorrentes da fotoinibição, como expresso pelos valores de eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m), cujo os valores médios foram superiores (Figuras 20 A, B) e da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), com valores inferiores, em comparação à mesma concentração em condição com maior nível de luminosidade (Figuras 23 A, B).

As plantas com as demais concentrações ($0, 0,5, 1,5$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$) apresentam comportamento linear, em condição de $I_{100\%}$ (Figura 20A). Pinto et al. (2016) verificaram interação entre os tratamentos de Fe e a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos ($p < 0,01$) no sétimo dia, principalmente, sob irradiância acima de $500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Pereira et al. (2013) verificaram em plantas de arroz, que o excesso de Fe (7 mmol L^{-1}) acarretou na redução da eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m), fato associado com o aumento dos níveis da fluorescência inicial (F_0), sugerindo fotoinibição do PSII, podendo até causar desordem no aparato fotoquímico mantido em condição com maior DFFFA.

Os baixos valores de F_v/F_m apresentados pelas plantas com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe estão relacionados com a fotoinibição, ou seja, a redução da capacidade fotossintética quando em baixa intensidade de luz e, assim, há necessidade de dissipar o excesso luz que não está sendo direcionada para a fotossíntese (FARQUHAR et al., 1989) (Figura 20 B).

Figura 20 - Eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



Em plantas cultivadas à pleno sol e em condição de I_{50%} pode-se observar decréscimo no rendimento quântico máximo (F_v/F_m), aos 35 DAT. Essa razão demonstra quais as condições das plantas quanto ao aparato fotossintético (Figuras 20 A, B). Quando seus valores se encontram entre 0,75 e 0,85 são indicativos de maior eficiência na conversão da energia luminosa para o PSII, enquanto, o

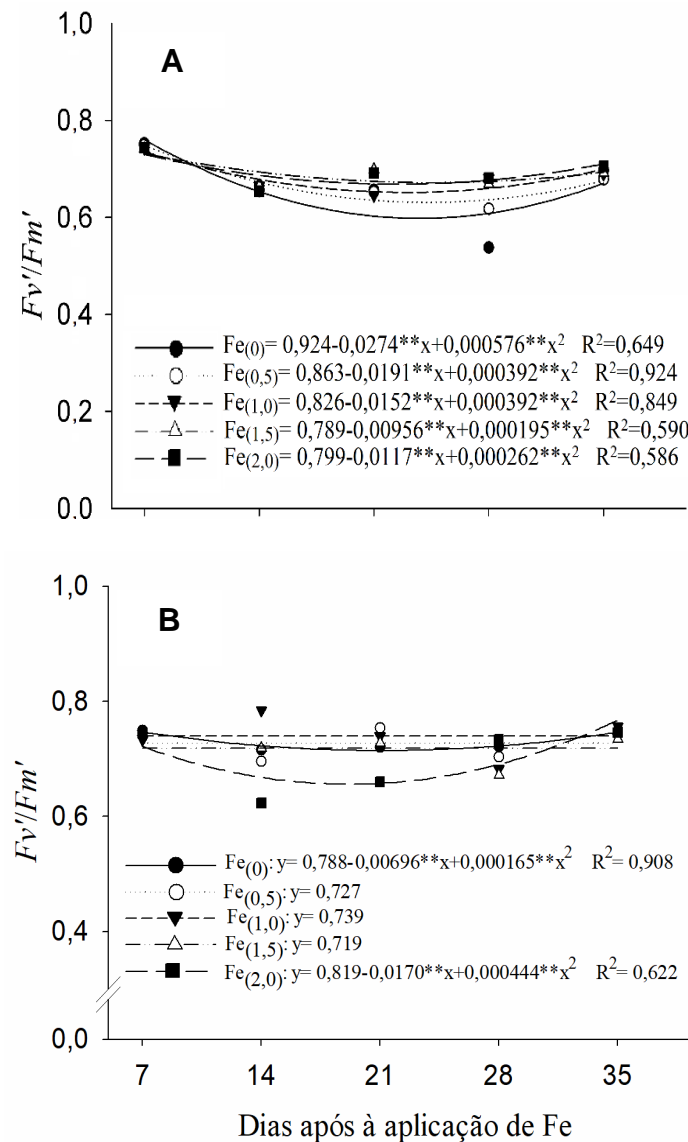
decréscimo nesta razão reflete a presença de fotoinibição nos centros de reação do PSII (BJÖRKMAN; DEMMING, 1987; BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989; SANTOS et al., 2013), o que, foi observado em todos os tratamentos do presente estudo. Deve-se considerar ainda que, em condição de sombreamento não há completa ativação dos fotossistemas, o que acaba comprometendo a etapa fotoquímica da fotossíntese, gerando menor quantidade de ATP e NADPH₂, a serem utilizados para a fixação de CO₂ na etapa bioquímica, expresso em menores valores de assimilação de carbono (FLEXAS et al., 2004). No entanto, isso não refletiu na altura das plantas (Figura 3B), mas diminuiu a produção de folhas, caule e raízes (Figuras 6B; 7B e 8 B).

Gonçalves et al. (2012), estudando plantas de *Swietenia macrophylla*, observaram maior eficiência fotoquímica (Fv/Fm) do PSII nas plantas à pleno sol, o que poderia ser explicado em parte, pela capacidade das plantas em dissipar a energia excedente que poderia ocasionar danos oxidativos ao PSII e, dessa forma, conseguir otimizar o uso da energia luminosa em excesso no ganho em biomassa.

Eficiência quântica da antena (Fv'/Fm')

Plantas submetidas a aplicação da maior concentração de Fe (2,0 g L⁻¹), na condição de I_{50%}, apresentaram os menores valores de eficiência quântica da antena (Fv'/Fm') (Figura 21 B), refletindo em menor produção de NADPH e ATP, produtos do transporte de elétrons e utilizados no ciclo de Calvin, para a produção de fotoassimilados e, possivelmente, translocados para incrementos de biomassa (Figura 9 B). Este padrão de resposta é referente aos danos mantidos no aparato fotoquímico. Além disso, esses parâmetros são indicadores de degradação do polipeptídeo D1 (um importante componente do PSII), resultando na inativação dos centros de reação da fotossíntese (GOLTSEV et al., 2016).

Figura 21 - Eficiência quântica da antena (Fv'/Fm'), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



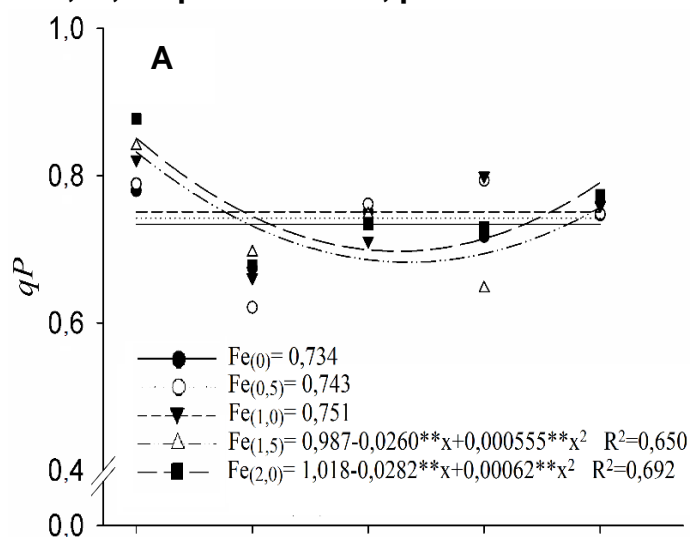
De maneira geral, em ambas as condições de irradiância, os resultados revelam que a aplicação da menor concentração de Fe não causa danos no aparato fotossintético (Fv'/Fm' e qP) de plantas de *M. piperita* (Figuras 21 A, B; 22 A, B). Os resultados demonstram ainda que, plantas de *M. piperita* com aplicação de Fe em condição I_{100%}, em relação as plantas controle, apresentam maior eficiência quântica

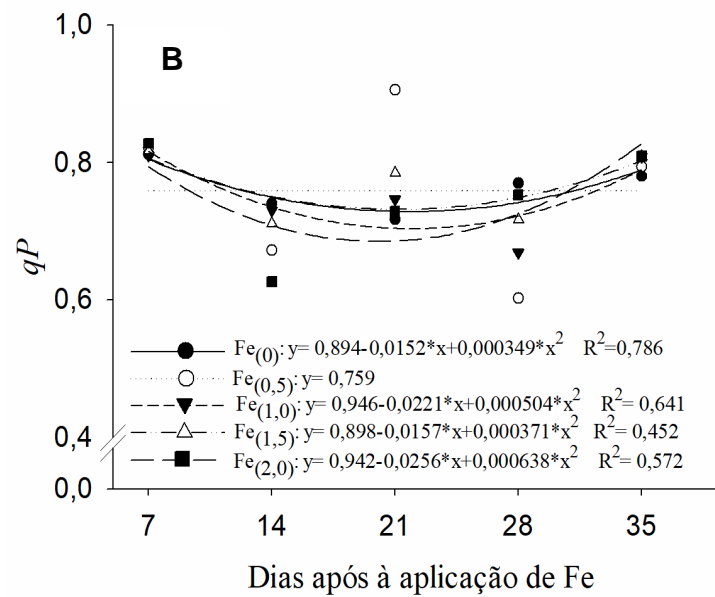
quando mantida em ambiente com incidência maior de luz (Figura 21 A), no entanto, pode ser característica até mesmo da própria espécie, uma vez que, é adaptada ao clima tropical.

Coeficiente de extinção fotoquímica (qP)

O coeficiente de extinção fotoquímica (qP) foi outra característica que apresentou comportamento de redução dos 7 aos 28 DAT, quando concentrações mais elevadas de Fe foram aplicadas e em condição I_{100%} (Figura 22, A). No entanto, não refletiu no metabolismo fotossintético do carbono, pois, o transporte de elétrons ocorreu normalmente, inclusive com ganhos de biomassa total (Figuras 23 A; 9 A).

Figura 22 - Coeficiente de extinção fotoquímica (qP), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





Em condição de $I_{50\%}$, a aplicação da maior concentração de Fe ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) tende a reduzir os valores de qP, dos 7 aos 28 DAT (Figura 22 B). Hussain et al. (2019) verificaram em plantas de soja redução no rendimento quântico (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do fotossistema (PSII), extinção fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas cultivadas com sombreamento a 50%.

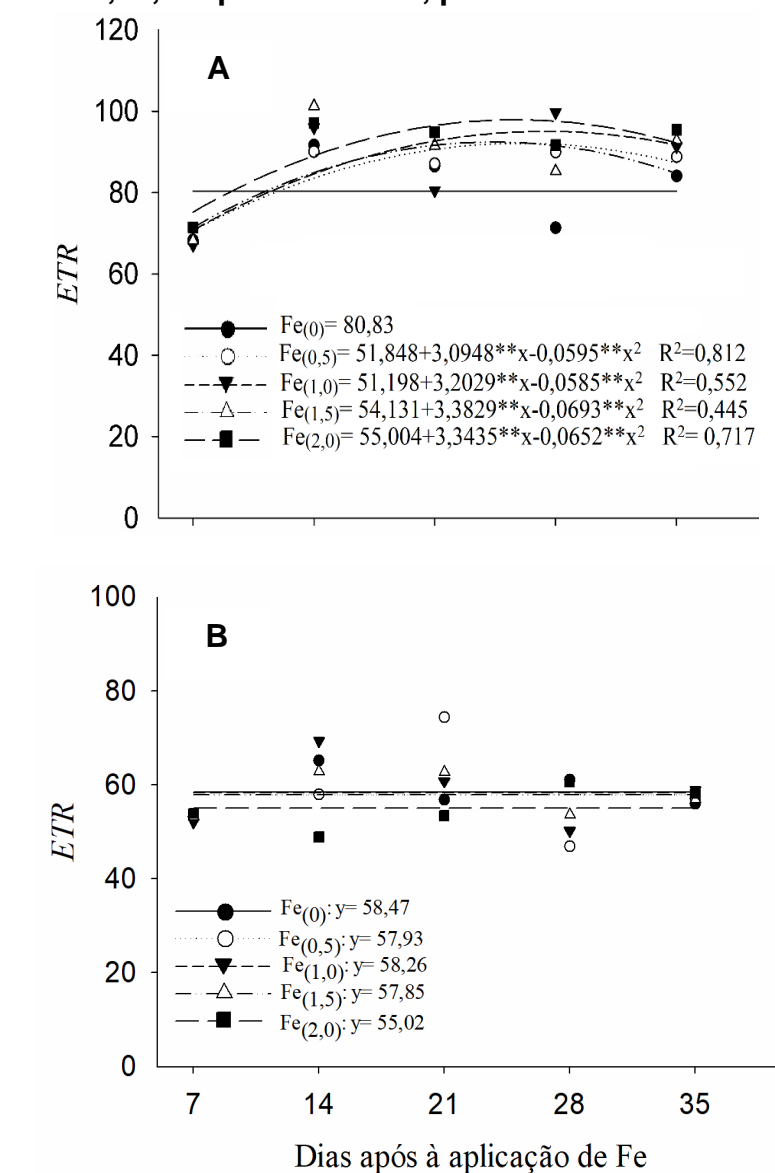
Taxa de transporte de elétrons (ETR)

O Fe é cofator essencial para várias proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese e da respiração (BASHIR et al., 2011; THOMINE; VERT, 2013). A fotoinibição leva à redução lenta da fotossíntese e, conseqüentemente, à redução do rendimento quântico acompanhado por alterações nas atividades do PSII. Esta redução pode estar ligada à interrupção do fluxo de elétrons que acarreta na redução da atividade da enzima RuBP ligada à fixação de carbono (CASSANA et al., 2008).

Quanto os valores de ETR foram avaliados, verifica-se que plantas que receberam Fe e em condição de $I_{100\%}$ tiveram valores maiores que as plantas sem pulverização (Figura 23 A). Em condições extremas de estresse ambiental, os eventos nos tilacoides podem ser afetados interferindo na eficiência da fotossíntese e inativando o PSII e a cadeia de transporte de elétrons que dá origem ao ATP e

NADPH₂ (KRAUSE; WEISS, 1991; COSTA et al., 2003; CHRISTEN et al., 2007; MARTINAZZO et al., 2013). Apesar da literatura relatar que reduções na ETR em resposta ao excesso de Fe podem estar associadas à deficiência de magnésio, por sua vez, é provável que reduza os pools de clorofila (PENG et al., 2019), nas folhas de plantas de *M. piperita*.

Figura 23 - Taxa de transporte de elétrons (ETR), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



Os maiores valores de ETR em condição $I_{100\%}$ pode ter refletido nos maiores índices de assimilação de CO_2 (Figuras 23 A; 13 A). O ETR não modificou em condição de $I_{50\%}$ (Figura 23 B), no entanto, nessa reduz a eficiência de captura de energia de excitação dos centros de reação do PSII (TIAN et al., 2017). Essa redução dos valores de ETR em condição de $I_{50\%}$ (57,508), em comparação à condição de $I_{100\%}$ (86,019), refletiu em menor eficiência na via metabólica de fixação de CO_2 , que, por sua vez, diminuiu a utilização dos produtos da etapa fotoquímica (Figuras 23 A, B; 13 A, B). Larcher (2005) afirma que plantas de sombra aproveitam melhor a radiação em condições de baixa intensidade luminosa. Houborg et al. (2013) relatam que a ETR se torna limitante em altas intensidades de irradiância. Nestas condições, a energia incidente é maior que o maquinário fotossintético é capaz de utilizar, encontrando-se, frequentemente, decréscimo na ETR através do PSII e aumento na taxa de giro da proteína *D1*, principal polipeptídeo do centro de reação do PSII (ANDERSON et al., 1995), processo este conhecido como fotoinibição, que resulta na perda da eficiência fotoquímica do PSII. Em condição de ambiente sombreado, ocorre a redução da ETR, conseqüentemente, redução na quantidade de ATP produzida e na atividade da enzima rubisco (YAO et al., 2017; HUANG et al., 2018).

2.3.6 Análise de carboidratos

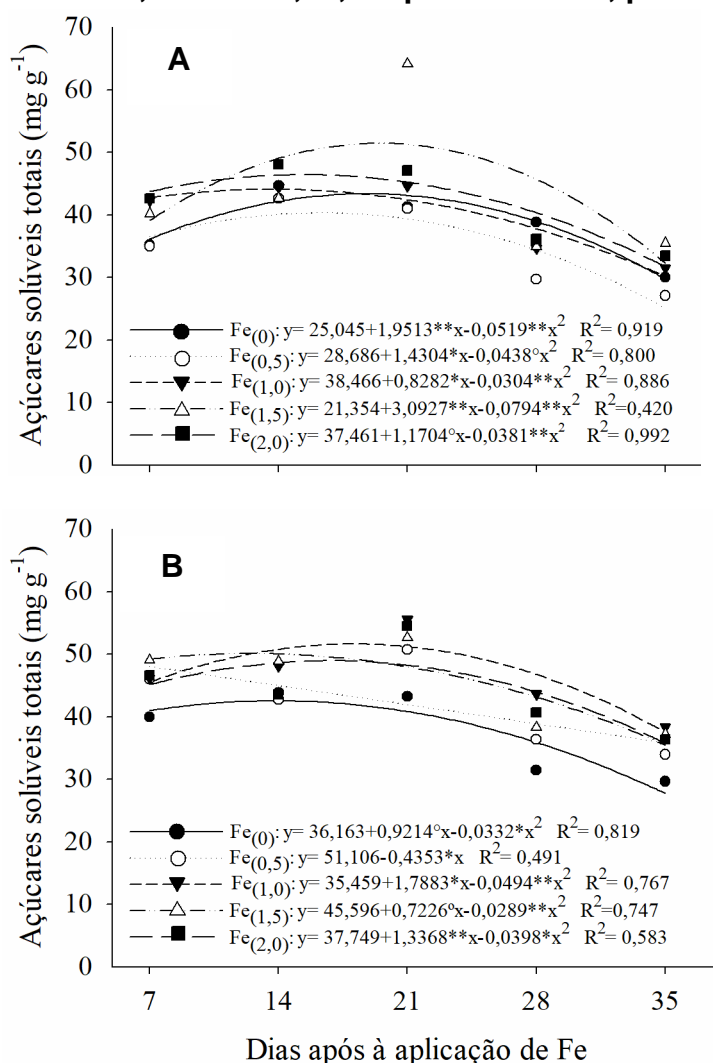
Açúcares solúveis totais

Uma das alterações que ocorre durante a vida da planta é um rápido declínio na fotossíntese (QUIRINO et al., 2000) com o tempo, e os valores na produção e acúmulo de açúcares decrescem em conjunto. As concentrações de açúcares solúveis totais, sacarose e amido nas folhas de plantas de *M. piperita* cultivadas com diferentes concentrações de Fe e diferentes condições de luz, apresentaram mudanças positivas com a aplicação de Fe (Figuras 24 A, B; 26 A, B; 27 A, B). Um dos possíveis mecanismos de aumento de osmorreguladores nos vegetais é a continuidade da atividade fotossintética na planta mesmo em condições de estresse (CAO et al., 2015), o que foi confirmado na presente pesquisa em plantas com a

aplicação de 2,0 g L⁻¹ de Fe, apesar de apresentaram menor assimilação de CO₂ (Figura 24 B; 13 B).

As concentrações de açúcares solúveis totais das plantas em condição de I_{50%}, destacaram-se com a aplicação de 1,0 g L⁻¹ de Fe, diminuindo de forma considerável na ausência de Fe (Figura 24 B).

Figura 24 - Teores de açúcares solúveis totais (mg g massa fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



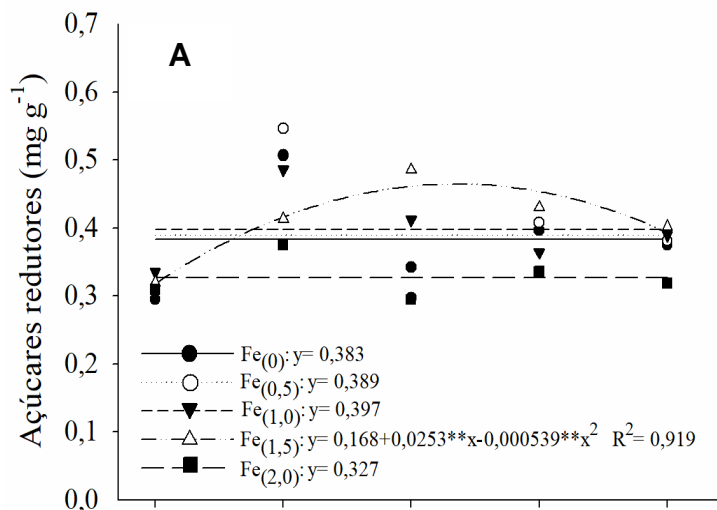
De maneira geral, concentrações elevadas de açúcares solúveis totais foram observadas em condição com maior intensidade de luz, correlacionando com os

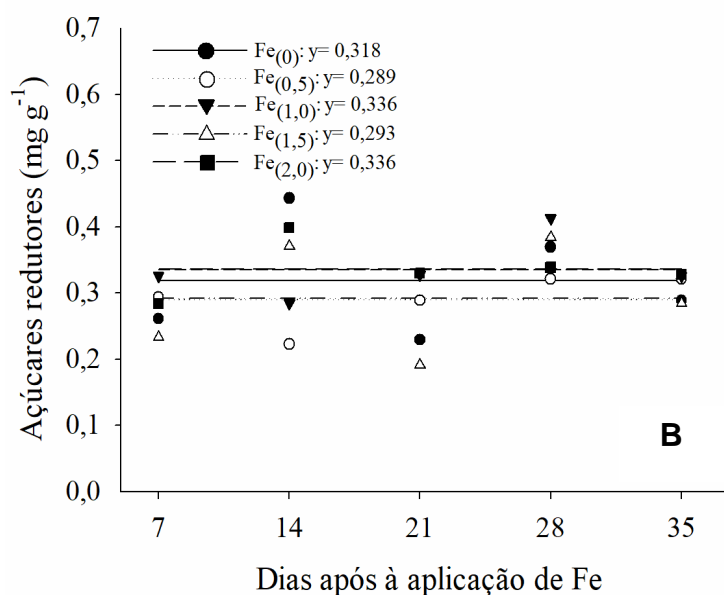
dados de fotossíntese líquida e refletindo positivamente no incremento de biomassa (Figuras 24 A; 13 A; 9 A). A fotossíntese é limitada pela velocidade de difusão de CO_2 através dos estômatos e pela capacidade de converter energia luminosa em química e transformar o CO_2 em açúcares (FLEXAS et al., 2012). Além desse relato, podemos nos referir aos de Godoy (2014) que observaram maiores concentrações foliares de carboidratos solúveis e carboidratos insolúveis nas plantas de sol que nas de sombra.

Açúcares redutores

Quanto à concentração de açúcares redutores observa-se que os tratamentos com concentrações intermediárias de Fe, ou seja, com $1,0$ e $1,5 \text{ g L}^{-1}$, elevaram seus valores, em condição com $I_{100\%}$ (Figuras 25 A). Em condição com $I_{50\%}$, destaca-se a aplicação de $2,0 \text{ g L}^{-1}$, em relação aos valores de açúcares redutores, com pico de síntese dos 7 aos 21 DAT, com conseqüente decréscimo (Figura 25 B).

Figura 25 - Teores de açúcares redutores ($\text{mg g massa fresca}^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



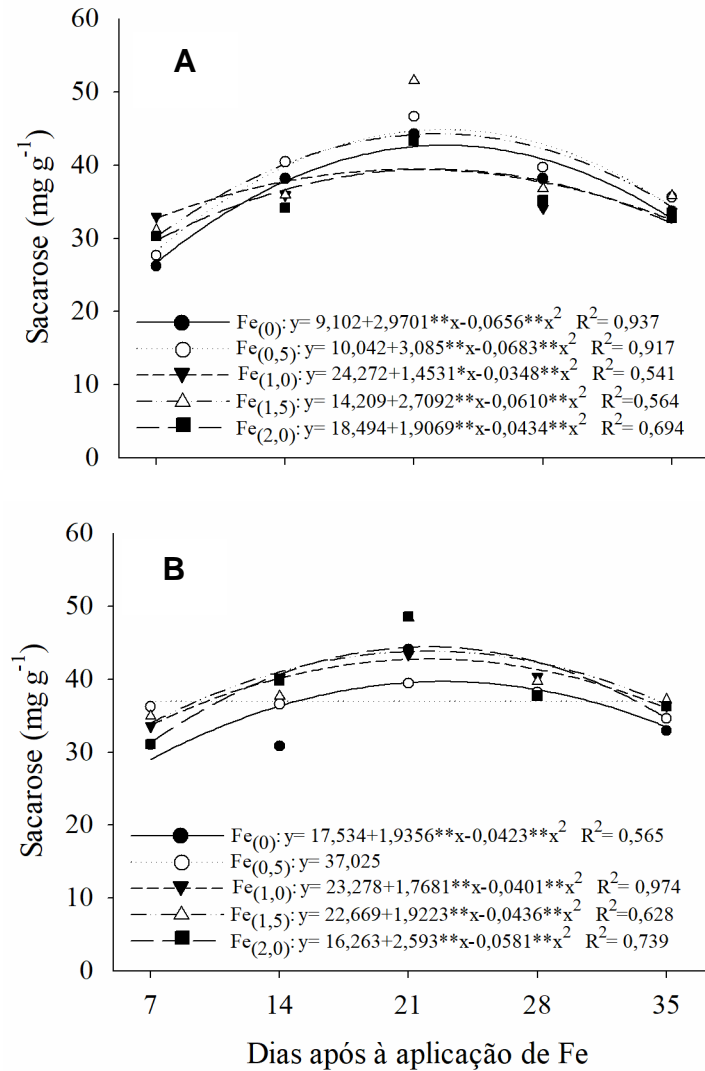


De maneira geral, para a produção de açúcar redutor, pode-se destacar o ambiente com I_{100%}, correlacionando com a produção de açúcares totais (Figura 25 A; 24 A). Assim, o aumento na concentração de açúcares redutores nas folhas das plantas tratadas com Fe está de acordo, em parte, com os dados obtidos para as trocas gasosas, uma vez que, a maior concentração de açúcares redutores, estava limitando as taxas fotossintéticas através de um *feedback* negativo, devido ao acúmulo desses osmólitos. Aos 28 DAT as concentrações de açúcares não modificaram as taxas de assimilação de CO₂ que aumentaram com a aplicação de 1,5 g L⁻¹ de Fe em condição de I_{100%} (Figuras 25 A; 13 A). Os valores de açúcares redutores tendem a elevar nas plantas tratadas com maiores concentrações de Fe, com valores de 0,338 mg g massa fresca⁻¹, em comparação às plantas controle com 0,298 mg g massa fresca⁻¹, em condição de I_{50%} (Figura 25 B).

Sacarose

Em condição I_{100%}, as plantas que receberam aplicação com 0,5 e 1,5 g L⁻¹ de Fe apresentaram incremento no teor de sacarose, no entanto, em condição com I_{50%} a elevação de sacarose está mais associado a uma possível condição de estresse causado por aplicações com concentrações mais elevadas de Fe do que à condição de luminosidade do ambiente (Figuras 26 A, B).

Figura 26 - Teor de sacarose (mg g^{-1} massa fresca $^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



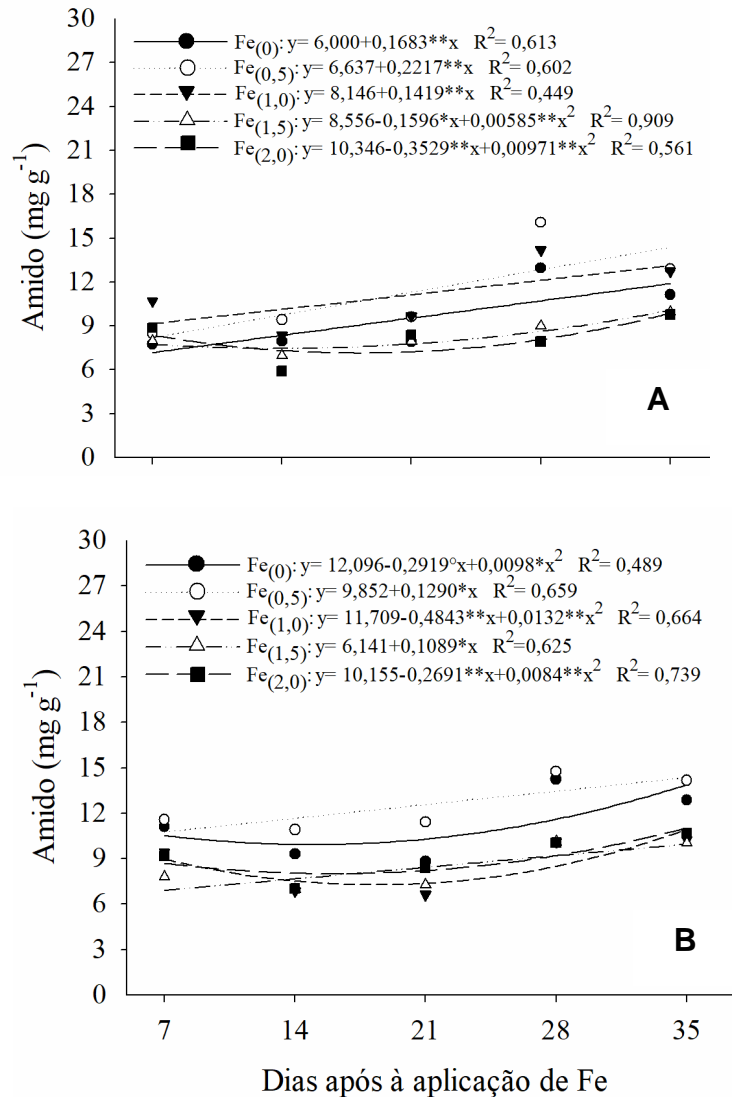
O sombreamento gera redução da energia disponível para a fotossíntese, consequentemente, afeta a produção e partição de fotoassimilados, como a sacarose, o que reflete sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (POORTER; NAVAS, 2003). O aumento da intensidade da luz desempenha papel importante na regulação das enzimas relacionadas à sacarose e ao amido (ELIYAHU et al., 2015). Em nossos resultados, o conteúdo de sacarose e açúcares solúveis totais aumentaram significativamente com o aumento da intensidade da luz (Figuras 26 A;

24 A), como observado por Pilkington et al. (2015). Guyot et al. (1996) verificaram aumento no teor de sacarose em cultivar Catuaí de *Coffea arabica* (*C. arabica*) cultivado sob condições de sombra, enquanto relação negativa entre sacarose e sombreamento foi observada para a cultivar Catimor de *C. arabica* (VAAST et al., 2006).

Amido

Observou-se maiores valores de amido em plantas cultivadas sob condição de I_{50%} e que receberam menor concentração de Fe, 0,5 g L⁻¹, sugerindo quebra desse carboidrato insolúvel em carboidratos solúveis (açúcares solúveis e sacarose) que atuam como osmorreguladores e osmoprotetores em condições de estresse (Figuras 27 A, B). Em plantas submetidas à pleno sol é comum observar a quebra de amido em açúcares solúveis com o objetivo de aumentar o potencial osmótico. Além disso, o metabolismo da sacarose e do amido fornecem muitos intermediários para os carboidratos como precursores dos principais componentes de biomassa vegetal, como observado, inclusive na produção de biomassa seca de folhas e raízes, que, por sua vez, revelou que I_{50%} reduz a biomassa (Figuras 6 B; 8 B). Chen et al. (2020) verificaram redução significativa nos teores de amido com tratamentos de 40 e 80% de sombreamento, em um período de 30 dias.

Figura 27 - Teor de amido ($\text{mg g massa fresca}^{-1}$), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



Durante o período de estresse por sombreamento ou deficiência energética, a planta utiliza suas reservas com a degradação do amido para manter seu metabolismo basal e crescimento. No entanto, com a severidade e intensidade, esse estresse pode exaurir as reservas, tornando insustentável para o metabolismo e levando a planta à senescência (VERIATO, 2018), pela baixa ou elevada irradiância.

As taxas de biossíntese e degradação do amido são ajustadas à disponibilidade de luz solar, de modo que quando a disponibilidade de luz aumenta, a formação de amido aumenta e a taxa de degradação diminui (FERNANDEZ et al., 2017). Apesar disso, são poucas as informações que investigam o efeito de diferentes intensidades de luz na biossíntese de amido. Portanto, mais investigações são necessárias devido à importância de tais mecanismos (FENG et al., 2019).

2.3.7 Análise dos componentes principais (APC)

Nas figuras 28 A e 28 B, respectivamente, em condição de $I_{100\%}$ e $I_{50\%}$, são ilustrados os biplot da Análise de Componentes Principais (APC) referentes as variáveis analisadas em função dos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e épocas de avaliações, aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação desse elemento.

Em condição de $I_{100\%}$ (Figura 28 A), o somatório de PC1 (16,49%) e PC2 (45,05%) explicam 61,49% da variação dos dados. É possível verificar que aplicação de 1,5 g L⁻¹ de Fe apresenta relação com açúcares solúveis totais (AST) (PC2-). A condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i), eficiência quântica da antena (Fv'/Fm'), taxa de transpiração (E) e coeficiente de extinção fotoquímica (qP) foram unidas em um mesmo grupo, no período inicial das avaliações, ou seja, aos 7 dias (PC1-), o que indica um possível aumento de crescimento natural das plantas, pois as demais concentrações apresentaram resposta semelhante. Os dados de crescimento como massa seca radicular (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa seca caulinar (MSC), número de folhas (NF), além de amido (AD) estão correlacionados, sobretudo, nas avaliações finais, 28 e 35 dias após aplicação de Fe, podendo destacar ainda as concentrações de 0,5 e 1,5 g L⁻¹ de Fe (PC1+). A dispersão da eficiência de carboxilação (A/C_i), assimilação de CO₂ (A), eficiência do uso da água (EUA), taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), quenching não fotoquímico (NPQ), sacarose (SR), açúcares redutores (AR) formaram um grupo específico e estão mais relacionados ao período de avaliação 14, 21 e 28 dias (PC2-).

Em condição de $I_{50\%}$ (Figura 28 B), o somatório do PC1 (36,42%) e PC2 (22,52%) explicaram 58,94% da variação dos dados. Açúcares solúveis totais (AST) apresentou comportamento semelhante a condição de $I_{100\%}$, ou seja, à aplicação de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe aos 14 dias deslocou esse osmólito em grupo isolado (PC1-). A aplicação de Fe, sobretudo, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ influencia a condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência quântica da antena (Fv'/Fm'), taxa de transpiração (E), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR), aos 7 e 21 dias após aplicação de ferro (PC2+).

A clorofila *b* (clb), amido (AD), massa seca radicular (MSR), massa seca da parte aérea/folhas (MSPA/MSF), massa seca total (MST), volume radicular (VR), área foliar (AF), massa seca caulinar (MSC), número de folhas (NF) apresentam comportamento semelhante com aplicação de 0, 0,5, 1,0 e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe aos 35 dias após aplicação desse íon (PC1+). Essas variáveis estão menos associadas à aplicação de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, o que pode indicar um início de toxicidade pelo elemento e, assim, refletindo negativamente no desenvolvimento da planta em condição de menor incidência de radiação solar ($I_{50\%}$). Para a eficiência de carboxilação (A/C_i), assimilação de CO_2 (A), eficiência do uso da água (EUA), eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), quenching não fotoquímico (NPQ), sacarose (SR) e açúcares redutores (AR) nota-se relação com o período de avaliação, aos 28 dias após aplicação de ferro (PC2-).

Nas figuras 29 A e B, respectivamente, em $I_{100\%}$ e $I_{50\%}$, pela análise dos "Scores" dos componentes principais é possível verificar que a similaridade do comportamento das concentrações de Fe é proporcional a concentração estudada desse elemento.

Figura 28 - Análise dos componentes principais (APC) de componentes do metabolismo primário, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), em cinco épocas de avaliações (7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe). Altura de planta (AP), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa seca da parte aérea/folhas (MSPA/MSF), massa seca do caule (MSC), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST), volume radicular (VR), clorofila a (Cia) e b (Cib), eficiência de carboxilação (A/Ci), taxa de transpiração (E), concentração interna de CO₂ (Ci), condutância estomática (g_s), assimilação de CO₂ (A), eficiência do uso da água (EUA), taxa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de extinção fotoquímica (qP), eficiência quântica da antena (Fv/Fm'), eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), quenching não fotoquímico (NPQ), amido (AD), sacarose (SR), açúcares redutores (AR) e açúcares solúveis totais (AST)

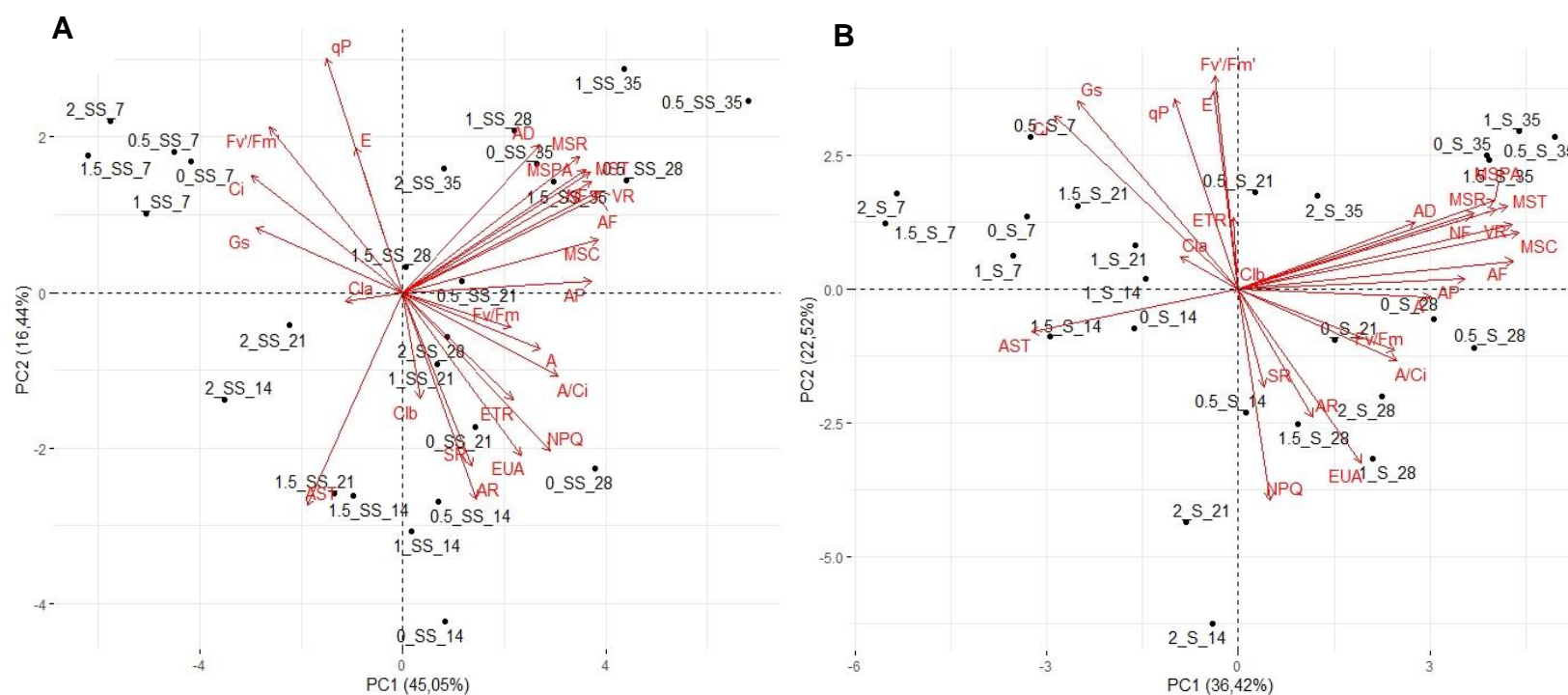
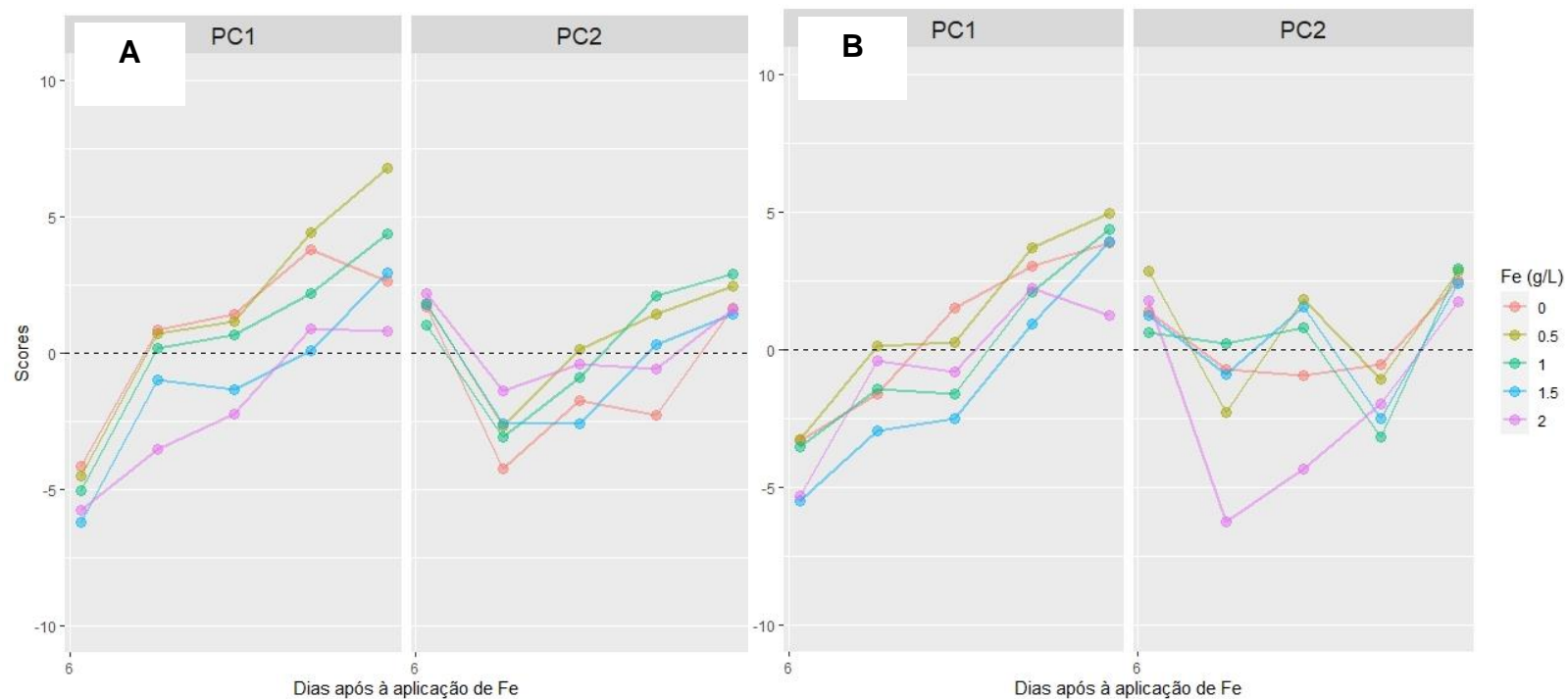


Figura 29 - Scores da análise dos componentes principais (APC) de componentes do metabolismo primário, em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), em cinco épocas de avaliações, aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de ferro



2.4 CONCLUSÕES

De maneira em geral, a produção de *Mentha piperita* L., pode ser realizada com aplicações menores de ferro e em condição com maior nível de irradiância para obter o melhor crescimento e rendimento de folha seca, caule e raiz. Apesar da espécie apresentar plasticidade fenotípica em condição com baixa incidência de luminosidade, no entanto, não resulta em incrementos de biomassa.

A análise de componentes principais foi eficiente na confirmação dos resultados com aplicação de ferro, em ambas condições de irradiância (I_{100%} e I_{50%}), como revelado inclusive pelos seus “Scores”.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.B.; SANTOS, A.S.; SOUZA, G.S.; OLIVEIRA, U. C.; LIMA, J. S. Qualidade de luz no crescimento inicial de plantas de manjeriço (*Ocimum Basilicum* L.) em ambiente controlado. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.9, n16; p. 1858 2013.

AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, p. 66-76, 2009.

BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; SHIMO, H.; NAGASAKA, S.; FUJIMOTO, M.; TAKANASHI, H. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. **Nat. Commun.**, v. 2, p. 322-329, 2011a.

BASSO, S. M. S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. E *Lotus* L.** 1999. 268 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca>>. Acesso em: 4 abr. 2020.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron Toxicity in Rice — Conditions and Management Concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.

BERRY, J. A.; DOWNTON, W. J. S. Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants. **Plant Physiology**, v. 75, p. 364-368, 1983.

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v. 25, p. 173–185, 1990.

BLUM, A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field Crops Research**, v.112, p. 119–123, 2009.

BJÖRKMAN, O. **Responses to different quantum flux densities**. Encyclopedia of Plant Physiology (NS) vol. 12A. Physiological Plant Ecology I (eds O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond & H. Ziegler), pp. 57–107. Springer-Verlag, Berlin, 1981.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, p. 489-504, 1987.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R., et al. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, v.3, p.497-514, 1989.

BRIAT, J. F. Iron dynamics in plants. In: Delseny M (ed) Incorporating Advances in Plant Pathology. **Advances in Botanical Research**, v. 46, p. 138-169, 2007.

BRIAT, JEAN-FRANÇOIS.; DUC, C.; RAVET, K.; GAYMARD, F. Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1800, p. 806–814, 2010.

BRIAT, J. F.; RAVET, K.; ARNAUD, N.; DUC, C.; BOUCHEREZ, J.; TOURAINE, B.; CELLIER, F.; GAYMARD, F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 811-822, 2010.

CAEMMERER, S. V.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v. 153, p. 376-387, 1981.

CAO, L.B.; MA, MA, Q.; ZHAO, Q.; WANG, L.; XU, K. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 53-62. 2015.

CARVALHO FILHO, J.L.S.; ARRIGONIBLANK, M.F.; BLANK, A.F.; RANGEL, M.S.A. Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos. **Revista Cerne**, Lavras, v.9, n.1, p.109-118, 2003.

CASSANA et al. Atividade fotoquímica máxima do fotossistema II em plantas de batata-doce cultivadas in vitro e aclimatizadas. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.14, n.4, p.46-51, 2008.

CASSOL, D.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, E.M.A. Fotossíntese em *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* sob sombreamento. **Rev. Bras. Biociênc.**, Rio Grande do Sul, v. 5, p. 576-578, 2007.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; MELO, H.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; LIMA JÚNIOR, E.C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 23, p. 846-850, 2005.

CHAGAS, J.H.; RIBEIRO, A.S.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; SANTOS, F.M.; BOTREL, P.P. Acúmulo de biomassa seca em plantas de *Mentha arvensis* cultivada sob diferentes malhas e níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 28, p. 3457-3463, 2010b.

CHANG, H. L.; KANG, C. Y.; LEE, T. M.; Hydrogen peroxide production protects *Chlamydomonas reinhardtii* against light-induced cell death by preventing singlet oxygen accumulation through enhanced carotenoid synthesis. **Journal of plant physiology**, v. 170, p. 976-986, 2013.

CHATTERJEE, C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, v.108, p.1-6, 2006.

CHEN, T.H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant Cell Environ**, v.34, p.1-20, 2011.

CHEN, T.; ZHANG, H.; ZENG, R.; WANG, X.; HUANG, L.; WANG, L.; WANG, X.; ZHANG, L. Shade Effects on Peanut Yield Associate with Physiological and Expressional Regulation on Photosynthesis and Sucrose Metabolism . **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 5284, 2020.

CHRISTEN, D.; SCHÖNMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R. J.; DÉFAGO, G.; Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and experimental botany**, v.60, p. 5,404-541, 2007.

CORRÊA, R.M.; PINTO, J. E.B.; REIS, E. S.; MOREIRA, C. M. Crescimento de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de folhas de orégano sob malhas coloridas. **Global Science and Technology**, v. 05, n. 01, p. 11-22, 2012.

COSTA, E.S.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVEIRA, J.G.; CAMPOSTRINI, E. Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. **Photosynthetica**, v.41, p.77- 82, 2003.

COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, Petrópolis, v. 37, n. 2, p. 229-234, 2007.

CRAMER, G.R.; ERGÜL, A.; GRIMPLET, J.; TILLET, R.L.; TATTERSALL, E.A.R.; BOHLMAN, M.C.; VINCENT, D.; SONDEREGGER, J.; EVANS, J.; OSBORNE, C.; QUILICI, D.; SCHLAUCH, K.A.; SCHOOLEY, D.A.; CUSHMAN, J. C. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. **Functional & integrative genomics** v. 7, p. 111–134, 2007.

DALMOLIN, A. C.; THOMAS, S. E. O.; ALMEIDA, B. C.; ORTIZ, C. E. R. Alterações morfofisiológicas de plantas jovens de *Curatella americana* L. submetidas ao sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 13, p. 41-48, 2015.

DE DORLODOT, S.; LUTTS, S.; BERTIN, P. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an interspecific rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 1-20, 2005.

DEMMIG, B.; WINTER, K.; KRÜGER, A.; CZYGAN, F.C.; Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. **Plant Physiology**, v.84, p.218-224, 1987.

DITMAROVÁ, L.; KURJAK, D.; PALMROTH, S.; KMET, J.; STRELCOVÁ, K. Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. **Tree Physiology**, v.30, p.205–213.2010.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; SANTOS, M. O.; ARANTES, L. O. Influência de Diferentes Condições de Sombreamento sobre o Crescimento de *Tapirira guianensis* Alb. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 5, p. 477-479, 2007.

DUBROVSKY, J.G.; SAUER, M.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; IVANCHENKO, M.G.; FRIML, J.; SHISHKOVA, S.; CELENZA, J.; BENKOVÁ, E. Auxin atua como um gatilho morfogenético local para especificar células fundadoras de raiz lateral. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, p. 8790 – 8794, 2008.

ENNAHLI, S.; EARL, H.J. Physiological Limitations to Photosynthetic Carbon Assimilation in Cotton under Water Stress. **Crop Science**, v. 45, p. 2374-2382, 2005.

FAN, X.-X. et al. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 50–55, 2013.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal Conductance and Photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 317–345, 1982.

FARQUHAR, G.D.; WONG, S.C.; EVANS, J.R.; HUBICK, K.T. Photosynthesis and gas exchange. In: Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (Eds.), *Plants Under Stress*, 1989.

FAVARETTO, V. F. **Estudo comparativo dos mecanismos de defesa contra radicais livres em espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras de Mata Mesófila Semidecidual**. 2009. 196 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=138237>. Acesso em: 07 mai. 2020.

FELSEMBURGH, C.A.; PELEJA, V.L.; DO CARMO, J.B. Fenologia de *Aniba parviflora* (Meins.) Mez. em uma região do estado do Pará, Brasil. **Revista Biota Amazônia**, Macapá, v. 6, n. 3, p. 31-39, 2016.

FERRAZ, R.L.S.; MELO, A.S.; SUASSUNA, J.F.; BRITO, M.E.B.; FERNANDES, P.D.; NUNES JÚNIOR, E.S. Gas exchange and photosynthetic efficiency in common bean ecotypes grown in a semiarid environment. **Pesq Agropec Trop.**, v. 42, p. 181-188, 2012.

FERNANDEZ, O.; ISHIHARA, H.; GEORGE, G. M.; MENGIN, V.; FLIS, A.; SUMNER, D.; et al. Leaf starch turnover occurs in long days and in falling light at the end of the day. **Plant Physiol.**, v. 174, p. 2199–2212, 2017.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v. 6, n. 03, p. 269-279, 2004.

FLEXAS, J.; BARBOUR, M.M.; BRENDEL, O.; CABRERA, H.M.; CARRIQUÍ, M.; DÍAZ-ESPEJO, A.; DOUTHE, C.; DREYER, E.; FERRIO, J.P.; GAGO, J et al. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Sci.**, v. 193–194, p. 70–84, 2012.

GAMON, J.A.; BOND, B. Effects of irradiance and photosynthetic downregulation on the photochemical reflectance index in Douglas-fir and ponderosa pine. **Remote Sens Environ.**, v. 135, p. 141–149, 2013.

- GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDORIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesal piniaechinata* Lam. (Brazil wood) seeds, an endangered leguminous tree from the Brazilian atlantic forest. **Brazilian Journal Biology**, v.66, n.2B, p.739-745. 2006.
- GAZOLLA-NETO, A.; AUMONDE, T. Z.; PEDÓ, T.; OLSEN, D.; VILLELA, F. A. Ação de níveis de luminosidade sobre o crescimento de plantas de maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.). **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 11, n. 1, p. 88-92, 2013.
- 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.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GODOY, A. G. **Respostas fisiológicas de cultivares de *Coffea arabica*, em função da disponibilidade de luz e nitrogênio**. 2014. 64 f. Tese (Universidade Federal de Viçosa Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal), Viçosa, 2014. Disponível em: < <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7547>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- GOLTSEV, V.N.; KALAJI, H.M.; PAUNOV, M. et al. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. **Russ J Plant Physiol.**, v. 63, p. 869–893, 2016.
- GONDIM, A. R. O.; PUIATTI, M.; CECON, P. R.; FINGER, F. L. Crescimento, partição de fotoassimilados e produção de rizomas de taro cultivado sob sombreamento artificial. **Horticultura Brasileira**, Recife, v.25, n.3, p.418-428. 2007.
- GONÇALVES, J.F.C.; SILVA, C.E.M.; JUSTINO, G.C.; NINA JUNIOR, A.R. Efeito do ambiente de luz no crescimento de plantas jovens de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 40, p. 337–344, 2012.
- GONÇALVES, F. C. M.; PARREIRAS, N. S.; CAMPOS, F. G.; MANTOAN, L. P. B.; BOARO, C. S. F. Exogenous salicylic acid modifies gas exchange and biomass production of *Mentha x piperita* L.. **Australian Journal of Crop Science (Online)**, v. 14, p. 98-107, 2020.
- GUIRAO, L. M.; RUIZ, J. M.; GIL, J. M. S.; ESTELLER, J. B.; STINCO, C. M.; MARTÍNEZ, M. A.; Xanthophyll cycle-related photoprotective mechanism in the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceânica* and *Cymodocea nodosa* under normal and stressful hypersaline conditions. **Aquatic Botanic**, v. 109, p. 14-24, 2013.
- GUYOT, B.; MANEZ, J.C.; PERRIOT, J.J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des café's Arabica. **Plant. Rech. De´**, v. 3, 1996.

HERRERA, A.; TEZARA, W.; MARÍN, O.; RENGIFO, E. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis in trees of a tropical seasonally flooded forest. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 41–48, 2008.

HINDT, M.N.; GUERINOT, M.L. Getting a sense for signals: Regulation of the plant iron deficiency response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1823, p.1521–1530, 2012.

HOUBORG, R.; CESCATTI, A.; MIGLIAVACCA, M.; KUSTAS, W. P.; Satellite retrievals of leaf chlorophyll and photosynthetic capacity for improved modeling of GPP. **Agricultural and Forest meteorology**, v. 177, p. 10-23, 2013.

HUANG, W.; ZHANG, S.B.; LIU, T. Moderate photoinhibition of photosystem II significantly affects linear electron flow in the shade-demanding plant *Panax notoginseng*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 637, 2018.

HUSSAIN, S et al. Changes in morphology, chlorophyll fluorescence performance and Rubisco activity of soybean in response to foliar application of ionic titanium under normal light and shade environment. **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 626–637, 2019.

JEONG, J.; CONNOLLY, E. L. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant Science**, v. 176, p. 709-714, 2009.

JUCOSKI, G. O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; PAULA, S. O.; OLIVA, M. A. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. plants. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 1645-1657, 2013.

JUCOSKI, G. D. O.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A. D. Excess iron on growth and mineral composition in *Eugenia uniflora* L. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2016.

JUNQUEIRA, N.; SILVA, B.; LEAL-COSTA, M.; ALVES-FERREIRA, M.; DICKINSON, H.; LANGDALE, J.; REINERT, F. Anatomy and ultrastructure of embryonic leaves of the C4 species *Setaria viridis*. **Annals of Botany**, v. 121, p. 1163–1172, 2018.

KALIDASU, G.; SARADA, C.; REDDY, T. Y. Influence of micronutrients on growth and yield of coriander (*Coriandrum sativum*) in rainfed vertisols. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.17, n. 2, p. 187-189, 2008.

KITAJIMA, M.; BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v. 376, n.105–115, 1975.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. **PAM Application Notes**, v. 1, p. 27–35, 2008.

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

- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.
- KUDOYAROVA, G. R.; KHOLODOVA, V. P.; VESELOV, D. S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 2, p. 165-175, 2013.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima, 2005.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima, 2006. 550 p.
- LAWSON, T.; KRAMER, D.M.; RAINES, C. A. Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 215– 647, 2012.
- LI, G.; XU, E.; KRONZUCKER, H. J.; SHI, E.W. Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in Arabidopsis. **J Exp Bot.**, v. 66, n. 7, p 2041–2054, 2015a.
- LI, K.; KAMIYA, T.; FUJIWARA, T. Funções diferenciais de PIN1 e PIN2 na manutenção do meristema da raiz sob condições de baixo-B em *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, v. 56, n. 6, p. 1205-1214, 2015b.
- LIMA, M. C.; AMARANTE, L.; MARIOT, M. P.; SERPA, R. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.1, p.45-50, 2011.
- LIMA, L.L. et al. A Prática da fitoterapia a partir do conhecimento popular em três comunidades do valentina, João Pessoa – Paraíba. **Revista Ciência Saúde Nova Esperança**, João Pessoa, v 11, n. 3, p. 20-31, 2013.
- LIPHAN, S.; DETPIRATMONGKOL, S. Influence of Different Shading Levels on Growth and Yield of Kalmegh, *Andrographis paniculata* Burm. F. (Nees) . **International Journal of Agricultural Technology**, v. 13, n. 1, p. 79-89, 2017
- LÓPEZ-MILLÁN, A. F; GRUSAK, M. A; ABADÍA, A; ABADÍA, J. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 254, p. 1-8, 2013.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. **Soil Biol Biochem.**, v. 43, p. 883-894, 2011.
- MARTINAZZO, E. G.; PERBONI, A. T.; OLIVEIRA, P. V.; BIANCHI, V. J.; BACARIN, M. A. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência rural**, Santa Maria, v.43, n. 1, p.354-4106, 2013.

MARTINS, J.R.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, A.P.O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 10, p. 102-107, 2008.

MCKAY, L. D.; BLUMBERG, B. J. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 8, p. 619-633, 2006.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.A.F.; GOMES, F.P.; AGUILAR, A.G.; MANGABEIRA, P.A.O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany** v. 50, p. 221–231, 2003.

MIELKE, M. S.; SCHAFFER, B. Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* L. seedlings to soil flooding and light intensity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 113-121, 2010.

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

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MORALES, F.; BELKHODJA, R.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron deficient, field grown pear trees (*Pyrus communis* L.). **Photosynth. Res.**, v. 63, p.9–21, 2000.

MORRIS, D.L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Drey wood's Anthrone Reagent. **Science**, v.107, n.2775, p.254-5. 1948.

MÜLLER, C.; KUKI, K.; PINHEIRO, D.; DE SOUZA, L.; SIQUEIRA-SILVA, A.; LOUREIRO, M.; OLIVA, M.; ALMEIDA, A. Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil**, v. 391, p.123-138, 2015.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. R. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécie de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 223p, 1996.

PEDÓ, T. et al. R. Análise de crescimento de plantas de rabanete submetidas a doses de adubação nitrogenada. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2014.

PEDÓ, T.; SEGALIN, S. R.; SILVA, T. A.; MARTINAZZO, E. G.; NETO, A. G.; AUMONDE, T. Z.; VILLELA, F. A. Vigor de sementes e desempenho inicial de plântulas de feijoeiro em diferentes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.9, n.1, p.59-64, 2014.

PENG, Y.Y.; LIAO, L.L.; LIU, S.; NIE, M.M.; LI, J.; ZHANG, L.D.; MA, J.F.; CHEN, Z. C. Magnesium deficiency triggers SGR-mediated chlorophyll degradation for magnesium remobilization. **Plant Physiol.**, v. 181, p. 262–275, 2019.

PEREIRA, E.G.; OLIVA, M. A.; ROSADO-SOUZA, L.; MENDES, G. C.; COLARES, D, S.; STOPATO, C. H.; ALMEIDA, A. M. Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. **Plant Science**, v. 202, p. 81-89, 2013

PEREIRA, E.G.; OLIVA, M.A.; SIQUEIRA-SILVA, A.I.; ROSADO-SOUZA, L.; PINHEIRO, D.T.; ALMEIDA, A.M. Tropical Rice Cultivars from Lowland and Upland Cropping Systems Differ in Iron Plaque Formation. **Journal of Plant Nutrition.**, v. 37, p. 1373–1394, 2014.

PERINI, V. B. M.; CASTRO, H. G.; CARDOSO, D. P.; LIMA, S. O.; AGUIAR, R. W. S.; MOMENTÉ, V. G. Efeito da adubação e da luz na produção de biomassa do *Capim citronela*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 6, p. 924-931, 2011.

PILKINGTON, P. D.; MILNE, L. C.; CAIRNS, K. E.; LEWIS, J.; WHELAN, T. A. Modifiable partner factors associated with perinatal depression and anxiety: a systematic review and meta-analysis. **J. Affect. Disord.**, v. 178, p. 165–180, 2015.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.; MELO, L.A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 25, p. 210-214, 2007.

PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, E.O.; BERTOLUCCI, S.K.V.; SILVEIRA, H.R.O.; SANTOS, A.R.; SILVA, M.S. Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura brasileira**, Recife, v.32, n.3, p.321-326, 2014.

POMPELLI, M. F.; SAMUEL C.V.; MARTINS, W. C.; ANTUNES, A. R. M.; CHAVES, DAMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1052–1060, 2010.

POORTER, H.; NAVAS, M.L. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. **New Phytologist**, v. 157, p. 175-198, 2003.

POUDEL, P.R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, R. Effect of red-and bluelight-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant Cell Tiss Org.**, v. 2, p.147–153, 2008.

QUIRINO, B. F. et al. Molecular aspects of leaf senescence. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 7, p. 278-282, 2000.

RAVET,K.; DANFORD, F.L.; DIHLE, A, PITTARELLO, M.; PILON, M. Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. **Plant Physiol.**, v. 157, p. 1300–1312, 2011.

SAHARKHIZ, M. J. et al. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. **International Scholarly Research Network**, v. 20, p. 6, 2012.

SAMARANAYAKE, P.; PEIRIS, B. D.; DSSANAYAKE, S. Effect of Excessive Ferrous (Fe 2+) on Growth and Iron Content in Rice (*Oryza Sativa*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 2, p. 296- 98, 2012.

SANTANA, B.V.N.; ARAÚJO, T.O.; ANDRADE, G.C.; FREITAS-SILVA, L.F.; KUKI, K.N.; PEREIRA, E.G.; AZEVEDO, A.A.; SILVA, L.C. Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 2550–2562, 2014.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; SCALON FILHO, R. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 753- 758, 2003.

SCHREIBER, U; SCHLIWA, U; BILGER, W. Registro contínuo de extinção de fluorescência de clorofila fotoquímica e não fotoquímica com um novo tipo de fluorômetro de modulação. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.10, p.51-62, 1986.

SCHOCK, A. A.; RAMM, A.; MARTINAZZO, E. G.; SILVA, D. M.; BACARIN, M. A. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-manso cultivadas em diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental Campina**, v.18, n.1, p.3-9, 2014.

SCHREIBER, U.; KLUGHAMMER, C. H. Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields of PS I and PS II: analysis of heat-induced limitations measured by Maxi-Imaging-PAM and DualPAM-100. **PAM Application Notes**, v. 1, p. 15–18, 2008.

SHABRANGI, A.; BEIGIJAZI, E. A. Effect of Salicylic Acid on The Amount of Essential Oil, Phenolic Compounds, Flavonoids And Antioxidant Activity of *Mentha piperita* L. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 7, n. 8, p. 499-502, 2014.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2/3, p.337-354, 2002.

SILVEIRA, V.C.; OLIVEIRA, A.P.; SPEROTTO, R.A. et al. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian J Plant Physiol.**, v. 19, p. 127-139, 2007.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, v. 125, p. 27–58, 1993.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; PINTO, J. E. B. P. Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania*

laevigata Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Biociências**, Rio Grande do Sul, v. 8, n. 4, p. 330-335, 2010.

SOUZA, G.S et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 232-239, 2014.

STEIN, R. R. J. et al. Distinct physiological responses subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**, v. 154, p. 269-277, 2008.

STEIN, R.J.; LOPES, S.I.G.; FETT, J.P. Iron toxicity in fieldcultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, p. 135-146, 2014.

SULTANA, N.; IKEDA, T.; KASHEM, M.A. Effect of foliar spray of nutrient solutions on photosynthesis, dry matter accumulation and yield in sea water-stressed rice. **Environ. Exp. Bot.**, v. 46, p. 129-140, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THOMINE, S.; VERT, G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 322-327, 2013.

TIAN, Y.; UNGERER, P.; ZHANG, H.; RUBAN, A.V. Direct impact of the sustained decline in the photosystem II efficiency upon plant productivity at different developmental stages. **Journal of Plant Physiology**, v. 212, p. 45-53, 2017

VAAST, P.; B. BERTRAND, J.J. PERRIOT, B. GUYOT, M. GE´NARD. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea Arabica* L.) under optimal conditions. **J. Sci. Food Agric.**, v. 86, p. 197e204, 2006.

VERIATO, F. T. **Metabolismo de carboidratos de plantas forrageiras tropicais**. Itapetinga-BA: UESB, 2018.

VIEIRA, E. L. et al. **Manual de Fisiologia Vegetal**. São Luiz: EDUFMA, 230p, 2010.

WU, L.B.; UEDA, Y.; LAI, S.K.; FREI, M. Shoot tolerance mechanisms to iron toxicity in rice (*Oryza saliva* L.). **Plant Cell Environ.**, v. 40, p. 570-584, 2017.

YAN, K.; CHEN, W.; HE, X.; ZHANG, G.; XU, S.; WANG, L. Responses of photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant system in leaves of *Quercus mongolica* to elevated O₃. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, p.198–204, 2010.

YAO, X.; LI, C.; LI, S.; ZHU, Q.; ZHANG, H.; WANG, H.; YU, C.; MARTIN, S. K. S.; XIE, F. Effect of shade on leaf photosynthetic capacity, light-intercepting, electron transfer and energy distribution of soybeans. – **Plant Growth Regul.**, v. 83, p. 409-416, 2017.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

YIN, C.; WANG, X.; DUAN, B.; LUO, J.; LI, C. Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. – **Environ. exp. Bot.**, v.53, p. 315-322, 2005.

ZHANG, S. et al. Temperature-Dependent Gas Exchange and Stomatal/NonStomatal Limitation to CO₂ Assimilation of *Quercus Liaotungensis* under Midday High Irradiance. **Photosynthetica**, v. 39, n. 3, p. 383-388, 2001.

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

CAPÍTULO 3

AÇÃO DO FERRO EXÓGENO E IRRADIÂNCIA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Mentha piperita* L.

RESUMO

De maneira geral, metabólitos com potencial antioxidantes são produzidos como resultado da adaptação do organismo ao ambiente circundante ou como um possível mecanismo de defesa. Condições adversas tanto de radiação da luz solar como aplicação de ferro (Fe) modula a síntese de compostos do sistema antioxidante. O presente estudo tem como objetivo analisar modificações relacionadas a respostas de defesa de plantas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) submetidas à aplicação foliar de Fe em diferentes condições de irradiância. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 5x2, sem Fe e quatro concentrações desse elemento aplicado via foliar, com concentrações iguais a 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). Foram realizadas avaliações dos teores de carotenoides, antocianinas, flavonoides e compostos fenólicos totais, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peroxidação lipídica (MDA) e determinação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, bem como atividade das enzimas peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Plantas de *M. piperita* pulverizadas com Fe tendem a apresentar menores valores de carotenoides e de antocianinas, sem grandes modificações no conteúdo de H₂O₂. Apesar de apresentarem tendência em elevação dos teores de malondialdeído (MDA), correlacionando com aumento da atividade da POD e redução da atividade da SOD, sobretudo, com aplicação de 2,0 g L⁻¹ de Fe. Aplicações maiores de Fe, eleva os valores de FRAP, em ambas condições de irradiância, no entanto, não modifica os valores de DPPH. Plantas pulverizadas com concentrações menores de Fe elevam os valores de compostos fenólicos. A condição em pleno sol (I_{100%}) eleva consideravelmente os valores de compostos fenólicos, mas, não modifica os valores de flavonoides. Conclui-se que à aplicação foliar de Fe modifica perfis de metabólitos do sistema antioxidante de plantas de *M. piperita*, na dependência da concentração de Fe aplicada e de acordo com o nível de irradiância.

Palavras-chave: Família lamiaceae. FeEDTA. Luminosidade. Estresse oxidativo.

CHAPER 3

EXOGENOUS IRON AND IRRADIANCE IN THE PRODUCTION OF METABOLITES WITH ANTIOXIDANT POTENTIAL IN THE LEAVES OF *Mentha piperite* L. PLANTS

ABSTRACT

In general, metabolites with potential antioxidants are produced as a result of the organism's adaptation to the surrounding environment or as a possible defense mechanism. Adverse conditions from both sunlight radiation and application of iron (Fe) modulate the synthesis of compounds in the antioxidant system. The present study aims to analyze changes related to defense responses of peppermint plants (*Mentha piperita* L.) submitted to foliar application of Fe under different irradiance conditions. The experiment was carried out in a greenhouse, with humidity and temperature control. It was adopted a completely randomized design and a 5x2 factorial scheme, without Fe and four concentrations of this element applied via leaf, with concentrations equal to 0 (control), 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g L⁻¹ and under two irradiance conditions, I_{100%} (full sun) and I_{50%} (50% irradiance). Assessments were made of the levels of carotenoids, anthocyanins, flavonoids and total phenolic compounds, hydrogen peroxide (H₂O₂), lipid peroxidation (MDA) and determination of antioxidant capacity by the DPPH and FRAP methods, as well as activity of the peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) enzymes. Plants of *M. piperita* sprayed with Fe tend to have lower values of carotenoids and anthocyanins, without major changes in the content of H₂O₂. Despite presenting a tendency towards an increase in the levels of malondialdehyde (MDA), correlating with an increase in POD activity and a reduction in SOD activity, especially with the application of 2.0 g L⁻¹ of Fe. FRAP values, in both irradiance conditions, however, do not modify the DPPH values. Plants sprayed with lower concentrations of Fe increase the values of phenolic compounds. The condition in full sun (I_{100%}) raises the values of phenolic compounds considerably, but does not modify the values of flavonoids. It is concluded that the foliar application of Fe modifies profiles of metabolites of the antioxidant system of *M. piperita* plants, depending on the concentration of Fe applied and according to the level of irradiance.

Keywords: Lamiaceae family. FeEDTA. Brightness. Oxidative stress.

3.1 INTRODUÇÃO

O metabolismo primário, que participam a fotossíntese, a respiração e o transporte de nutrientes, consome a maior parte da energia produzida pela planta e são essenciais para produtividade vegetal. O metabolismo secundário, recentemente denominado especializado origina compostos que são específicos para diferentes espécies (GONÇALVES; GUAZZELLI, 2014) e na dependência do metabólito produzido são originados por diferentes rotas de síntese.

Os metabólitos com potencial antioxidante são produzidos como resultado da aclimatação do organismo ao ambiente circundante ou como um possível mecanismo de defesa (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008). Plantas sob estresses ambientais como alta intensidade de radiação solar e de metais elevam nas células espécies reativas de oxigenio (EROs) podendo causar danos às proteínas, aos lipídios de membranas e aos ácidos nucléicos (ASENSIO et al., 2012; KROH; PILON, 2020). Dessa forma, a biossíntese e o acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides nas plantas estão relacionados à genética e a fatores ambientais, incluindo intensidade da radiação solar (COMINELLI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; JAAKOLA; HOHTOLA, 2010; NI et al., 2020). Alterações na intensidade de luz modificam ainda teores de carotenoides e antocianinas, que, são utilizados como importantes marcadores de ambientação vegetal (MARTINS et al., 2009).

Resultados de pesquisa indicam que o acúmulo de compostos fenólicos em *Centella asiatica* dependem da duração e da quantidade de luz ao longo do dia (TAULAVUORI et al., 2013; YANG et al., 2018). Em *Berberis microphylla*, a alta intensidade de luz aumentou o conteúdo de antocianina e de polifenol total em comparação à intensidade de luz intermediária (ARENA et al., 2017). Ma et al. (2010) verificaram em *Anoectochilus formosanus* que irradiância entre 30 e 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favorece a produção de flavonoides totais. Mohammad et al. (2005) verificaram que plântulas de *Phalaenopsis* apresentavam maior teor de superóxido dismutase com o aumento da intensidade luminosa.

A disponibilidade de micronutrientes também pode impactar a produção de compostos antioxidantes por meio de efeitos nas vias biossintéticas como ativadores de diversas enzimas. O ferro (Fe) é um constituinte da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e nos cloroplastos, portanto, a sua deficiência ou toxicidade causa

alterações no estado redox celular, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MITTLER et al., 2004), refletindo na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), redutase da glutathiona (GR), peroxidase (POD) e em componentes não enzimáticos (antocianinas, flavonoides, compostos fenólicos e carotenoides) (HÄNSCH; MENDEL, 2009; GILL; TUTEJA, 2010; SPIRT et al., 2010; ASENSIO et al., 2012; THOMINE; VERT, 2013; STEIN et al., 2014; ONAGA et al., 2016). O Fe pode atuar na atividade da fenilalanina amônio-liase, enzima relacionada à resposta do metabolismo antioxidante (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), afetando inclusive a produção de ERO, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) podendo danificar muitos componentes celulares, como proteínas, lipídios da membrana e ácidos nucléicos, podendo acarretar em peroxidação lipídica (ÜREK; TARHAN, 2012; DIXON; STOCKWELL, 2014; SIDA-ARREOLA et al., 2015), que, por sua vez, induz respostas do sistema antioxidante.

Dessa maneira, a capacidade da planta para ativar o sistema de defesa antioxidativo é o principal mecanismo para a resistência contra danos oxidativos causados pelas EROs (VERMA; DUBEY 2003). O grau de atividade das enzimas antioxidantes e o aumento da quantidade de antioxidantes sob estresse é extremamente variável entre várias espécies de plantas e mesmo entre cultivares da mesma espécie (BLOKHINA et al., 2003; REDDY et al., 2004; SCANDALIOS, 2005).

Em particular, para as plantas medicinais, as condições ambientais são capazes de redirecionar o metabolismo para, conseqüentemente, regular a produção de seus componentes, inclusive metabólitos do sistema antioxidante (YANG et al., 2018). Atualmente, pesquisas por antioxidantes naturais é uma nova tendência do mercado de fármacos e industrial, pois, além de manter as propriedades organolépticas e químicas de alimentos, também são associados à manutenção de saúde e prevenção de doenças. O conhecimento dos compostos químicos provenientes de espécies da família Lamiaceae é muito extenso, especialmente por monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em gêneros de importância econômica (WU et al., 2012), no entanto, constituintes químicos, como antioxidantes, fenólicos, e outros compostos podem também ser de grande importância como caracteres taxonômicos, auxiliando na defesa e identificação de compostos biologicamente ativos desse grupo medicinal. Plantas de *M. piperita* submetidas à aplicação de concentrações elevadas de Fe e sob diferentes intensidades de radiação solar podem

incrementar de diversas maneiras o sistema antioxidante para eliminar ou desintoxicar as EROs, em resposta a essas condições adversas.

O presente estudo tem como objetivo analisar a produção de metabólitos do sistema antioxidante de folhas de *M. piperita* submetidas à aplicação foliar de Fe em diferentes condições de radiação solar.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de estudo

O experimento foi conduzido no Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia - Setor de Biologia Vegetal, IBB, UNESP, Botucatu/SP, em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura e com as seguintes coordenadas geográficas: 22°53'12.2"S, 48°29'52.5"W.

3.2.2 Material vegetal e tratamentos

Estacas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) foram obtidas de plantas matrizes cultivadas em vasos contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças® + Carolina soil® + Solo, proporção 1:1:1.

Ramos aéreos das plantas foram selecionados e a partir deles, estacas com 8 cm de comprimento e com os quatros primeiros pares de folhas mantidos foram confeccionadas e, em seguida, colocadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças®. Essas estacas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente até o enraizamento, conforme Gonçalves et al. (2020).

Aos 30 dias após o plantio das estacas e enraizadas foram transferidas definitivamente para vasos com capacidade de 2,6 L, utilizando Tropstrato HT Hortaliças® como substrato.

O pH contendo a solução do fertilizante foliar contendo 13% de Fe (EDTA) solúvel foi ajustado para aproximadamente a 5,0. Essa faixa representa boa solubilidade, controle e eficácia da atividade do presente fertilizante foliar. As

concentrações de Fe utilizadas foram iguais a 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹, preparadas a partir da pesagem de Fe em balança analítica, dissolvido em um litro de água destilada. Essas concentrações de Fe foram definidas com base na recomendação ótima do fertilizante foliar, trabalho realizado por El-Emary et al. (2018) e a partir de testes preliminares.

As plantas foram cultivadas em diferentes condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). Aos 10 dias após a aclimação das plantas a condição de substrato e quatro dias nas diferentes condições de irradiância foi realizada a primeira aplicação de Fe, em intervalos semanais, totalizando 5 aplicações.

As aplicações foliares de Fe foram realizadas na parte da manhã (9:00 h) com temperaturas médias próximas a 18°C e umidade relativa do ar próxima de 80% com auxílio de pulverizador manual de CO₂ pressurizado, com bico do tipo “Leque”, com taxas de vazão de 0,025 a 2500 gpm (0,09 a 9464 l/min) e pressões até 4000 psi (276 bar), utilizando como agente espalhante o produto comercial Agral® (Nonil Fenoxi Poli (Etilenoxi) Etanol) na proporção de 800 µL por litro de solução de Fe.

As plantas foram fertirrigadas com solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, com força iônica reduzida a 70%, pH ajustado para 5,5 - 6,5 e a condutividade elétrica mantido entre 1,5 - 2,5 mS cm⁻¹, conforme Gonçalves et al. (2020).

3.2.3 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas foram selecionadas folhas totalmente expandidas e saudáveis, coletadas das 9:00 às 10:00h e colocadas em sacos plásticos, embrulhadas em papel alumínio e, em seguida, congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C, para posterior análise.

O extrato enzimático para determinação da superóxido dismutase (SOD) e da peroxidase (POD) foram obtidos segundo metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). Foram utilizados 200 mg de massa foliar fresca congelada e macerada em nitrogênio líquido. A seguir, esse material foi homogeneizado em 4 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,8) gelado e o extrato foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi separado em microtubos e congelados em freezer a -26°C para posterior avaliação.

3.2.3.1 Atividade da peroxidase

A atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto por Teisseire e Guy (2000), adaptado. Utilizou-se 30µL do extrato enzimático, 500µL de tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 6,5), 250µL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, 20 mmol L⁻¹) e 220µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 5 mmol L⁻¹), totalizando 1000µL. A reação foi mantida por 5 minutos e a formação de purpurogalina avaliada em espectrofotômetro, cuja leitura foi realizada a 430 nm. O cálculo da atividade específica da enzima foi realizado por meio do seu coeficiente de extinção molar (2,5 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e a atividade expressa em nmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.2.3.2 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela metodologia descrita por Peixoto et al. (1999). A reação foi preparada em ambiente sem luz, sendo composta por 50 µL de extrato enzimático e 2950µL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 7,8) contendo metionina (13 mmol L⁻¹), cloreto de azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT, 75 µmol L⁻¹) riboflavina (2 µmol L⁻¹) e EDTA (100 nmol L⁻¹), totalizando 3000µL. A reação foi conduzida sob luz por 5 minutos e à temperatura ambiente. A inibição da redução fotoquímica do NBT foi avaliada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade expressa em U mg⁻¹ de proteína.

3.2.3.3 Quantificação das proteínas solúveis totais

A quantificação das proteínas solúveis totais do extrato foi determinada de acordo com metodologia proposta por Bradford (1976). A reação foi composta por 100 µL de extrato enzimático e 5000µL de reativo de Bradford, composto por Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01% (m/v), etanol 4,7% (m/v) e ácido fosfórico 8,5% (m/v), a qual foi conduzida por 15 minutos, sendo a sua leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a realização da curva padrão foi diluída 100 mg de caseína em 50 mL de solução NaOH 0,5 mol L⁻¹ e o volume completado com água deionizada para 100

mL. A partir dessa solução foi elaborada a curva padrão para a quantificação de proteínas.

3.2.3.4 Concentração de carotenoides e antocianinas

Os teores de carotenoides e antocianinas foram determinados segundo metodologia descrita por Sims e Gamon (2002).

As concentrações de carotenoides e antocianinas foram calculadas segundo as equações abaixo e expressas em µg de pigmento por g de matéria fresca.

Onde:

$$\text{Carotenoides} = (A470 - (17,7 \cdot (Cl_a - Cl_b) - 9,479 \cdot (\text{antocianina})) / 119,26);$$

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 \cdot (A537) - 0,00697 \cdot (A647) - 0,002228 \cdot (A663).$$

3.2.3.5 Compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi analisado utilizando como reagente o reativo de Folin Ciocalteu, conforme Singleton e Rossi Jr. (1965) e Singleton et al. (1999). A extração foi realizada da seguinte forma: protegidas da luz, para evitar a degradação dos compostos de interesse, foram pesadas 0,1 g de amostra de material foliar fresco previamente macerado. A essas amostras adicionou-se 5 mL de metanol 50%. Em seguida, as mesmas foram homogeneizadas e levadas para o banho ultrassônico por 20 minutos. Após esse tempo, foram centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm com temperatura de 25°C. Em seguida, armazenou-se o sobrenadante em tubos âmbar, que foram acondicionados em geladeira. Ao centrifugado, adicionou-se 5 mL de metanol 50%. Depois, as amostras foram homogeneizadas, levadas ao banho ultrassônico por 20 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm com temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e misturado ao sobrenadante anterior nos tubos âmbar. A reação foi realizada em tubos de ensaio.

A reação aconteceu em tubos de ensaio, da seguinte maneira:

- 1) Adição de 100 µL de sobrenadante
- 2) Adição de 1 mL de H₂O

- 3) Adição de 0,5 mL de Folin Ciocalteu
- 4) Adição de 2,5 mL de Na₂CO₃ a 20%
- 5) Homogeneização e acondicionamento por 60 minutos no escuro.

Após esse período, foi realizada a leitura de absorvância a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) g⁻¹ massa fresca.

3.2.3.6 Flavonoides totais

A extração para análise dos teores dos flavonoides totais foi feita de acordo com o método de Awad et al. (2000), segundo as adaptações realizadas por Popova et al. (2004). Protegidas da luz, para evitar a degradação dos compostos de interesse, foram pesadas 0,1 g de amostras de material foliar fresco previamente macerado e utilizou-se 500 µL do extrato. A esse extrato adicionou-se 4 mL de metanol acidificado. Em seguida, as mesmas foram homogeneizadas e levadas para o banho ultrassônico por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1 mL de cloreto de alumínio 5% a elas que, em seguida, foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm à temperatura de 5°C. Em seguida, as amostras foram filtradas e a leitura de absorvância realizada a 425 nm. Os resultados foram expressos em mg flavonoides g⁻¹ de massa fresca, em equivalente de ácido gálico.

3.2.3.7 Atividade antioxidante pelo método DPPH• (1,1-difenil-2-picril hidrazina)

A atividade antioxidante foi determinada frente ao radical livre (DPPH), conforme método proposto por Brand-Williams et al. (1995) com algumas adaptações. As análises foram realizadas em duplicatas e o resultado expresso pela média dos valores. A solução de DPPH foi preparada a 2×10^{-4} g mL⁻¹ (0,002 g de DPPH em 5 mL de etanol P.A.). A extração foi realizada sob proteção da luz, utilizando 0,1 g de amostra de material foliar fresco previamente macerado. A essas amostras adicionou-se 5 mL de etanol P.A. Em seguida, foram homogeneizadas e levadas para banho ultrassônico por 15 minutos. Após esse tempo, foram centrifugadas por 10 minutos a

2.000 rpm à temperatura de 5°C. A reação aconteceu em tubos de ensaio, da seguinte maneira:

- 1) Adição de 500 µL de sobrenadante
- 2) Adição de 1,5 mL de etanol P.A.
- 3) Adição de 150 µL de DPPH $2 \cdot 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$
- 4) Homogeneização e acondicionamento por 60 minutos no escuro.

Após esse período, foi realizada a leitura de absorbância a 517 nm e os resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ Trolox de DPPH reduzido.

3.2.3.8 Atividade antioxidante pelo método FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com método descrito por Benzie e Strain (1999), em duplicata e o resultado expresso pela média dos valores. Em ausência da luz foi pesada 0,1 g de amostra de material foliar fresco previamente macerado. A essas amostras adicionou-se 3 mL de metanol. Em seguida, foram homogeneizadas e levadas para banho ultrassônico por 10 minutos. Após esse tempo, foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm à temperatura de 10°C. A reação aconteceu em tubos de ensaio, utilizando 10 µL do extrato da amostra seguindo os seguintes passos:

- 1) Adição de 900 µL de reagente (FRAP)
- 2) Adição de 10 µl de amostra (sobrenadante após a centrifugação)
- 3) Adição de 90 µL de água destilada
- 4) Homogeneização e acondicionamento por 30 minutos no escuro.

Após esse período, foi realizada a leitura de absorbância a 594 nm e os resultados expressos em mM de Fe g^{-1} .

3.2.3.9 Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica (MDA) foi avaliada utilizando-se metodologia de Heath e Packer (1968), adaptado. Foram utilizados 200 mg de material foliar fresco macerado em almofariz adicionando-se 5 mL de meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloroacético (10%, m/v). A solução, acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho maria a 90°C por 60 minutos, foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi coletado e levado para leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 e 600 nm. A quantidade do teor de malondialdeído (MDA) formado foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.3.10 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

Realizou-se a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), segundo método de Alexieva et al. (2001). Foram utilizadas 0,1 g de amostras foliares maceradas e congeladas em nitrogênio líquido, as quais foi adicionado 1 mL de TCA 0,1% e agitadas em vórtex, em seguida, foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A reação iniciou-se com a adição de 250 μL de extrato, 250 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e 1,0 mL de iodeto de potássio a 1M. O conteúdo foi incubado no escuro por uma hora e realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 390 nm. Calculou-se a concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras através de curva do próprio peróxido de hidrogênio.

3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições em arranjo fatorial 5×2 , cinco concentrações de ferro, constituindo os diferentes tratamentos com concentrações iguais a 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} e duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%). A colheita de material vegetal para as análises de carotenoides, antocianinas, conteúdo de H_2O_2 , MDA e de enzimas do sistema antioxidantes foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 e 35 dias

após à aplicação de Fe (DAA-Fe) e para avaliação de DPPH, FRAP, compostos fenólicos e flavonoides totais aos 7, 14, 21 e 28 DAA-Fe.

Os dados foram submetidos à análise de regressão, considerando o coeficiente de determinação, comportamento biológico e significância dos parâmetros do modelo pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

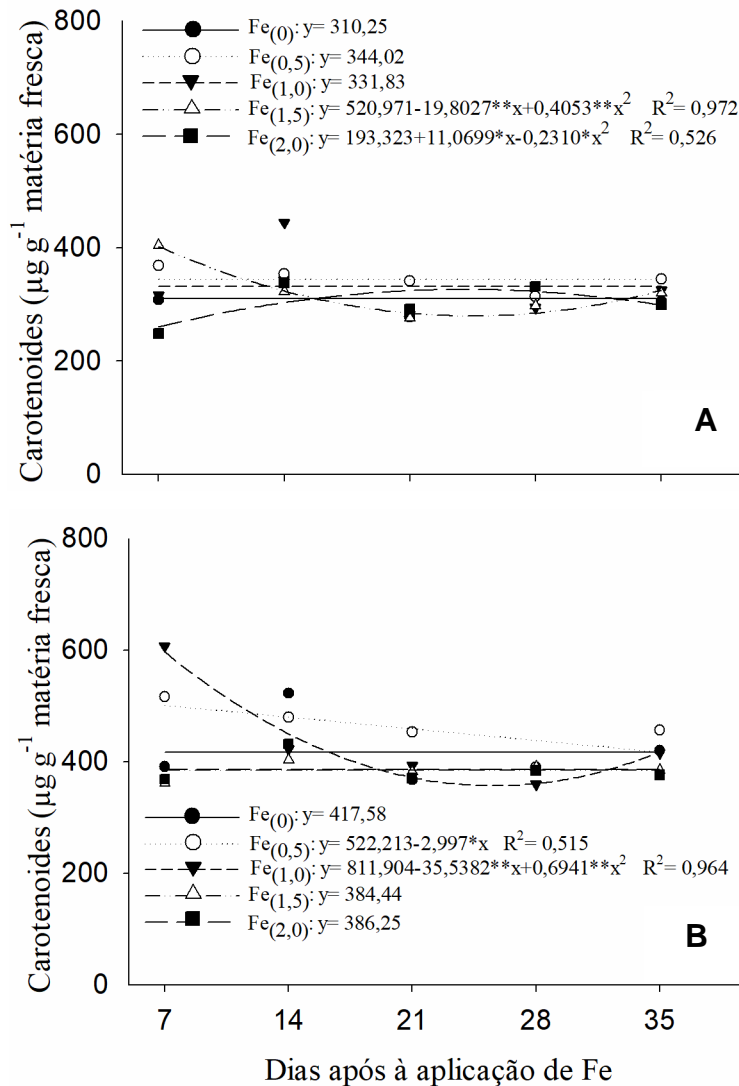
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da aplicação de Fe e da intensidade da radiação solar nos teores de antioxidantes

Carotenoides

Os resultados do presente estudo demonstram que a aplicação de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, em condição de $I_{100\%}$, provoca redução do teor de carotenoides, dos 14 aos 28 DAT, resposta diferente foi revelada pela aplicação de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, durante o mesmo período, ou seja, verificou-se elevação da concentração de carotenoides (Figuras 1 A, B). Dessa forma, demonstrando ser um tratamento promissor para a indução da síntese desse importante grupo de composto de proteção e adaptação das plantas e de utilização devido as suas propriedades antioxidantes. Arunachalam et al. (2009) relataram redução no conteúdo de clorofila e carotenoides com aumento das concentrações de Fe. Rout e Sahoo (2015) relataram que quando a concentração de Fe aumenta, diminui a quantidade de pigmentos como clorofila e carotenoides.

Figura 1 - Teores de carotenoides ($\mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



Em condição com I_{100%}, o valor médio de carotenoides é de 322,185 $\mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹, enquanto, em condição com I_{50%} esse valor eleva para 417,453 $\mu\text{g g}$ matéria fresca⁻¹ (Figuras 1 A, B). Em ambientes com alta radiação solar, o aumento da foto-oxidação de clorofilas depende da concentração de carotenoides, que podem prevenir a fotodestruição das clorofilas (GONÇALVES et al., 2005).

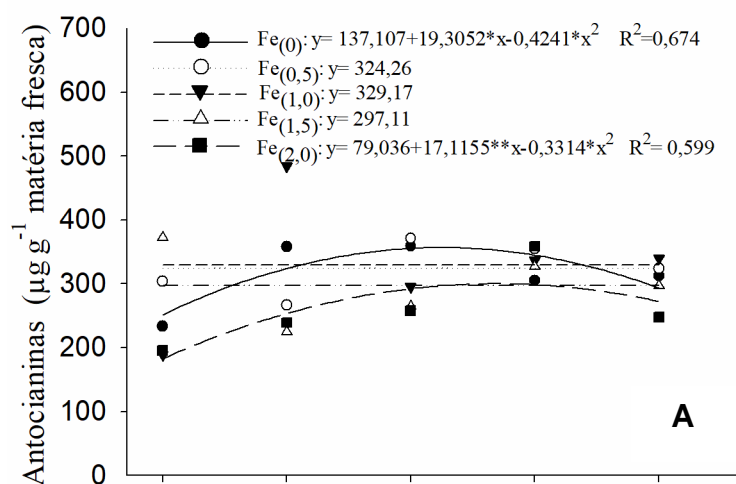
Dessa forma, elevações dos teores de carotenoides em ambientes sombreados podem ser explicadas, pois são sintetizados e foto-oxidados na presença de luz, ou

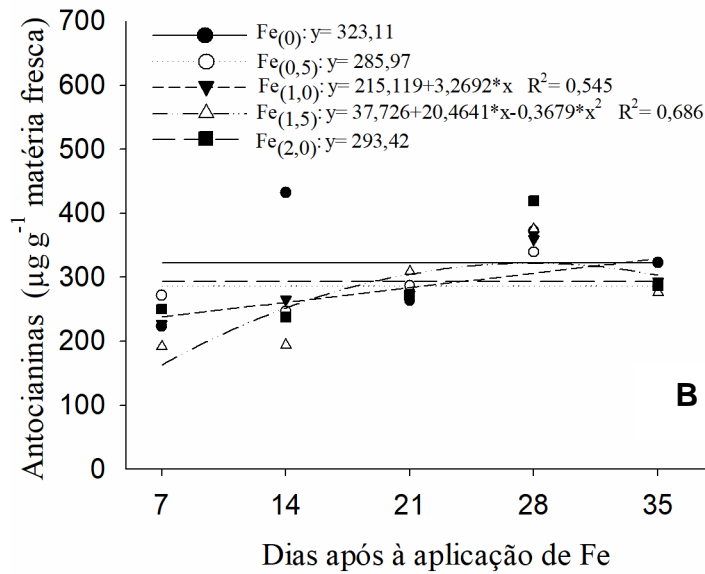
seja, plantas submetidas a pleno sol apresentam menores valores nas concentrações de carotenoides, em comparação à condição de ambiente sombreado. Além disso, a *M. piperita* apresenta metabolismo fotossintético do tipo C₃, saturando-se fotossinteticamente em intensidades de luz relativamente baixas (Figuras 1 A, B).

Antocianinas

Nota-se que os teores de antocianinas elevam com 2,0 g L⁻¹, em condição I_{100%}, semelhante às plantas sem pulverização e em condição I_{50%} com aplicação de 1,5 g L⁻¹, quando comparado às demais concentrações de Fe (Figuras 2 A, B), ou seja, independente da condição de luz, o elemento Fe exerce papel essencial em mecanismo de defesa entre outras funções na fisiologia das plantas de *M. piperita*.

Figura 2 - Teores de antocianinas ($\mu\text{g g}^{-1}$ matéria fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t

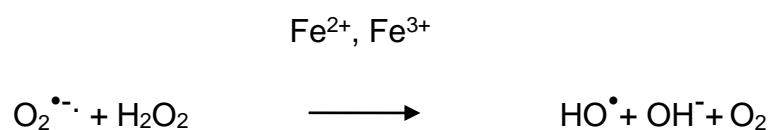




Em condição de I_{100%}, o valor médio de antocianinas é de 304,853 µg g matéria fresca⁻¹, enquanto, em condição de I_{50%} o valor reduz para 291,093 µg g matéria fresca⁻¹ (Figuras 2 A, B). É importante reforçar que, a luz é indispensável para o curso biossintéticos de uma planta em crescimento. Em *Berberis microphylla* verificou-se que a alta intensidade de luz pode aumentar o conteúdo de antocianina três vezes mais do que a intensidade de luz média (ARENA et al., 2017; YANG et al., 2018). Wang et al. (2012) verificaram que a concentração de antocianina foi baixa nas folhas de chá (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) e não foi significativamente afetada pelo tratamento de sombra.

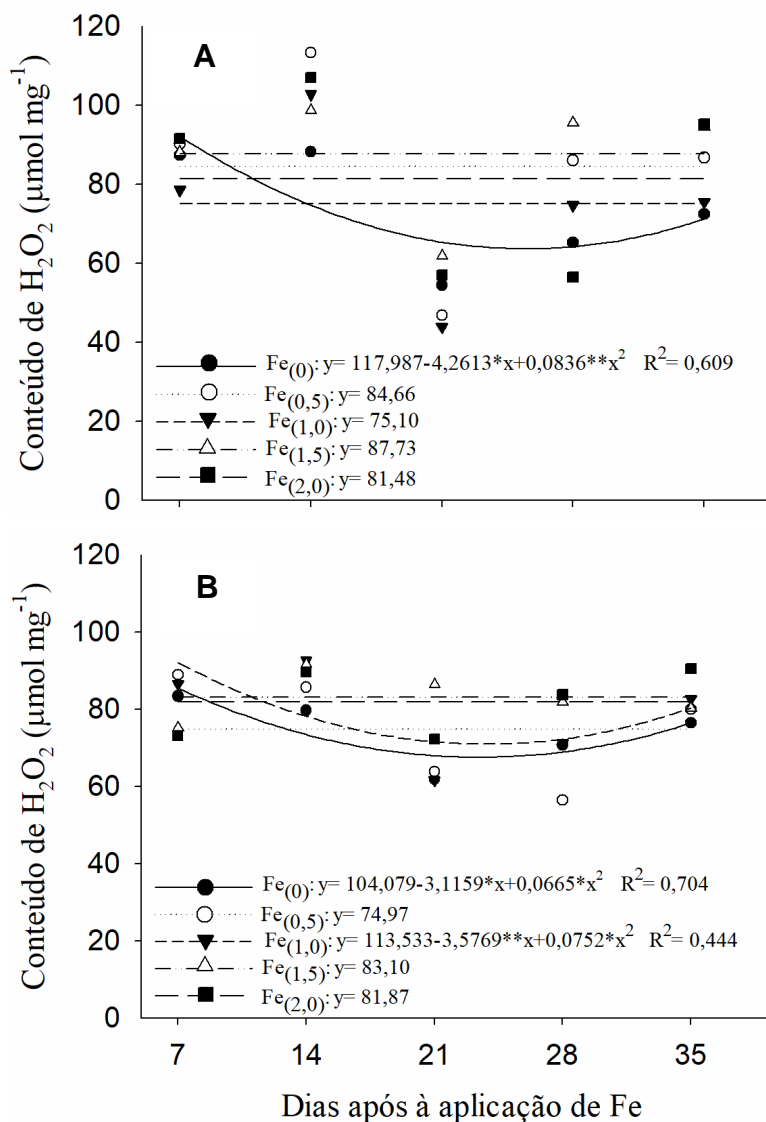
Peróxido de hidrogênio

A exposição das plantas ao íon Fe (Fe²⁺, Fe³⁺) altera o balanço do metabolismo de radicais livres, resultando em acumulação de H₂O₂. Na presença de Fe²⁺, o H₂O₂ pode ser convertido em radicais hidroxilas (HO[•]) altamente reativos, numa reação catalisada pelo metal via reação de Fenton (MITHOFER et al., 2004; RAVET; PILON, 2013), como esquema abaixo:



Portanto, o Fe pode ser tóxico quando se acumula em níveis elevados, em virtude da formação de radicais hidroxilas (OH^-) (PROUSEK et al., 2007). Apesar disso, não se verifica mudanças na produção de H_2O_2 em relação à aplicação de Fe em condição de ambiente de $I_{100\%}$, no entanto, verifica-se redução sem aplicação de Fe. Em relação a $I_{50\%}$, houve redução dos valores de H_2O_2 , tanto sem e com pulverização de 0,5 e 1,0 g L^{-1} de Fe (Figuras 3 A, B).

Figura 3 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ g massa fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t

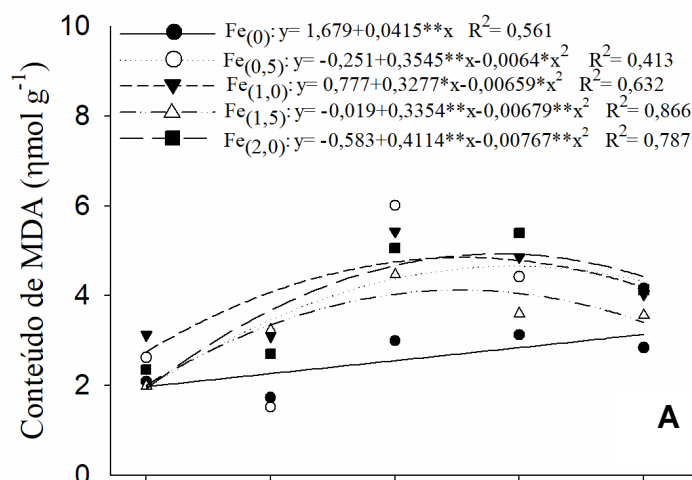


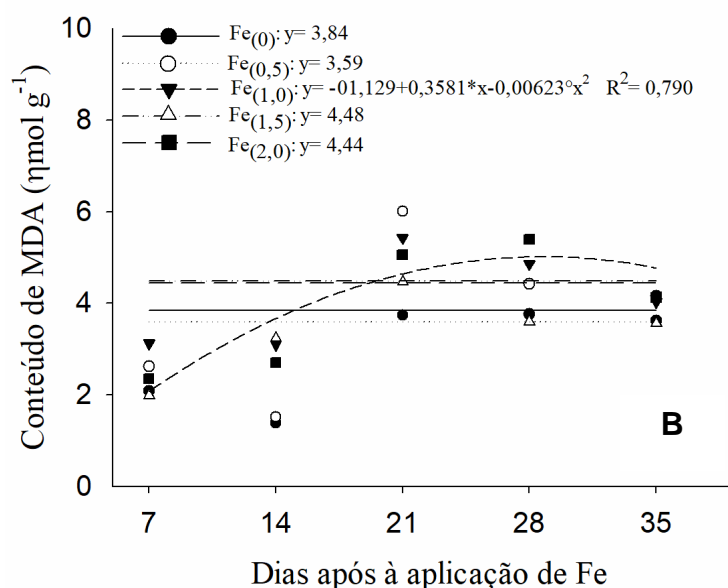
Em condição de $I_{50\%}$, os valores médios de H_2O_2 foram iguais a $78 \mu M H_2O_2 g$ massa fresca⁻¹, enquanto, que em $I_{100\%}$ o valor foi igual a $80 \mu M H_2O_2 g$ massa fresca⁻¹ (Figuras 3 A, B). Na dependência da espécie, em condição de baixa irradiância pode ocorrer maior eficiência fotossintética, sem fotoinibição e sem estresse foto-oxidativo. (CHANG et al., 2013)

Peroxidação de lipídios (MDA)

No presente trabalho os valores de MDA se elevaram em plantas de *M. piperita* com aplicação de Fe, sobretudo em condição com $I_{100\%}$, indicando que a aplicação de Fe age em nível celular, provocando danos oxidativos em lipídios e proteínas, enquanto, em condição de sombreamento 50% eleva os valores de MDA aos 21 e 28 DAT, com aplicação de concentração de $1,0 g L^{-1}$ de Fe (Figuras 4 A, B). Sabe-se que a toxicidade por Fe potencializa o estresse oxidativo, com aumento na produção de EROs, como peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxilas (GILL; TUTEJA, 2010), portanto, concentrações mais elevadas de Fe, como $2,0 g L^{-1}$, pode levar ao colapso no transporte de elétrons e produção de EROs, em condição de $I_{100\%}$ (Figura 4 A), podendo resultar em danos de membranas.

Figura 4 - Peroxidação de lipídios (MDA $\times 10^3$, nmol g massa fresca⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





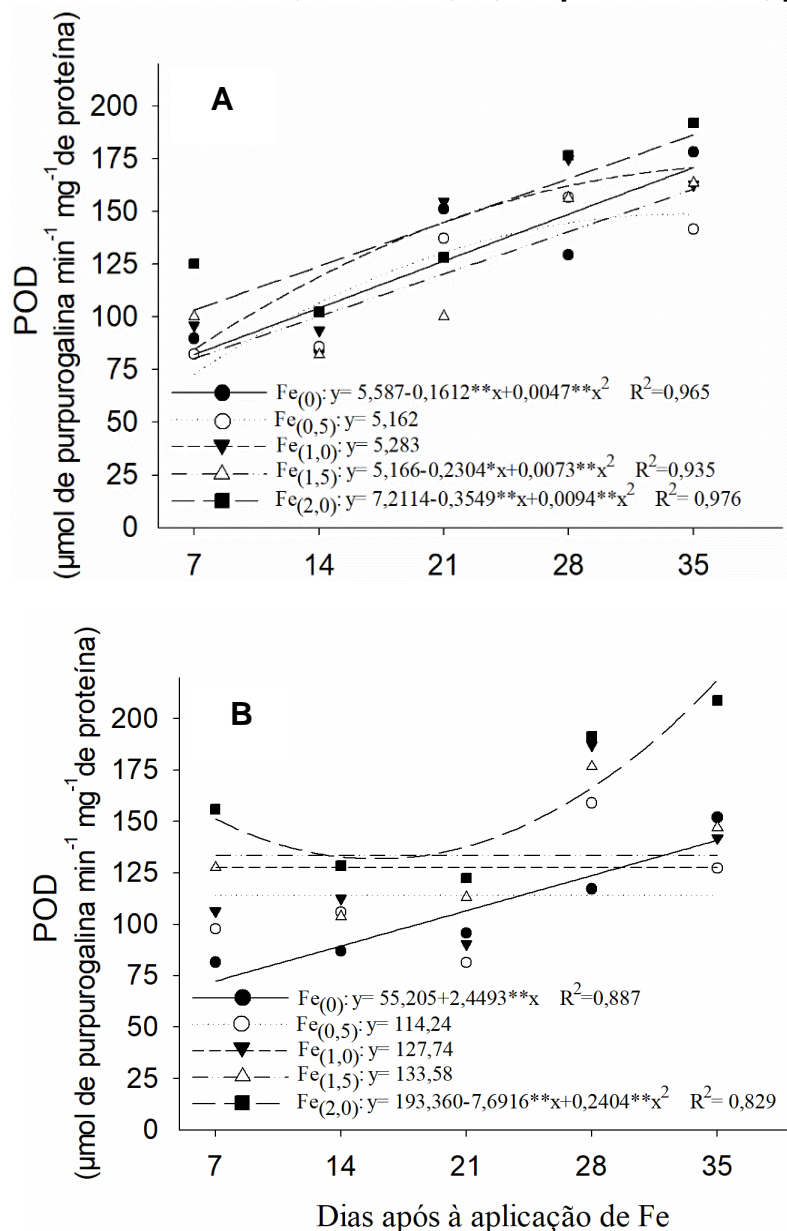
De maneira geral, condição de cultivo com $I_{100\%}$, reduz discretamente os valores de MDA, com média de $3,610 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, em relação a $I_{50\%}$ com média em torno de $4,076 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Figuras 4 A, B). Em parte, esses resultados não concordam com os resultados do conteúdo de H_2O_2 (Figuras 3 A, B), ou seja, ocorre reposta diferencial, pois teve elevação da atividade da peroxidase e não resultou em redução da concentração de H_2O_2 nas folhas (Figuras 5 A, B; 3 A, B). A elevação da POD e redução da atividade da SOD foi o que minimizou danos de peroxidação lipídica, sobretudo, em condição de $I_{50\%}$ (Figuras 5A; 6A, B; 4 A, B).

Atividade da peroxidase

Os valores elevados da atividade da enzima peroxidase (POD) com aplicação da maior concentração de Fe, ou seja, $2,0 \text{ g L}^{-1}$, em ambas condições de irradiância, buscavam diminuir o estresse evidenciado pela tendência de elevação da peroxidação de lipídios, por exemplo, nos períodos finais do ciclo das plantas, quando os mesmos são comparados com os outros tratamentos (Figuras 5 A, B; Figuras 4 A, B). Além disso, pode ser que atividade elevada da POD indica que essa enzima atuou de alguma maneira na remoção de H_2O_2 , mantendo os valores desses em concentração iguais as demais aplicações com Fe (HALLIWELL, 2006). Dessa forma, é sugestivo informar que a atividade da enzima POD pode ser utilizada para a determinação de

possíveis toxicidade de Fe, uma vez que, a atividade desta enzima se correlaciona bem com os níveis de Fe aplicados.

Figura 5 - Atividade da peroxidase (POD, μmol de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



De maneira geral, os valores médios da atividade da POD em ambas as condições de irradiância, foram semelhantes, apesar da condição de $I_{100\%}$ aumentar o

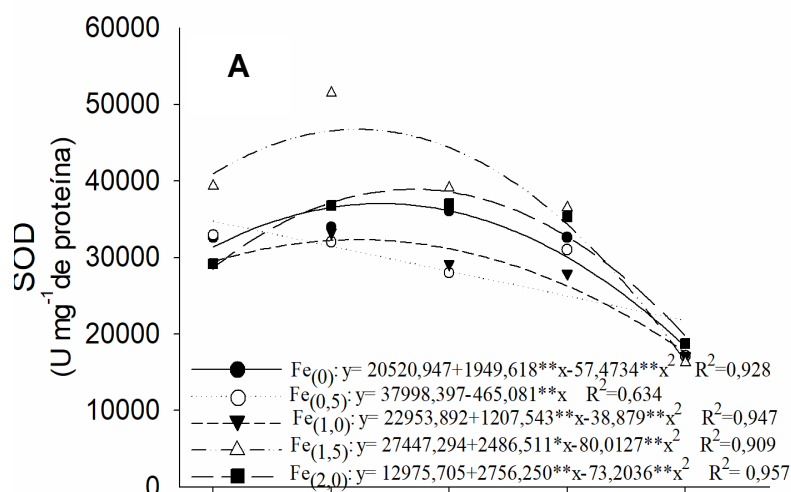
metabolismo das plantas (Figuras 5 A, B). Apesar da atividade da POD tende aumentar em condição de baixa irradiância (MOHAMMAD et al., 2019).

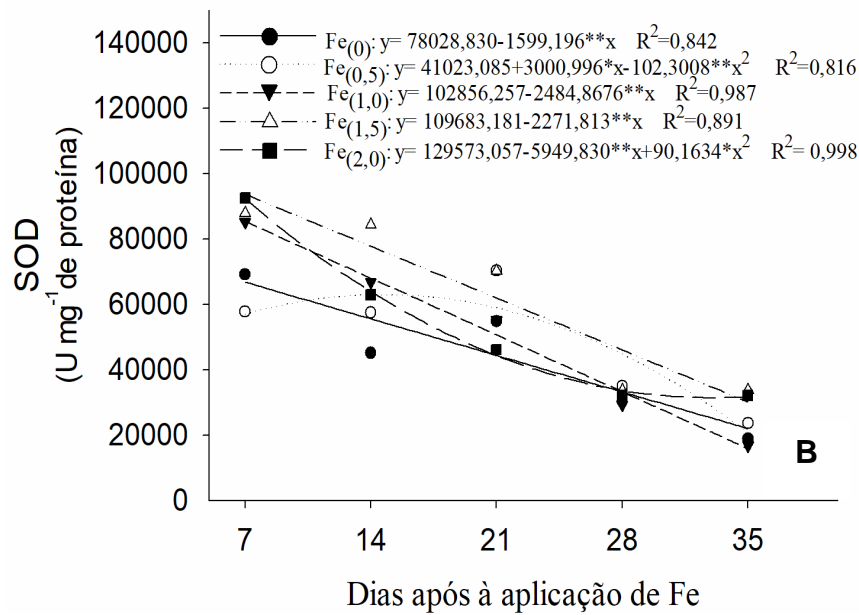
Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD se correlaciona com a elevação da concentração de Fe nas folhas, como observado quando aplicado $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, em ambas as condições de cultivo ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$) (Figuras 6 A, B). Esses resultados indicam que sob concentração mais elevada de Fe, a atividade dessas hemoproteínas é um excelente marcador das respostas a esse elemento.

Os nossos resultados estão em consonância com relatos de outros autores (TEWARI et al., 2005; SUN et al., 2007), pois também houve tendência de redução da atividade da SOD, independente do tratamento. Jucoski et al. (2013) verificaram aumento na atividade da SOD, nas plantas submetidas a níveis tóxicos de Fe em solução nutritiva, acompanhado pelo aumento nas atividades de catalase, enzima importante envolvida no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo provocado por esse metal. No entanto, a deficiência de Fe pode exacerbar ainda mais o acúmulo de ERO, elevando a atividade da SOD e POD (SPIRT et al., 2010).

Figura 6 - Atividade da superóxido dismutase (SOD x 10^{-3} , U mg^{-1} de proteína), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) (A) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





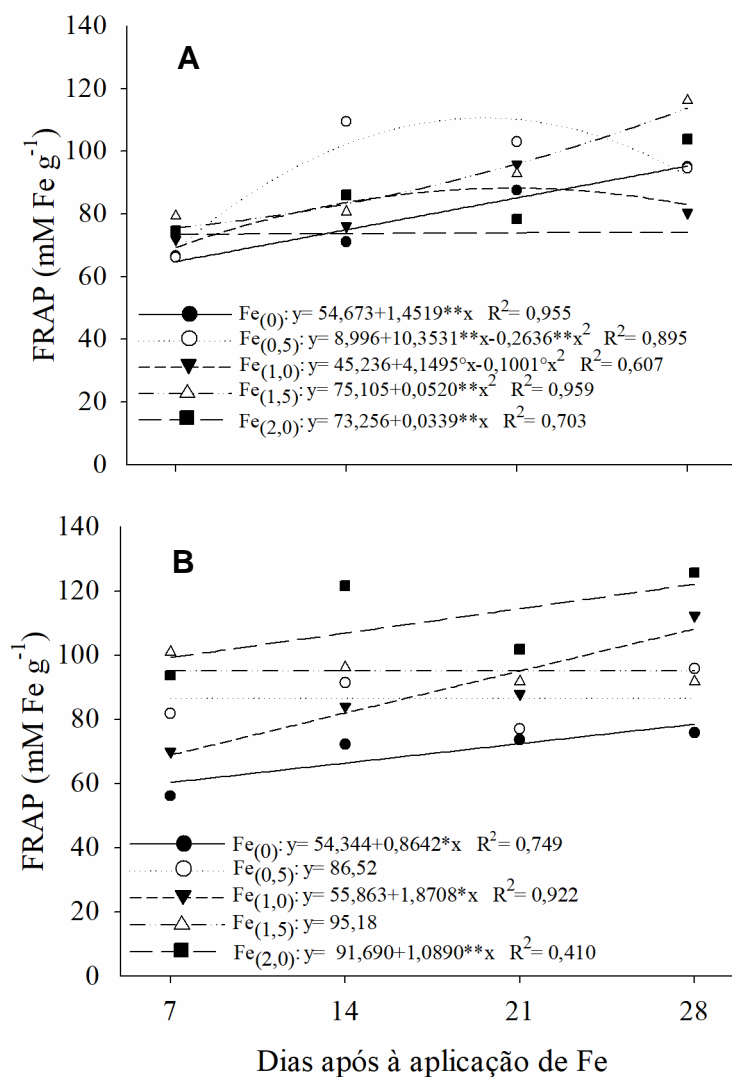
A redução da atividade da SOD, como evidenciado no presente estudo, pode indicar não apenas aumento na produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, conseqüentemente, o estabelecimento de estresse oxidativo, mas também, o envolvimento imediato dessa enzima no processo de desintoxicação deste tipo de ERRO (Figuras 6 A, B). A ação conjunta da POD e SOD, é fundamental para a manutenção da homeostase redox, fundamental para a estabilidade do sistema de membranas nas células expostas a radicais livres (DING et al., 2007).

Atividade antioxidante via FRAP

Os valores obtidos pelo método FRAP revelam pico com a menor concentração de Fe, ou seja, com 0,5 g L⁻¹, em condição de I_{100%}. Em condição com I_{50%}, as plantas que receberam aplicação de Fe apresentam valores superiores de FRAP, sobretudo, com aplicação da maior concentração de Fe (2,0 g L⁻¹) (Figuras 7 A, B). Essa maior capacidade redutora pela formação do complexo ferroso $[Fe^{2+}(TPTZ)_2]^{2+}$, significa elevado potencial antioxidante (BOROSKI et al., 2015), proporcionado pelas aplicações com ferro.

Figura 7 - Atividade da FRAP (mM Fe g⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições.

*** e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t**

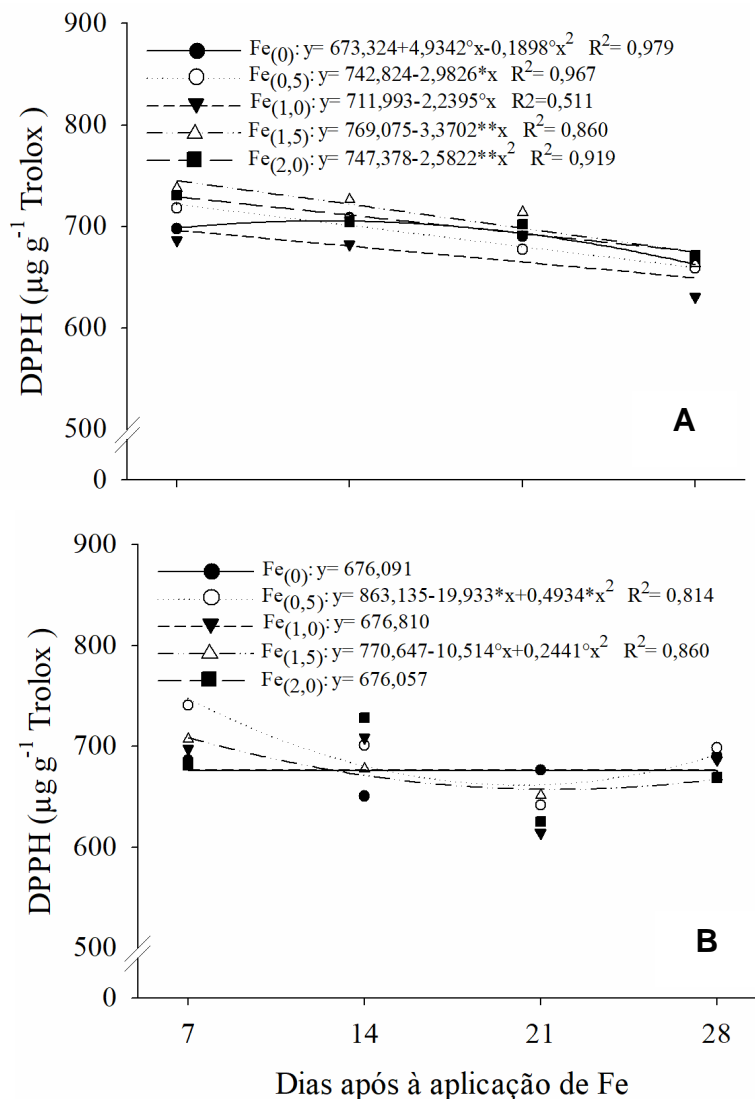


Dessa forma, a atividade antioxidante, analisada pela técnica FRAP, cujos valores maiores nos tratamentos com I_{50%}, igual a 90 mM Fe g⁻¹, em relação à condição com maior irradiância, cujo valor médio foi igual a 80 mM Fe g⁻¹ (Figuras 7 A, B).

Atividade antioxidante via DPPH

Os valores de DPPH em condição I_{100%} apresentam redução ao longo do tempo, independente do tratamento com Fe aplicado. Podemos ainda destacar a aplicação com 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe, enquanto, condição de I_{50%}, se destacam as aplicações com 0,5 e 1,5 g L⁻¹ de Fe, cujos valores apresentam comportamento semelhante, com redução até 21 dias e elevação aos 28 dias após aplicação de Fe (Figuras 8 A, B).

Figura 8 - Atividade de DPPH ($\mu\text{g g}^{-1}$ Trolox), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t

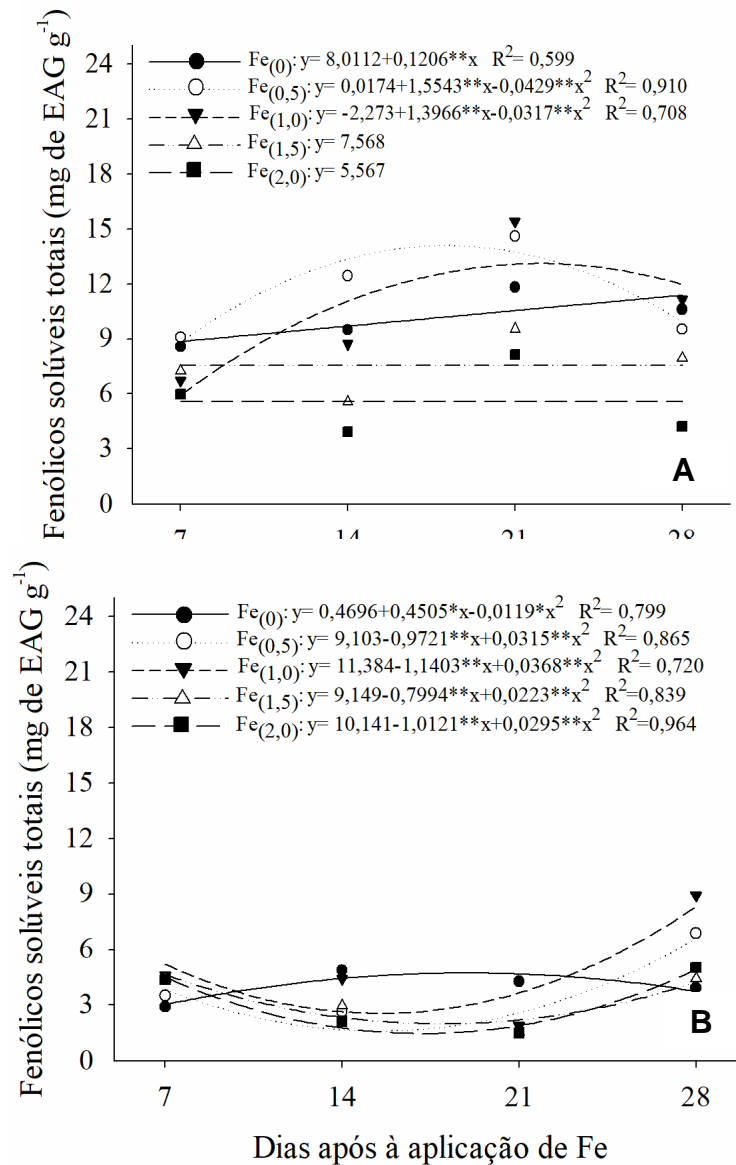


Os valores médios de DPPH das plantas I_{50%} foi de 680 µg g⁻¹ Trolox e em condição de I_{100%} igual a 693 µg g⁻¹ Trolox. A maioria das atividades de eliminação de DPPH para as plantas cultivadas em I_{100%} foi discretamente maior do que as das plantas cultivadas com I_{50%}, corroborando inclusive com valores dos compostos fenólicos (Figuras 8 A, B; 9 A, B). Somporn et al. (2012) verificaram que as diferenças entre as condições de sombreamento para a atividade DPPH foram altamente significativas, enquanto, Ferrera et al. (2016) descrevem que pode ocorrer menor capacidade antioxidante nos tratamentos a pleno sol, independente do solo estar coberto por palha ou desnudo.

Fenólicos solúveis totais

Ambientes com condição de elevada irradiância é importante na síntese de compostos fenólicos. Yang et al. (2018) e Arena et al. (2017) indicam que o acúmulo de compostos fenólicos em *Centella asiática* depende da duração e quantidade de luz por dia. Para o teor de fenol total, a alta intensidade de luz eleva consideravelmente em comparação a menor intensidade de luz (Figuras 9 A, B). Portanto, a alta intensidade de luz pode ativar a capacidade antioxidante oriundos do metabolismo especializado das plantas de *M. piperita*.

Figura 9 - Conteúdo de fenólicos solúveis totais (mg de EAG g⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t



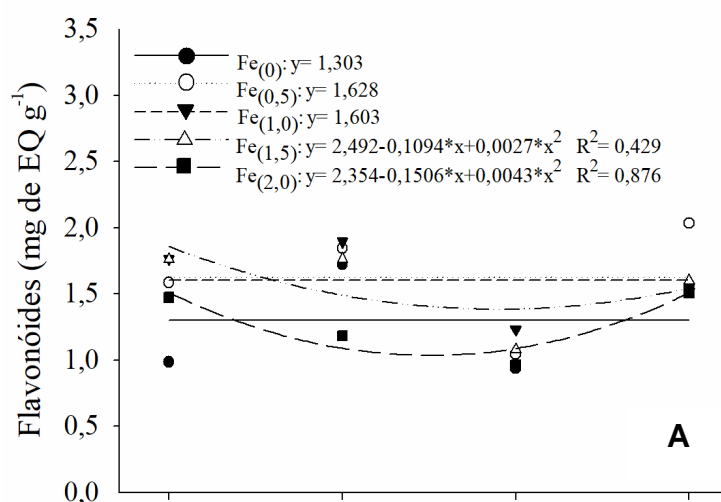
O conteúdo fenólico total nas plantas cultivadas sob maior irradiância foi mais elevado (9,04 mg de EAG g⁻¹), enquanto o conteúdo fenólico total nas plantas cultivadas com I_{50%} apresentou valores inferiores (3,84 mg de EAG g⁻¹) (Figuras 9 A, B). Ferrera et al. (2016) verificaram em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) que o acúmulo de compostos fenólicos eleva em condição de sombreamento, sobretudo,

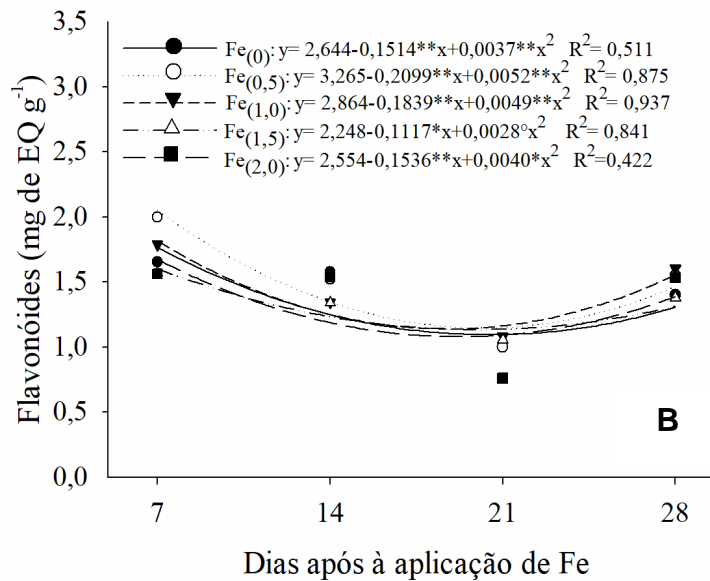
sombreamento a 35%. Esses autores indicaram ainda que, o sombreamento de 35% a 50% são os melhores para o acúmulo de compostos fenólicos em planta de erva-mate na fase juvenil. A radiação mais intensa é preponderante para elevar a concentração de dióxido de carbono no meio celular que, por sua vez, inibe a síntese de compostos fenólicos, pois para a formação de tais compostos é necessária a liberação de CO₂ (BERTAGNOLLI et al., 2007). Deve-se destacar que, o teor de compostos fenólicos pode variar conforme a região de plantio, tipo de solo, exposição solar e índice pluviométrico (MARTINS et al., 2011).

Flavonoides totais

Aplicação de 2,0 g L⁻¹ de Fe tende a reduzir os valores de flavonoides, possivelmente, em resposta à defesa provocado pela aplicação dessa concentração, em associação com a I_{100%}. Em condição de I_{50%}, independente do tratamento com Fe, as plantas apresentam comportamento semelhante (Figuras 10 A, B).

Figura 10 - Conteúdo de flavonoides totais (mg de EAG g⁻¹), em plantas de *M. piperita* submetidas aos seguintes tratamentos com 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) (A) e I_{50%} (irradiância 50%) (B), aos 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação de Fe. Os símbolos são médias de 5 repetições. * e ** representam a significância do modelo a $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente, pelo teste t





Em condição com maior irradiância, os valores médios de flavonoides totais foram iguais a 1,473 mg de EAG/g, enquanto, em condição com menor intensidade de luz os valores são de 1,401 mg de EAG/g (Figuras 10 A, B). Em geral, dias longos podem aumentar os conteúdos de flavonoides e ácidos fenólicos, como mecanismo de defesa das plantas para resistir à exposição ao excesso de luz (ALQAHTANI et al., 2015). A exposição ao sol durante todo o dia resulta em um aumento no conteúdo de flavonoides nas plantas em comparação com aquelas cultivadas sob sombreamento 50% (KHATIB et al., 2011).

De maneira geral, a luz é fundamental para regular a produção de flavonoides nas plantas (CHEYNIER et al., 2013). Intensidades de luz mais elevadas estimulam a síntese de fenóis e flavonoides (LIU et al., 2018; NI et al., 2020). Condição de sombra teve efeito notavelmente negativo no acúmulo de flavonoides, mas não teve efeito significativo no acúmulo de antocianinas (WANG et al., 2012). Xu et al. (2014) também relataram que a luz solar total pode promover a biossíntese de flavonóis nas folhas de *Gingko biloba*. Ghasemzadeh et al. (2010) relataram que luz mais baixa, ou seja, com intensidade de $310 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aumenta a atividade antioxidante em gengibre (*Zingiber officinale*), inclusive elevando o conteúdo de flavonoides totais.

3.4 CONCLUSÕES

Portanto, sugerimos a existência de participação conjunta da atividade da peroxidase e da superóxido dismutase, minimizando possíveis danos decorrentes da peroxidação lipídica, favorecendo, de maneira geral, plantas de *Mentha piperita* em ambas as condições de irradiância (I_{100%} e I_{50%}).

O acúmulo de compostos fenólicos em folhas de *M. piperita* ocorreu em condição de I_{100%}, correlacionando em parte com a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP.

REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, v.24, n.12, p.1337-1344, 2001.
- ALQAHTANI, A.; TONGKAO-ON, W.; LI, K.M.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; CHAN, K.; LI, G.Q. Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in Australian *Centella asiatica* (L.) Urb. **Phytochem.**, v. 26, p. 436–443, 2015.
- ARENA, M.E.; POSTEMSKY, P.D.; CURVETTO, N.R. Changes in the phenolic compounds and antioxidant capacity of *Berberis microphylla* G. Forst. berries in relation to light intensity and fertilization. **Sci. Hort.**, v. 218, p. 63–71, 2017.
- ARUNACHALAM, R.; PAULKUMAR, K.; RANJITSINGH, A.J.A.; ANNADURAI, G. Environmental assessment due to air pollution near iron smelting industry. **J. Environ. Sci. Technol.**, v. 2, p. 179-186, 2009.
- ASENSIO, A.C.; GIL-MONREAL, M.; PIRES, L.; GOGORCENA, Y.; APARICIO-TEJO, P.M.; MORAN, J.F. Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. **J. Plant Physiol.**, v.169, p.1253–1260, 2012.
- AWAD, M.A.; DE JAGER, A.; VAN WESTING, L.M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in applefruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, p. 249-263, 2000.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BERTAGNOLLI, S. M. M., ROSSATO, S. B., SILVA, V.L. et al. Influence of the carbonic maceration on the levels of trans-resveratrol in cabernet sauvignon wine. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v 43, n 1, p. 71-77, 2007.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179- 194, 2003.
- 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, p. 248-254, 1976.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolic constituents. **LebensmWiss Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R.; **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**, 1. ed. – Curitiba, Appris, 2015.
- CHAN H. L.; KANG, C. Y.; LEE, T. M. Hydrogen peroxide production protects *Chlamydomonas reinhardtii* against light-induced cell death by preventing singlet

oxygen accumulation through enhanced carotenoid synthesis. **Journal of plant physiology**, v. 170, p. 976-986, 2013.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 421-437, 2008.

COMINELLI, E.; GUSMAROLI, G.; ALLEGRA, D.; GALBIATI, M.; WADE, H.K.; JENKINS, G.I.; TONELLI, C. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. **J. Plant Physiol.**, v. 165, p.886–894, 2008.

DING, B.; SHI, G.; XU, Y.; HU, J.; XU, Q. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart Griseb leaves to cadmium stress. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 800-803, 2007.

DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 9-17, 2014.

EL-EMARY, F. A.; ABD EL-AAL, M. M. .; ABD EL-DAYEM, H. M. .; ISMAEIL, FATEN H. M.; ABOU-SHLELL, M. K. Morphophysiological and anatomical studies on moringa (*Moringa oliefera* L.). **Plant Archives**, v. 18, n. 2, p. 1421-1442, 2018.

FERRERA, T.S.; HELDWEIN, A.B.; DOS SANTOS, C.O.; SOMAVILLA, J.C.; SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.2, p.588-596, 2016.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H.Z.; RAHMAT, A.; WAHAB, P.E.M.; HALIM, M.R.A. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and antioxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 3885–3897, 2010.

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.

GONÇALVES, J. F. C.; BARRETO, D. C. S.; SANTOS JUNIOR, U. M.; FERNANDES, A. V.; SAMPAIO, P. T. B.; BUCKERIDGE, M. S. Growth, photosynthesis and stress indicators in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 325-334, 2005.

GONÇALVES, A.; GUAZZELLI, M. J. **Agrofloresta e Óleos Essenciais**. 2014. Disponível em: <http://www.centroecologico.org.br/cartilhas/Cartilha_Oleos.pdf>. Acesso em: 02 de novembro de 2020.

- GONÇALVES, F. C. M.; PARREIRAS, N. S.; CAMPOS, F. G.; MANTOAN, L. P. B.; BOARO, C. S. F. Exogenous salicylic acid modifies gas exchange and biomass production of *Mentha x piperita* L.. **Australian Journal of Crop Science (Online)**, Australia, v. 14, p. 98-107, 2020.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.
- HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Curr Opin Plant Biol.**, v. 12, n. 3, p. 259–66, 2009.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.
- JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant Cell Environ.**, v. 33, p. 1239–1247, 2010.
- JUCOSKI, G. O. Et al. Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniàora* L. Plants. **Acta physiologia plantarum**, v. 35, p. 1645-1657, 2013.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KHATIB, A.; SHAARI, K.; ABAS, F.; SHITAN, M.; KNEER, R.; NETO, V.; LAJIS, N.H. Discrimination of three pegaga (*Centella*) varieties and determination of growth-lighting effects on metabolites content based on the chemometry of 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 410–417, 2011.
- LIU, Y.; FANG, S.; YANG, W.; SHANG, X.; FU, X. A qualidade da luz afeta a produção de flavonóides e a expressão de genes relacionados em *Cyclocarya paliurus*. **J. Photochem. Photobio. B: Biol.**, v. 179, p. 66–73, 2018.
- MA, Z.; LI, S.; ZHANG, M. Light intensity affects growth, photosynthetic capability, and total flavonoid accumulation of *Anoectochilus* Plants. **HortScience**, v.45, 2010.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.
- MITHOFER, A. L.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Letters**, v. 566, p. 1–5, 2004.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.**, v. 9, p. 490–498, 2004.
- MOHAMMAD, B.A.; HAHN, E.J.; PAK, K.Y. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 43, p. 213-223, 2005.

MOHAMMAD, S.; KHAN, M.A.; ALI, A.; KHAN, L.; KHAN, M.S. Feasible production of biomass and natural antioxidants through callus cultures in response to varying light intensities in olive (*Olea europaea* L.) cult. Arbosana. **Journal of Photochemistry and Photobiology (B: Biology)**, v. 193, p. 140–147, 2019.

NI, YU-WAN.; LIN, KUAN-HUNG.; CHEN, KAI-HSIEN.; WU, CHUN-WEI.; CHANG, YU-SEN. Flavonoid Compounds and Photosynthesis in *Passiflora Plant* Leaves under Varying Light Intensities . **Plants**, v. 9, p. 633, 2020.

OLIVEIRA, M. I.; CASTRO, E. M.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 56-62. 2009.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTINI, B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, 2009.

ONAGA, G.; DRAMÉ, K. N.; ISMAIL, A. M. Understanding the regulation of iron nutrition: can it contribute to improving iron toxicity tolerance in rice? **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 8, p. 709–726, 2016.

PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.11, p. 137-143, 1999.

POPOVA, M; BANKOVA, V.; BUTOVSKA, D.; PETROV, V.; DAMYANOVA, B. N.; SABATINI, G.; MARCAZZAN, L.; BOGDANOV, D. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, v.5, p.235-240, 2004.

PROUSEK, J.; PALACKOVÁ, E.; PRIESOLOVÁ, S.; MARKOVÁ, L.; ALEVOVÁ, A. Fenton-and Fenton-Like AOPs for Wastewater Treatment: From Laboratory-To-Plant-Scale Application. **Separation Science and Technology** , v. 42, p. 1505 - 1520, 2007.

RAVET, K.; PILON, M. Copper and Iron Homeostasis in Plants: The Challenges of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, p. 9, 2013.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p.1189–1202, 2004.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, v. 3, p. 1-24, 2015.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SIDA-ARREOLA, J.P.; SÁNCHEZ-CHÁVEZ, E.; ÁVILA-QUEZADA, G.D.; ZAMUDIO-FLORES, P.B.; ACOSTA MUÑÍZ, C.H. Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. **Plant Soil Environ.**, v. 61, n. 12, p. 573–576, 2015.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, n. 2/3, p.337-354, 2002.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic– phosphotungstic acid reagents. **Am J EnolVit.**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, v. 299, p.152 -178, 1999.

SOMPORN, C.; KAMTUO, A.; THEERAKULPISUTB, P.; SIRIAMORNPUNC, S. Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) harvested from north-eastern Thailand . **J Sci Food Agric.**, v. 92, p. 1956–1963, 2012.

SPIRT, S.; LUTTER, K.; STAHL, W. Carotenoids in Photooxidative Stress. **Curr. Nutr. Food Sci.**, v. 6, p. 36–43, 2010.

STEIN, R.J.; LOPES, S.I.G.; FETT, J.P. Iron toxicity in fieldcultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, p. 135-146, 2014.

SUN, B.T., JING, Y., CHEN, K.M., SONG, L.L., CHEN, F.J., ZHANG, L.X Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 536–543, 2007.

TAULAVUORI, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; HYÖKY, V.; TAULAVUORI, E. Blue mood for superfood. **Natural Product Communications**, v. 8 , n. 6, p. 791–794, 2013.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, p. 65–72, 2000.

TEWARI, R.K.; KUMAR, P.; NEETU, SHARMA, P.N. Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. **Plant Science** v. 169, p. 1037-1045, 2005.

THOMINE, S.; VERT, G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 322-327, 2013.

ÜREK, R. O.; TARHAN, L. The relationship between the antioxidant system and phycoyanin production in *Spirulina maxima* with respect to nitrate concentration. **Turk J Bot**, v. 36, p. 369-377, 2012.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v.164, p.645-655, 2003

WANG, Y. S.; GAOB, L.; SHANA, Y.; LIUA, Y.; TIANB, Y.; XIAA, T. Influence of shade on flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Scientia Horticulturae**, v. 141, p. 7–16, 2012.

WU, Y.; NI, Z.; SHI, Q.; DONG, M.; KIYOTA, H.; GU, Y.; CONG, B. Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities. **Chemical Reviews** v.112, p. 5967-6026, 2012.

XU, Y.; WANG, G.; CAO, F.; ZHU, C.; WANG, G.; EL-KASSABY, Y.A. Light intensity affects the growth and flavonol biosynthesis of ginkgo (*Ginkgo biloba*, L.). **New For**, v. 45, p. 765–776, 2014.

YANG, L.; WEN, K. S.; RUAN, X.; ZHAO, Y. X.; WEI, F et.al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

CAPÍTULO 4

APLICAÇÃO DE FERRO E INTENSIDADE DE RADIAÇÃO SOLAR MODIFICA ANATOMIA DE FOLHAS DE *Mentha piperita* L.

RESUMO

A folha é órgão fotossintético primário que geralmente se modifica em resposta as diferentes condições ambientais, inclusive efeitos decorrentes da aplicação de nutrientes e da intensidade de radiação solar. O presente estudo tem como objetivo analisar modificações anatômicas em folhas de plantas de *Mentha piperita* L. submetidas à aplicação de Fe e diferentes condições de irradiância. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e em delineamento inteiramente casualizado. As variáveis foram avaliadas em esquema fatorial 3x2, ou seja, três concentrações de Fe iguais a 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ou de regressão e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados revelam que a elevação do teor de Fe em folhas de plantas de *M. piperita* é proporcional a concentração de Fe aplicada. A aplicação de Fe foliar não modifica espessuras nas faces da epiderme adaxial e abaxial do limbo foliar. Plantas de *M. piperita* pulverizadas com 1,5 g L⁻¹ de Fe e sob condição de I_{50%} apresentam elevação da espessura do mesofilo foliar. A área ocupada pelos espaços intercelulares no mesofilo foi afetada significativamente na presença de 1,5 g L⁻¹ de Fe em condição de menor irradiância. Plantas pulverizadas com 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob I_{50%} eleva a densidade de veneção do mesófilo. A aplicação de Fe diminui o número de elementos condutores na nervura principal. A condição de I_{50%}, reduz espessura da epiderme da face adaxial, parênquimas paliçádico e esponjoso. Conclui-se que, o acúmulo de Fe em folhas é proporcional a concentração aplicada e a aplicação com Fe modifica aspectos anatômicos em plantas de *M. piperita*, na dependência da intensidade de radiação solar.

Palavras-chave: Planta herbácea. Metal. Estrutura foliar.

CHAPER 4

IRON APPLICATION AND SOLAR RADIATION INTENSITY ALTERS LEAVES MORPHOLOGY IN *Mentha piperite* L. PLANTS

ABSTRACT

The leaf is a primary photosynthetic organ that generally changes in response to different environmental conditions, including effects resulting from the application of nutrients and the intensity of solar radiation. The present study aims to analyze anatomical changes in leaves of *Mentha piperita* L. plants submitted to Fe application and different irradiance conditions. The experiment was carried out in a greenhouse and in a completely randomized design. The variables were evaluated in a 3x2 factorial scheme, that is, three Fe concentrations equal to 0 (control), 1.5 and 2.0 g L⁻¹ and two irradiance conditions, I_{100%} (full sun) and I_{50%} (irradiance 50%). The results obtained were subjected to analysis of variance or regression and the means compared by the Tukey test at 5% probability. The results reveal that the elevation of Fe content in leaves of *M. piperita* plants is proportional to the concentration of Fe applied. The application of leaf Fe does not change thicknesses on the faces of the adaxial and abaxial epidermis of the leaf blade. Plants of *M. piperita* sprayed with 1.5 g L⁻¹ of Fe and under I_{50%} condition present an increase in the thickness of the leaf mesophyll. The area occupied by the intercellular spaces in the mesophyll was significantly affected in the presence of 1.5 g L⁻¹ of Fe in a condition of less irradiance. Plants sprayed with 2.0 g L⁻¹ of Fe and under I_{50%} increases the venophilic density of the mesophile. The application of Fe decreases the number of conductive elements in the main rib. The condition of I_{50%}, reduces the thickness of the epidermis of the adaxial face, palisade and spongy parenchyma. It is concluded that the accumulation of Fe in leaves is proportional to the applied concentration and the application with Fe modifies anatomical aspects in plants of *M. piperita*, depending on the intensity of solar radiation.

Keywords: Herbaceous plant. Metal. Leaf structure.

4.1 INTRODUÇÃO

A folha é o órgão de maior exposição às variáveis ambientais e, por essa razão, modificações de suas características em vários níveis podem ser observadas (CASTRO et al., 2009). Folhas sujeitas a diferentes condições de radiação solar podem apresentar modificações da anatomia da folha (CRAVEN et al., 2010; SILVA et al., 2010; MARCH; CLARK, 2011), o que pode permitir a manutenção e proteção do processo fotossintético mesmo em condições adversas. As mudanças fisiológicas e anatômicas em resposta a condições estressante por ferro (Fe) são evidências pelo impacto ecofisiológico que esse íon exerce sobre os vegetais (GOMES et al., 2011; ROYCHOUDHURY et al. 2012a; SHARMA, 2012), inclusive causam mudanças na morfologia e na estrutura externa e interna das folhas, como redução nas células do mesófilo e alterações na densidade estomática (SANDALIO et al., 2001; SRIGHAR et al., 2005; SOARES et al. 2012; TRIPATHI et al. 2012a, b; VACULÍK et al. 2012).

O Fe é um metal vital para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois influencia múltiplos processos metabólicos e enzimáticos, como relacionados ao transporte de oxigênio e elétrons, fixação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de DNA, clorofila e hormônio (BRIAT, 2007; JEONG; GUERINOT, 2009). O Fe é constituinte básico dos cloroplastos (THOMINE; VERT, 2013; CONNORTON et al., 2017, 2017a), portanto, alterações de Fe pode atuar diretamente em nível estrutural, provocando reduções nas células da epiderme e do mesófilo foliar (YOU-QIANG et al., 2012; SANTANA et al., 2014; MÜLLER et al., 2015).

Os efeitos da aplicação de Fe em anatomia podem ser atribuídos alterações em diferentes estruturas do tecido foliar durante o crescimento e desenvolvimento da planta. El-Desoukey et al. (2018) verificaram alterações na anatomia do caule e folha de plantas de pepino com aplicações de Fe, como aumento do tecido do xilema. Esses autores verificaram ainda aumento da espessura e do número das fibras do floema. El-Emary et al. (2018) relata que a aplicação foliar de 500 mg L⁻¹ em plantas de moringa aumentou as medidas anatômicas no caule e na folha. Tais efeitos estimuladores do Fe nas características anatômicas podem ser atribuídos a atividade do câmbio, relacionado sobretudo ao aumento do nível de hormônios endógenos, citocininas e auxinas (SOTIROPOULOS et al., 2002).

As modificações estruturais em relação a radiação solar estão associadas a capacidade de aclimatação às diferentes condições ambientais (VALADARES; NIINEMETS, 2008; DENG et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016), devido a regulação da difusão luminosa e gasosa dentro da folha, maximizando a eficiência fotossintética (KIRCHNER et al., 2010; POMPELLI et al., 2010; ROSSATO; KOLB, 2010; SABBI et al., 2010). Por exemplo, folhas que se desenvolvem sob condições de alta luminosidade tendem a ser menores e mais espessas, com aumento de mesofilo por unidade de área, menor quantidade de espaços intercelulares, maior densidade de estômatos e de nervuras. Tais variações estruturais estão associadas à regulação da difusão luminosa e gasosa dentro da folha (TERASHIMA et al., 2006; VALLADARES; NIINEMETS, 2008; CASTRO et al., 2009; KIRCHNER et al., 2010; ROSSATO; KOLB, 2010). Plantas de *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* e *Pistacia lentiscos* eleva espessura dos tecidos foliares, nas folhas de sol, com destaque para o parênquima paliçádico, que contribuiu com cerca de 46% para a espessura total da folha (GRATANI et al., 2006). Murphy et al. (2012) sugerem que o aumento dos valores da porcentagem de epiderme é proporcionalmente relacionado ao tamanho das folhas, que são maiores sob intensas condições de sombreamento.

Além disso, a absorção da maioria dos nutrientes minerais é adequada e relativamente constante, quando há suficiente provisão de energia, porém, sob baixa intensidade energética, a absorção ativa de nutrientes é reduzida (CUNNINGHAM; NIELSEN, 1965; CLARK, 1981). Terashima et al. (2006) sugerem ainda que células menores exigiriam um gasto maior de nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo, em ácidos nucléicos e proteínas, o que resultaria em um decréscimo na taxa fotossintética.

Portanto, as folhas modificam em relação as diferentes condições ambientais, inclusive efeitos decorrentes da aplicação de nutrientes, como o próprio Fe e da intensidade de radiação solar, que, por sua vez podem causar efeitos substanciais no tamanho e espessura desse órgão (AKULA; RAVISHANKAR, 2011). Embora haja informações relacionadas à influência isolada da aplicação de Fe e da intensidade da luz em plantas medicinais (SOUZA et al., 2011; COSTA et al., 2012), inclusive em hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) (ZEHTAB-SALMASI et al., 2008). No entanto, não encontramos estudos que tratem a interação entre esses fatores, apesar de apresentar correlações entre si, podendo exercer influência conjunta em respostas anatômicas.

O presente estudo tem como objetivo analisar modificações anatômicas de folhas de *M. piperita* submetidas a concentrações elevadas de Fe sob diferentes condições de radiação solar.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de estudo

O experimento foi conduzido no Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia - Setor de Biologia Vegetal, IBB, UNESP, Botucatu/SP, em casa de vegetação, com controle de umidade e temperatura e com as seguintes coordenadas geográficas: 22°53'12.2"S, 48°29'52.5"W.

4.2.2 Material vegetal e tratamentos

As estacas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) foram obtidas de plantas matrizes cultivadas em vasos contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças® +Carolina soil® + Solo, proporção 1:1:1.

Ramos aéreos das plantas foram selecionados e a partir deles, estacas com 8 cm de comprimento e com os quatros primeiros pares de folhas mantidos foram confeccionadas e, em seguida, colocadas em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças®. Essas estacas foram mantidas em câmara de nebulização intermitente até o enraizamento, conforme Gonçalves et al. (2020).

Aos 30 dias após o plantio das estacas e enraizadas foram transferidas definitivamente para vasos com capacidade de 2,6 L, utilizando Tropstrato HT Hortaliças® como substrato.

Os tratamentos constituirão de soluções contendo 13% de ferro (EDTA) solúvel. As concentrações de ferro (Fe) utilizadas foram iguais a 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e dissolvidas em água destilada. Essas concentrações foram utilizadas com base na recomendação ótima do fertilizante foliar, trabalho realizado por El-Emary et al. (2018) e por meio de testes preliminares.

O pH contendo a solução de quelato de Fe foi ajustado para aproximadamente a 5,0. Faixa ideal para solubilidade, controle e eficácia da atividade do fertilizante foliar aplicado. As aplicações de Fe foram realizadas dez dias após aclimação das plantas ao substrato e quatro dias após a aclimação das plantas as diferentes condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%) em intervalos semanais e avaliação realizada aos 35 dias.

A aplicação de Fe foi realizada via foliar com auxílio de pulverizador manual de CO₂ pressurizado, com bico do tipo “Leque”, com taxas de vazão de 0,025 a 2500 gpm (0,09 a 9464 l/min) e pressões até 4000 psi (276 bar), utilizando como agente espalhante o produto comercial Agral® (Nonil Fenoxi Poli (Etilenoxi) Etanol) na proporção de 800 µL por litro de solução de ferro.

As concentrações de Fe utilizadas nos diferentes tratamentos foram realizadas em plantas com 44 dias após a semeadura das estacas. As pulverizações realizadas pela manhã (9:00 h) com temperaturas médias próximas a 18°C e umidade relativa do ar de 80%.

As plantas foram fertirrigadas com solução nutritiva nº 2 de Hoagland & Arnon, com força iônica igual a 70%, pH ajustado para 5,5 - 6,5 e a condutividade elétrica mantido entre 1,5 - 2,5 mS cm⁻¹, conforme Gonçalves et al. (2020).

4.2.3 Teor de ferro foliar

Amostras de folhas foram armazenadas em sacos de papel, identificadas e levadas para secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, até atingirem massa constante. Essas amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, acondicionadas e levadas ao Laboratório de Análises Agrícolas e Ambientais da FCA – UNESP, Botucatu onde foram submetidas à digestão nítrico-perclórica para a obtenção dos extratos e determinação do teor de ferro, conforme metodologia apresentada por Malavolta et al. (1997).

4.2.4 Anatomia da folha

Foram coletadas folhas homobáticas completamente expandidas do terceiro nó, do ápice para a base, do eixo principal da planta. Foram utilizadas quatro

repetições por tratamento. Porções da região mediana foliar foram fixadas em FAA50 (Formaldeído, ácido acético glacial e álcool 50%) por 48 horas (JOHANSEN, 1940), desidratadas em série etanólica e emblocadas em resina metacrilato Leica®. O material incluído foi seccionado em micrótomo rotativo semiautomático Leica RM2145, obtendo secções transversais de 5µm de espessuras e coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'BRIEN et al., 1964) e as lâminas permanentes foram montadas com Entellan®. O laminário foi analisado ao microscópio de luz Olympus BX41 e documentados com câmera digital acoplada C7070, e as imagens analisadas em software ImageJ.

Foram analisadas as seguintes características do limbo foliar: espessura da epiderme da face adaxial e abaxial, espessura do mesofilo, espessuras dos parênquimas paliçádico e esponjoso, área ocupada pelos espaços intercelulares no mesofilo, densidade de venação no mesofilo, número de elementos condutores na nervura principal e densidade estomática.

4.2.5 Densidade estomática (nº de estômatos por mm²)

O estudo de densidade estomática (nº de estômatos por mm²) foi realizado conforme Mazumdar et al. (1969). Foram confeccionadas lâminas por meio do método da impressão da epiderme com cola instantânea. Os dados quantitativos da face abaxial da epiderme foram obtidos com auxílio do software ImageJ.

4.2.6 Delineamento experimental

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, ou seja, constituindo diferentes tratamentos com concentrações de ferro iguais a 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ e duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%).

4.2.7 Análise estatística

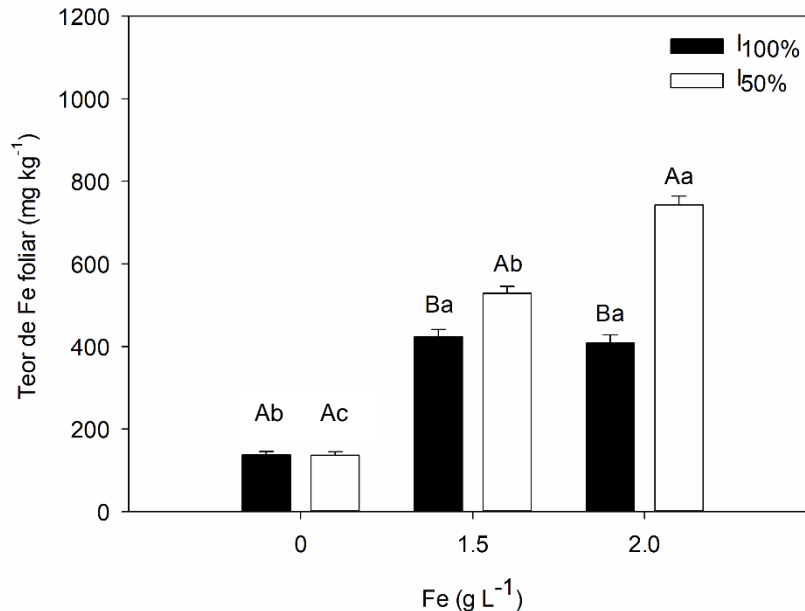
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo suas médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da aplicação de Fe e da intensidade da radiação solar no teor de ferro

Os teores de ferro (Fe) expressos em mg kg^{-1} das folhas de *M. piperita* aumentaram de acordo com a concentração de Fe aplicada, destacando-se a condição de ambiente sombreado, cuja a média desse elemento, foram iguais a 136,176; 528,706 e 742,647 mg kg^{-1} , respectivamente, com as seguintes concentrações 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L^{-1} . Nesta condição, os teores de Fe nas folhas foram superiores, aproximadamente, a 4 e 5 vezes, respectivamente, com aplicação de 1,5 e 2 g L^{-1} de Fe, em comparação as plantas sem pulverização. Em condição de cultivo com maior intensidade de luz, os valores médios para o elemento foram iguais a, 137,029; 423,470 e 407,823 mg kg^{-1} , respectivamente, com 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe aplicado (Figura 1).

Figura 1 - Teor de ferro foliar, em mg kg^{-1} , em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação das concentrações de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$) e minúsculas com Fe, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)



Esses valores elevados de Fe em condição de ambiente sombreado podem ser justificados, pois nessa condição, o metabolismo das plantas é menor, inclusive a fixação e o uso de CO_2 (Figura 1).

Os teores médios de Fe nas folhas com aplicação das maiores concentrações desse elemento, indicam que essas concentrações se encontram acima da ideal (Figura 1). A concentração ideal desse elemento nos tecidos vegetais, varia normalmente entre 50 e 250 mg kg^{-1} da matéria seca (FAQUIN, 2005). Geralmente, teores menores de 50 mg kg^{-1} indicam problemas de deficiência desse nutriente. Em condição de solo as concentrações de Fe^{2+} na solução capazes de afetar a produção de arroz variam de 10 a $>2000 \text{ mg L}^{-1}$ (BECKER; ASCH, 2005). Souza et al. (1999) verificaram em várias espécies de plantas daninhas valores do referido nutriente que vão de 762 a 3,416 mg kg^{-1} . A concentração de Fe que mais se aproximou da realidade desse relato foi de 2,0 g L^{-1} , sobretudo, em condição de ambiente sombreado. Nesta condição, o teor de Fe nas folhas foi igual a 742 mg kg^{-1} de massa seca (Figura 1).

Deve-se destacar que os níveis de toxicidade variam de espécie para espécie e podem ser atingidos em concentrações de Fe relativamente baixas, dependendo de

uma combinação de fatores relativos às plantas e ao meio (SAHRAWAT, 2004; AUDEBERT; FOFANA, 2009).

4.3.2 Efeito da aplicação de Fe e da intensidade da radiação solar em aspectos anatômicos

O limbo foliar da *M. piperita* apresenta epiderme unisseriada revestida por cutícula delgada, os estômatos ocorrem em ambas as faces da epiderme, predominantemente na face abaxial (anfi-hipoestomática) e estão dispostos geralmente no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 2 A, C, E; Figura 3 A, C, E).

O mesofilo foliar é dorsiventral composto por uma camada de parênquima paliçádico e por três camadas de parênquima esponjoso (Figura 2 A, C, E; Figura 3 A, C, E). Pequenos feixes vasculares foram observados no mesofilo (Figura 2 A, C, E; Figura 3 A, C, E) e na região da nervura principal foram contados o número de elementos de vasos (Figura 2 B, D, F; Figura 3 B, D, F).

Figura 2 - Secção transversal de limbo foliar (A, C, E) e nervuras principais (B, D, F) de *M. piperita* em condição de $I_{100\%}$, aos 35 dias após à aplicação de 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe. A-B Controle. C-D. 1,5 g L⁻¹ Fe. E-F. 2,0 g L⁻¹ de Fe. AD = face adaxial, AB = face abaxial, PP = parênquima paliçádico, PE = parênquima esponjoso, ES = estômato, FV = feixe vascular, XI= xilema
Barras: A-F= 50 μ m

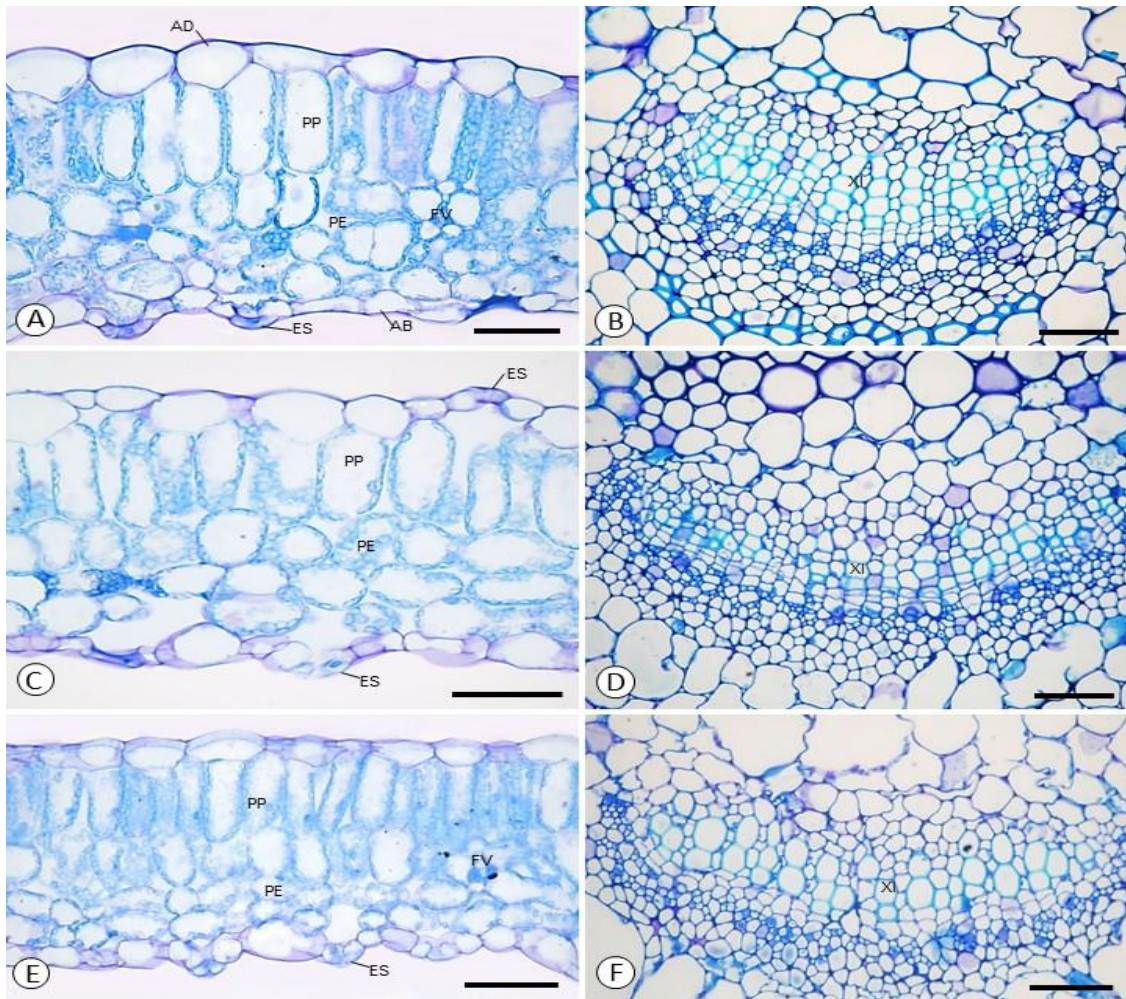
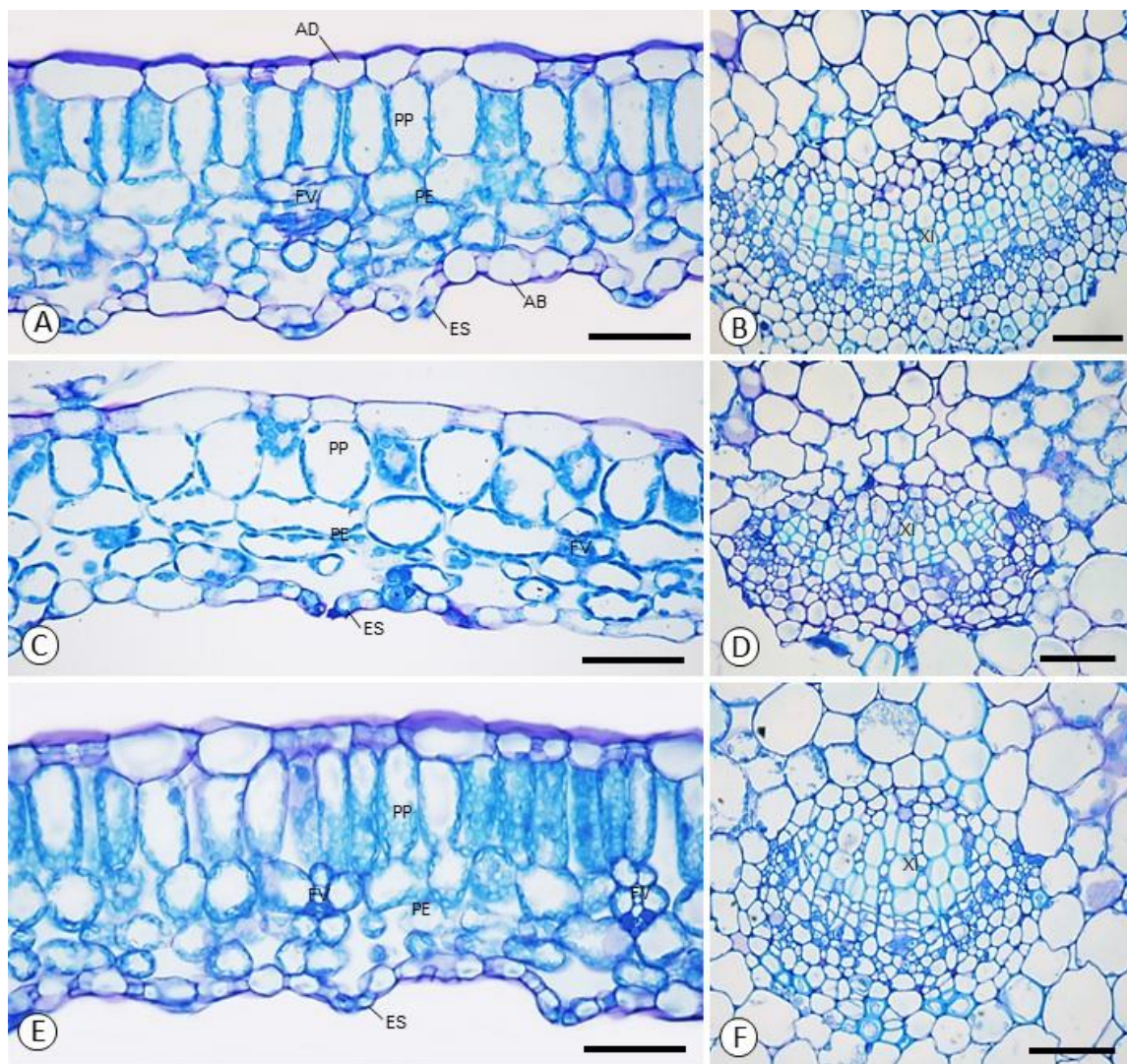


Figura 3 - Secção transversal de limbo foliar (A, C, E) e nervuras principais (B, D, F) de *M. piperita* em condição I_{50%}, aos 35 dias após à aplicação de 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe. A-B. Controle. C-D. 1,5 g L⁻¹ Fe. E-F. 2,0 g L⁻¹ Fe. AD = face adaxial, AB= face abaxial, PP = parênquima paliçádico, PE = parênquima esponjoso, ES = estômato, FV = feixe vascular, XI= xilema. Barras: A-F= 50 μm



Espessura da epiderme adaxial (μm), espessura da epiderme abaxial (μm), espessura parênquima paliçádico (μm) e número de elementos condutores na nervura principal (unid.)

Os resultados de espessuras das epidermes adaxial e abaxial de folhas de *M. piperita* demonstraram que não houve alterações pela aplicação dos tratamentos com Fe. No entanto, a aplicação de Fe causa redução do número de elementos condutores na nervura principal e 1,5 g L⁻¹ de Fe eleva a espessura do parênquima paliçádico (Tabela 1). Considerando sua função de filtragem, o aumento no número de células poderia ser uma medida adaptativa para diminuir a translocação de metal para o parênquima clorofiliano, evitando possíveis danos ao sistema primário de fixação de CO₂ (GOMES et al., 2011). De acordo com Sandalio et al. (2001), os metais pesados podem reduzir o tamanho e o número de vasos de xilema e, ainda, alterar o balanço de hormônios vegetais, que estão intimamente relacionados à morfogênese dos tecidos. Essa redução do número de elementos condutores pode representar menor condutividade hidráulica no xilema e, portanto, menos Fe alcançando a área fotossintética, por exemplo, quando o Fe é aplicado no solo.

Tabela 1 - Espessura da epiderme adaxial (EEAD) (μm), espessura da epiderme abaxial (EEAB) (μm), espessura parênquima paliçádico (EPP) (μm) e número de elementos condutores na nervura principal (NECNP) (Unid.), em plantas de *M. piperita* submetidas aos seguintes tratamentos: 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação de Fe. Valores representam médias \pm desvio padrão de 4 repetições

Fe (g L ⁻¹)	EEAD (μm)	EEAB (μm)	EPP (μm)	NECNP (Unid.)
0,0	49,52a \pm 2,28	29,74a \pm 0,76	106,73b \pm 5,55	861,62a \pm 59,64
1,5	53,54a \pm 2,25	35,38a \pm 2,39	126,27a \pm 4,89	574,41b \pm 44,11
2,0	47,15a \pm 2,51	30,30a \pm 1,23	110,80ab \pm 3,89	623,92b \pm 26,74
Irradiância (%)				
I _{100%}	55,69a \pm 2,00	33,64a \pm 1,50	127,61a \pm 2,56	789,442a \pm 35,41
I _{50%}	44,45b \pm 0,66	29,98a \pm 0,37	101,59b \pm 2,68	583,875b \pm 28,59
Significância				
Fe	n.s.	n.s.	<0,001	<0,001
Irradiância	<0,001	n.s.	<0,001	<0,001
Fe X Irradiância	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de significância. n.s. - não significativo.

A condição de irradiância não modificou a espessura da epiderme abaxial, no entanto, a epiderme da face adaxial, em condição de I_{100%}, apresentou maior espessura (Tabela 1). Plantas que crescem sob forte radiação desenvolvem folhas espessas e apresentam um metabolismo mais ativo, o que proporciona maior produção de matéria seca com maior conteúdo energético (BENINCASA, 2003; LARCHER, 2004). Os resultados de redução na espessura do parênquima paliçádico das folhas de plantas I_{50%} deve-se, possivelmente, à diferença na distribuição e no consumo de fotoassimilados para a expansão foliar (Tabela 1). Isso implica na redução do tamanho e/ou número de suas células, que também pode contribuir na maior área foliar específica de plantas de *M. piperita*.

O parênquima paliçádico está intimamente relacionado com a fotossíntese e um maior desenvolvimento desse tecido pode permitir maior fixação de CO₂ com abertura dos estômatos em curto espaço de tempo (CASTRO et al., 2009), refletindo na eficiência do uso da água, pois reduz a transpiração. Assim, é vantajoso para a folha minimizar a resistência à difusão de CO₂. Nas folhas sob sombreamento (I_{50%}),

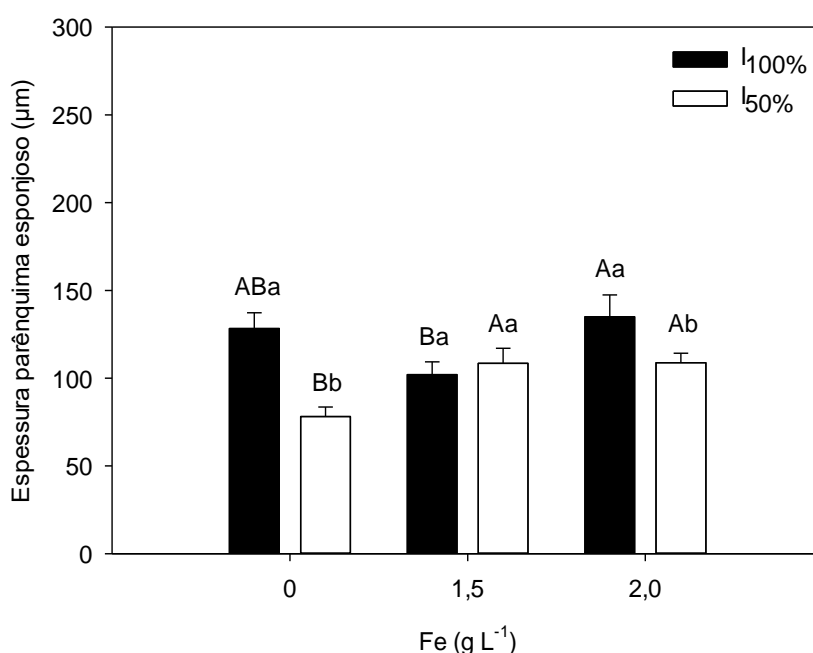
características como a menor espessura do parênquima paliádico, o menor número e/ou tamanho das células, bem como, a maior proporção de espaços intercelulares (Tabela 1; Figura 6), podem representar uma tentativa de reduzir a resistência à difusão de gases (CO_2) no interior da folha, buscando aumentar sua eficiência fotossintética (GOBBI et al., 2011; WU et al., 2016).

Em média, as diferenças na anatomia da folha sob diferentes tratamentos de intensidade de luz, sugerem que os componentes estruturais da folha são os principais alvos e, ao fazer ajustes na anatomia da folha, as plantas podem ter um melhor desempenho sob condições por limitação de luz (FENG et al., 2019) ou toxicidade pelo ferro.

Espessura do parênquima esponjoso (μm)

Houve interação entre a concentração de Fe aplicada e as condições de irradiância para espessura do parênquima esponjoso (EPL). Aplicação de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Fe em condição $I_{100\%}$ reduz a EPL, em comparação, a $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe, em condição $I_{50\%}$ a aplicação de Fe eleva a EPL (Figura 4). De maneira geral, plantas com parênquima esponjoso mais espesso, proporcionam fotossíntese mais rápida pelo fato de potencialmente armazenarem o CO_2 nesse parênquima (CASTRO et al., 2009). Fato observado no presente estudo, destacando a condição de pleno sol ($I_{100\%}$) (Figura 4) e em estudos realizados por Fan et al. (2018).

Figura 4 - Espessura parênquima esponjoso, em μm , em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com Fe e letras minúsculas entre irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$), pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

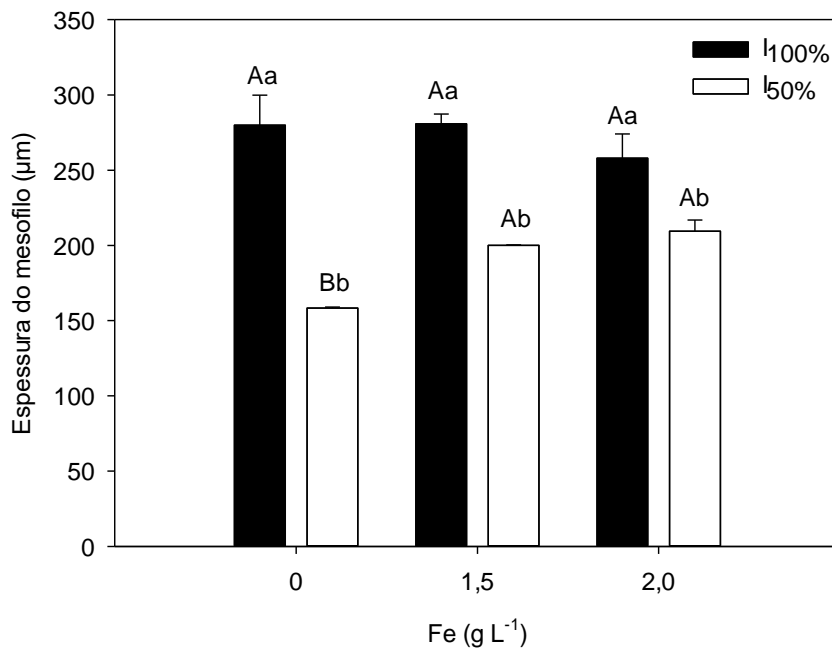


O aumento na espessura da folha pode estar ligado ao aumento da área do mesofílico, resultando em folhas com maiores espaços intercelulares e arranjo frouxo das células, em contrapartida, em condição de $I_{50\%}$, os tecidos paliçádicos e esponjosos diminuem, possivelmente devido ao crescimento celular reduzido e menor número de camadas celulares em tecidos paliçádicos em baixa irradiância (Tabela 1; Figuras 4). Gobbi et al. (2011) não verificaram alteração na espessura total das folhas em amendoim-forrageiro, enquanto, que a espessura do parênquima paliçádico reduziu linearmente com o sombreamento crescente. Por outro lado, a espessura do parênquima esponjoso não foi alterada pelos tratamentos.

Espessura do mesofilo (μm)

Plantas quando pulverizadas com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe e em condição de $I_{100\%}$, apresentaram maiores valores de espessura do mesofilo em comparação àquelas em condição de menor irradiância ($I_{50\%}$) (Figura 5). Plantas adaptadas a maior irradiância, geralmente, apresentam folhas mais espessas, ou seja, com mais camadas de células no mesófilo (CORRÊA, 2004).

Figura 5 - Espessura do mesofilo, em μm , em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 1,5 e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com Fe e letras minúsculas entre irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$), pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)



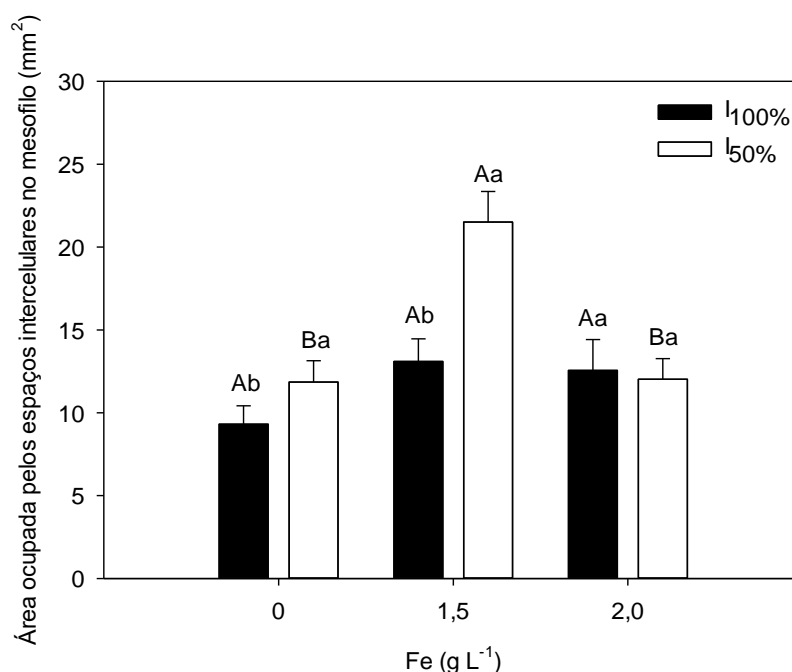
De maneira geral, a condição de $I_{100\%}$, proporciona as plantas maiores espessura do mesofilo (Figura 5). Essas características em condição de pleno sol visam minimizar o aquecimento foliar com o aumento da espessura dos parênquimas clorofilianos a fim de que haja absorção, canalização e dispersão da luz, não

prejudicando as atividades foliares, por isso, a espessura do mesofilo foliar é maior em plantas cultivadas à pleno sol (ARAÚJO et al., 2009; MARTINS et al., 2009).

Área ocupada pelos espaços intercelulares no mesofilo (mm²)

Apesar do aumento na proporção de espaços intercelulares nas folhas de plantas de *M. piperita*, a área ocupada pelos espaços foi afetada significativamente pela redução dos níveis de irradiância e na presença de 1,5 g L⁻¹ de Fe (Figura 6). Deve-se registrar que, o aumento na proporção de espaços intercelulares intensifica a absorção da luz e casualiza sua direção, melhorando sua captação pelos cloroplastos (IVANOVA; P'YANKOV, 2002), como observado em condição de ambiente com I_{50%} (Figura 6).

Figura 6 - Área ocupada pelos espaços intercelulares no mesofilo, em mm², em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe e sob duas condições de irradiância, I_{100%} (pleno sol) e I_{50%} (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com Fe e letras minúsculas entre irradiância (I_{100%} e I_{50%}), pelo teste de Tukey (P < 0,05)



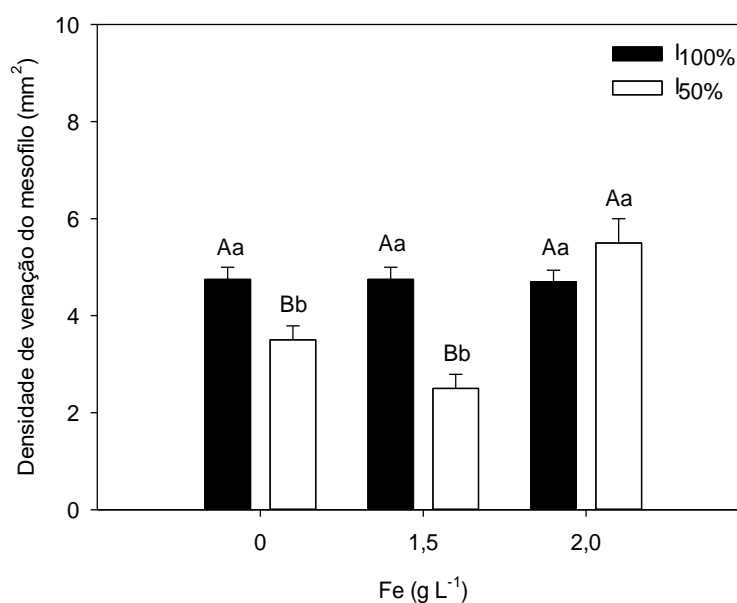
Além disso, esta característica confere menor razão de massa foliar por unidade de área e fração maior de massa foliar por planta; ao passo que, em alta irradiância, as folhas possuem áreas menores e são mais espessas (VALLADARES; NIINEMETS, 2008), como verificado nas espessuras dos parênquimas das plantas de *M. piperita* (Figura 4; Tabela 1).

Outros estudos com diferentes espécies confirmam a maior proporção de espaços intercelulares nas folhas sombreadas (PAIVA; GUIMARÃES, 2001; MORAIS et al., 2004; LIMA JUNIOR et al., 2006), possivelmente devido o aumento na proporção de espaços intercelulares facilitar a absorção da luz e casualiza sua direção, melhorando sua captação pelos cloroplastos (IVANOVA; P'YANKOV, 2002). Apesar disso, deve-se destacar que o aumento na proporção de espaços intercelulares em folhas e a área ocupada pelos diferentes tecidos, pode não ser afetada pelo incremento nos níveis de sombreamento (GOBBI et al., 2011). Por exemplo, plantas que ocorrem em ambientes ensolarados, geralmente, possuem folhas mais espessas e menor proporção de espaços intercelulares, quando comparadas as desenvolvidas em ambientes sombreados (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2014).

Densidade de venação do mesofilo (mm²)

Houve interação entre a concentração de Fe aplicada e as condições de irradiância para densidade de venação do mesofilo, no entanto, a aplicação de Fe em condição de I_{100%} não modifica a densidade de venação do mesofilo, enquanto, em condição de I_{50%} a maior concentração de Fe eleva a densidade de venação do mesofilo (Figura 7).

Figura 7 - Densidade de venação do mesofilo, em mm^2 , em plantas de *M. piperita* submetidas aos tratamentos com 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L^{-1} de Fe e sob duas condições de irradiância, $I_{100\%}$ (pleno sol) e $I_{50\%}$ (irradiância 50%), aos 35 dias após à aplicação de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com Fe e letras minúsculas entre irradiância ($I_{100\%}$ e $I_{50\%}$), pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

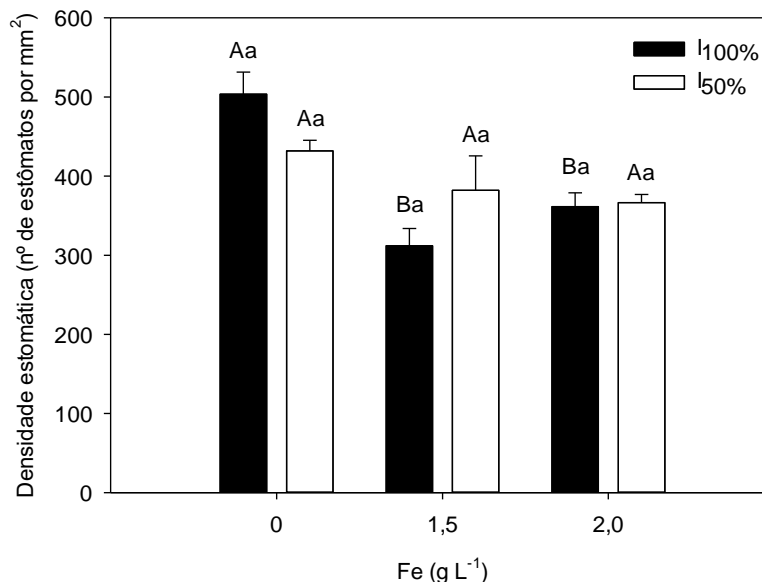


De maneira geral, ambientes com maior irradiância eleva a densidade de venação do mesofilo (Figura 7). A densidade de venação do mesofilo determina sua capacidade e eficiência para fornecer água para as células foliares (MCKOWN et al., 2010; BRODRIBB; JORDAN, 2011). Dessa forma, a densidade de venação afeta diretamente o abastecimento de água da planta, que, por sua vez, está intimamente relacionada à atividade fisiológica (SACK; FROLE, 2006; BRODRIBB et al., 2007), sendo, portanto, determinantes do potencial fotossintético. Oliveira et al. (2016) não verificaram alteração anatômica em resposta a mudanças na quantidade e qualidade de energia luminosa em plantas de *Melissa officinalis*.

Densidade estomática (nº de estômatos por mm²)

Plantas que receberam aplicação de Fe apresentam redução na densidade de estômatos, em condição de I_{100%}, enquanto, que em condição de I_{50%} não houve diferença entre plantas pulverizadas e não pulverizadas com Fe (Figura 8). O aumento da densidade estomática pode ser uma alternativa ao fornecimento adequado de CO₂ para a fotossíntese. Dessa forma, em condição de I_{100%}, a aplicação com concentrações mais elevadas de Fe pode prejudicar o aparato fotossintético e o desempenho produtivo das plantas. Enquanto, que em condição de I_{50%}, atua minimizando possível dano decorrente à toxicidade dos metais pesados, o que, pode explicar em parte aumento de acúmulo de íons metálicos (MELO et al., 2007), inclusive em folhas de *M. piperita* (Figura 1).

Figura 8 - Densidade estomática, nº estômatos/mm², em plantas de *M. piperita* submetidas aos seguintes tratamentos: 0 (controle), 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Fe, aos 35 dias após à aplicação de Fe. Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos com Fe e letras minúsculas entre irradiância (I_{100%} e I_{50%}), pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)



Houve influência dos diferentes níveis de irradiância na densidade de estômatos na face abaxial da epiderme, com média 392,38 mm² de estômatos em

I_{100%}, enquanto, nas folhas de plantas mantidas em condição de I_{50%}, a média é de 393,57 estômatos/mm² (Figura 8). Gregoriou et al. (2007) verificaram que folhas sombreadas aumentam a área foliar, mas diminuem a espessura e a densidade estomática em *Olea europaea*. Esses autores observaram ainda que a espessura dos tecidos da lâmina foliar foi maior com o aumento da intensidade luminosa. Aragão et al. (2014) verificaram que não houve efeito significativo do nível de luminosidade na densidade estomática de plantas jovens de *Carapa guianensis*.

4.4 CONCLUSÕES

Folhas de plantas de *Mentha piperita* pulverizadas com ferro apresentam modificação de espessura do mesofilo foliar e do parênquima paliçádico, bem como da densidade de veneção do mesofilo foliar. A área ocupada pelos espaços intercelulares no mesofilo apresenta modificação pela presença de ferro e pela diminuição do nível de luminosidade (I_{50%}). De maneira em geral, I_{100%} favorece os aspectos anatômicos avaliados de *M. piperita*.

REFERÊNCIAS

- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p.1720-1731, 2011.
- ARAGÃO, D. S.; LUNZ, A. M. P.; OLIVEIRA, L. C.; RAPOSO, A.; JUNIOR, P. C. P. F. Efeito do sombreamento na anatomia foliar de plantas jovens de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.4, p.631-639, 2014.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, p. 463-472, 2009.
- AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice Yield Gap due to Iron Toxicity in West Africa. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 195, p. 66–76, 2009.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron Toxicity in Rice - Conditions and Management Concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: Fundação Nacional de Ensino e Pesquisa, 2003. 41p.
- BRIAT, J. F. Iron dynamics in plants. In *Advances in Botanical Research. Incorporating Advances in Plant Pathology*. Eds. JC Kader and M Delseny. **Academic Press**, v. 46, n. 399, 138-169, 2007.
- BRODRIBB T.J.; FEILD T.S.; JORDAN G.J. Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. – **Plant Physiol.**, v. 144, p. 1890-1898, 2007.
- BRODRIBB, T.J.; JORDAN G.J. Water supply and demand remain balanced during leaf acclimation of *Nothofagus cunninghamii* trees. – **New Phytol.**, v. 192, p. 437-448, 2011.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: Estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. CLARK, R. B. Effect of light and water stress on mineral element composition of plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 853-885, 1981.
- CONNORTON, J. M.; BALK, J.; RODRÍGUEZ-CELMA, J. Iron homeostasis in plants – a brief overview. **Metallomics**, v. 9, n. 813-823, 2017.
- CORRÊA, I. J. **Plasticidade fenotípica em indivíduos jovens de *Aloysia virgata* (Ruiz et Pav.) A. L. Juss - Verbenaceae**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/2067/DissIPC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 4 nov. 2020.

- COSTA, A.G.; CHAGAS, J.H.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, p. 534-540, 2012.
- CRAVEN, D.; GULAMHUSSEIN, S.; BERLYN, G. P. Physiological and anatomical responses of *Acacia koa* (Gray) seedlings to varying light and drought conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 205-213, 2010.
- CUNNINGHAM, R. K., NIELSEN, K. F. Cation-anion relationships in crop nutrition. V. The effects of soil temperature, light intensity and soil-water tension. **The Journal of Agricultura Science**, v. 64, p. 379-386, 1965.
- DENG, Y.; LI, C.; SHAO, Q.; YE, X.; SHE, J. Differential responses of double petal and multi petal jasmine to shading: I. Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure. **Plant Physiology & Biochemistry**, v. 55, p. 93-102, 2012.
- EL-DESOUKEY, H.; S.; ABD-EL-DAYEM, H.M; ISLAM, R.K; HARKER,T.; GAO, G.; BERGEFURD, B.; ISMAIL, FATEN, H.; MADY, M. A. Effects of nano, chelated and conventional iron as soil addition on growth, anatomy and early yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L). 4th International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture (ICBAA), Benha University, **Moshtohor and Hurghada**, v. 4-7, 2018.
- EL-EMARY, F. A.; ABD EL-AAL, M. M. .; ABD EL-DAYEM, H. M. .; ISMAEIL, FATEN H. M.; ABOU-SHLELL, M. K. Morphophysiological and anatomical studies on moringa (*Moringa oliefera* L.). **Plant Archives**, v. 18, n. 2, p. 1421-1442, 2018.
- FAN, Y.; CHEN, J.; CHENG, Y.; RAZA, M. A.; WU, X.; WANG, Z.; LIU, Q.; WANG, R.; WANG, X.; YONG, T.; LIU, W.; LIU, J.; DU, J.; SHU, K.; YANG, W.; YANG, F.. Effect of shading and light recovery on the growth, leaf structure, and photosynthetic performance of soybean in a maize-soybean relay-strip intercropping system. **PLOS ONE**, 2018
- FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**/Valdemar Faquin. -- Lavras: UFLA / FAEPE. Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente, 2005.
- FENG, L.; RAZA, M.A.; LI, Z.; CHEN, Y.; KHALID, M.H.B.; DU, J.; LIU, W.; WU, X.; SONG, C.; YU, L.; ZHANG, Z.; YUAN, S.; YANG, W.; YANG, F. The Influence of Light Intensity and Leaf Movement on Photosynthesis Characteristics and Carbon Balance of Soybean. **Front. Plant Sci.**, v. 9, p. 1952, 2019.
- GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; VENTRELLA, M. C.; NETO, A. F.G.; ROCHA, G. C. Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.7, p.1436-1444, 2011.
- GOMES, M. P.; SÁ, T. C. L. L.; MARQUES, M.; NOGUEIRA, M. O. G.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and

accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Sci. Agric.**, v.68, n.5, p.566-573, 2011.

GONÇALVES, F. C. M.; PARREIRAS, N. S.; CAMPOS, F. G.; MANTOAN, L. P. B.; BOARO, C. S. F. Exogenous salicylic acid modifies gas exchange and biomass production of *Mentha x piperita* L. **Australian Journal of Crop Science-AJCS**, Austrália, v. 14, n. 01, p. 98-107, 2020.

GONDIM, A. R. O.; PUIATTI, M.; VENTRELLA, M. C.; CECON, P.R. Plasticidade anatômica da folha de taro cultivado sob diferentes condições de sombreamento. **Bragantia**, São Paulo, v. 67, p.1037-1045, 2008.

GRATANI, L.; COVONE, F.; LARCHER, W. Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. **Trees**, v.20, n.5, p.549-558, 2006.

GREGORIOU, K.; PONTIKIS, K.; VEMMOS, S. Effects of reduced irradiance on leaf morphology, photosynthetic capacity, and fruit yield in olive (*Olea europaea* L.). **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 172-181, 2007.

IVANOVA, L.A.; P'YANKOV, V.I. Structural adaptations of the leaf mesophyll to shading. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.49, n.3, p.419-431, 2002.

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

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KIRCHNER, R.; SOARES, A.B.; SARTOR, L.R.; ADAMI, P.F.; MIGLIORINI, F.; FONSECA, L. Desempenho de forrageiras hibernais sob distintos níveis de luminosidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.2371-2379, 2010.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, SP: RiMa, 2004. 531p.

LIMA JUNIOR, E.C.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M. et al. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.33-41, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed., rev. e atual., Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p.

MARCH, R. H.; CLARK, L. G. Sun-shade variation in bamboo (Poaceae: Bambusoideae) leaves. **Telopea**, v. 13, n. 1-2, p. 93-104, 2011.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SILVA, A. P. O.; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 82-87, 2009.

- MAZUMDAR, R. K.; CHAKIDER, B. P.; MUKHERJEE, S.K. Selection and classification of mango root stocks in the nursery stage. **Acta Horticulturae**, v. 24, p. 101-106, 1969.
- MCKOWN A.D.; COCHARD, H.; SACK, L. Decoding leaf hydraulics with a spatially explicit model: principles of venation architecture and implications for its evolution. – **Am. Nat.**, v. 175, p. 447- 460, 2010.
- MELO, H.C.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A.; ALVES, J.D. Anatomical and physiological alterations in *Setaria anceps* Stapf ex Massey and *Paspalum paniculatum* L. under water deficit conditions. **Hoehnea**, v. 34, p. 145-153, 2007.
- MÜLLER, C.; KUKI, K, N.; PINHEIRO, D.T.; SOUZA, L.R.S.; SILVA, A.I.S.; LOUREIRO, M.E.; OLIVA, M.A.; ALMEIDA, A.M. Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant and Soil**, v. 391, p. 123-138, 2015.
- MURPHY, M.R.C.; JORDAN, G.J.; BRODRIBB, T.J. Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. **Plant, Cell & Environment**, v.35, p.1407-1418, 2012.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, Mi E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, G. C.; VIEIRA, W. L.; BERTOLLI, S.C.; PACHECO, A. C. Photosynthetic behavior, growth and essential oil production of *Melissa officinalis* L. cultivated under colored shade nets. **Chileno J. Agric. Res.**, v. 76, n.1, 2016
- POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; AGNALDO, W. C. A.; CHAVES, R.M.; DAMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1052-1060, 2010.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; NARDIN, C. F.; FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T. Caracterização da anatomia foliar de cafeeiros arábica em diferentes períodos sazonais. **Biotemas**, v. 27, n. 4, p. 1-10, 2014.
- ROSSATO, D. R.; KOLB, R. M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. **Acta bot. bras.**, v. 24, n. 3, p. 605-612, 2010.
- ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S.; SENGUPTA, D.N. Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. **Acta Physiol. Plant.**, v. 34, n. 3, p. 835–847, 2012.
- SABBI, L. B. C.; ÂNGELO, A. C.; BOEGER, M. R. Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão, nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil. **IHERINGIA, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v.65, n. 2, p. 171-181, 2010.

SACK, L.; HOLBROOK, N.M. Leaf hydraulics. **Annu Rev Plant Biol.**, v. 57, p. 361–381, 2006.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**, v. 27, p. 1471-1504, 2004.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMES, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2115- 2126, 2001.

SANTANA, B.V.N.; ARAÚJO, T.O.; ANDRADE, G.C.; FREITAS-SILVA, L.F.; KUKI, K.N.; PEREIRA, E.G.; AZEVEDO, A.A.; SILVA, L.C. Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, p. 2550–2562, 2014.

SHARMA, I. Arsenic induced oxidative stress in plants. **Biologia**, v. 3, p. 447–453, 2012.

SILVA, A. S.; OLIVEIRA, J. G.; CUNHA, M.; VITÓRIA, A. P. Photosynthetic performance and anatomical adaptations in *Byrsonima sericea* DC. under contrasting light conditions in a remnant of the Atlantic Forest. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, n. 4, p. 245-254, 2010.

SINGH, R.; GAUTAM, N.; MISHRA, A.; GUPTA, R. Heavy metal and living systems: an overview. **Ind. J. Pharmacol.**, v. 43, n. 3, p. 246–253, 2011.

SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G. et al. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Sci. Agron.**, v. 34, p. 413– 421, 2012.

SOTIROPOULOS, T.E.; THERIOS, I.N.; DIMASSI, K.N.; BOSBALIDIS, A.; KOFIDIS, G. Nutritional status, growth, CO₂ assimilation and leaf anatomical responses in two kiwi fruit species under boron toxicity. **J. of plant Nutri**, v. 25, n. 6, p. 1249-1261, 2002.

SOUZA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; MARTINS, D. Teores de Macro e Micronutrientes e a Relação C/N de várias espécies de Plantas Daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 17, n. 1, 1999.

SOUZA, G.S.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; PINTO, J.E.B.P.; RESENDE, M.G.; BERTOLUCCI, S.K.V. Crescimento, teor de óleo essencial conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 24, p. 1-1, 2011.

TERASHIMA, I.; HANBA, Y. T.; TAZOE, Y.; VYAS, P.; YANO, S. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 343–354, 2006.

TRIPATHI, D.K.; SINGH, V.P.; KUMAR, D.; CHAUHAN, D.K. Rice seedlings under cadmium stress: effect of silicon on growth, cadmium uptake, oxidative stress, antioxidant capacity and root and leaf structures. **Chem. Ecol.**, v. 28, n. 3, p. 281–291, 2012.

TRIPATHI, D.K.; SINGH, S.; SINGH, S. et al. Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. **Acta Physiol. Plant.** v. 37, n. 7, p. 139, 2015a.

TRIPATHI, D.K.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. et al. Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 96, p. 189–198, 2015b.

VACULÍK, M.; LANDBERG, T.; GREGER, M. et al. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. **Ann. Bot. London.**, v. 110, p. 433–443, 2012.

VALLADARES, F.; NIINEMETS, U. Shade Tolerance, a Key Plant Feature of Complex Nature and Consequences. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 39, n. 1, p. 237–257, 2008.

WU, Y.; GONG, W.; YANG, F.; WANG, X.; YONG, T.; YANG, W. Responses to shade and subsequent recovery of soya bean in maize-soya bean relay strip intercropping. **Plant Prod. Sci.**, v. 15, p. 1–9, 2016.

YOU-QIANG, F.; HONG, S.; DAO-MING, W.; KUN-ZHEN, C. Silicon-Mediated Amelioration of Fe²⁺ Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots. **Pedosphere**, v. 22, p. 795–802, 2012.

ZEHTAB-SALMASI, S.; HEIDARI, F.; ALYARI, H. Effect of micronutrients and plant density on biomass and essential oil production of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Plant Sci. Res.**, v.1, n. 1, p. 24-28, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em curto intervalo de tempo, a maior sensibilidade as maiores concentrações de ferro são causadas pelo comprometimento da fotossíntese, como a concentração interna de CO₂ e eficiência de uso de água, e, não por limitação da condutância estomática, mas desencadeada por dano oxidativo e sua consequente incapacidade de extinguir o excesso de energia entre os fotossistemas, como revelado pelo aumento dos valores do coeficiente de dissipação fotoquímica (qP) e diminuição do quenching não fotoquímico. A condição de I_{50%} eleva os valores de clorofilas, carotenoides, concentração interna de CO₂ e transpiração, fluorescência mínima da folha adaptada ao claro (F_o'), fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (F_m) e ao claro (F_m'), eficiência quântica da antena (F_v'/F_m'), fluorescência variável adaptada ao claro (F_v') e ao escuro (F_v) e taxa de transporte de elétrons (ETR). A condição em pleno sol (I_{100%}), eleva a fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (F_o) e ETR. Na dependência da concentração e da intensidade da radiação solar, aplicações baixas de ferro modifica positivamente a produção de pigmentos (clorofila *b*) e fixação e uso de CO₂ de plantas de *Mentha piperita*, incrementando o rendimento em biomassa e melhorando o aparato fotossintético, enquanto, concentrações mais elevadas tendem a reduzir a concentração interna de CO₂, bem como a eficiência de uso de água, além de afetar o sistema de eficiência fotoquímica (F_v'/F_m' e qP) refletindo negativamente na produção de biomassa.

Em geral, aplicações com Fe, em ambas condições de irradiância, atua positivamente na rota de biossíntese dos açúcares. Aplicações de Fe eleva ainda atuação de enzimas de defesa do sistema antioxidante, como a atividade da peroxidase, correlacionando inclusive com os valores de malonaldeído (MDA), apesar de não alterar a produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo, de maneira geral, plantas de *M. piperita* em ambas as condições de irradiância.

Sugere-se ainda a existência de participação conjunta de atividades da peroxidase e superóxido dismutase em minimizar possíveis danos de peroxidação lipídica (MDA), sobretudo, com a aplicação de concentrações mais elevadas de Fe, demonstrando ser um importante componente do sistema enzimático de combate ao estresse oxidativo em *M. piperita*.

Aplicações de Fe tende a reduzir os valores de carotenoides e de antocianinas, no entanto, concentrações menores de Fe proporciona acúmulo de compostos fenólicos em folhas de *M. piperita*, sobretudo, em condição de maior incidência luminosa, porém, não estão de acordo com os valores de flavonoides, correlacionando discretamente com a capacidade antioxidante pelos métodos frente ao radical livre (DPPH) e pelo poder antioxidante de ferro (FRAP).

Os teores de Fe de folhas de *M. piperita* aumentam de acordo com a concentração de Fe aplicada, sobretudo, em condição de I_{50%}. A aplicação de Fe não modifica espessuras das epidermes adaxial e abaxial. No entanto, plantas pulverização com 1,5 g L⁻¹ de Fe sob condição de I_{50%}, apresentam elevação de espessura do mesófilo foliar. A aplicação de 2,0 g L⁻¹ de Fe em condição de I_{50%} eleva a densidade de veneção do mesófilo. A área ocupada pelos espaços no mesofilo foi afetada significativamente na presença de 1,5 g L⁻¹ de Fe e pela diminuição dos níveis de luminosidade (I_{50%}). A aplicação com Fe, causa ainda diminuição do número de elementos condutores da nervura principal.

A condição de maior irradiância (I_{100%}), altera consideravelmente a alocação de biomassa, permitindo maior produção de massas secas da parte aérea, caule e raízes, em resposta a maior eficiência de assimilação e uso de CO₂ e da elevação da taxa de transporte de elétrons. Em condição de I_{50%} as plantas de *M. piperita* investem mais em complexos coletores de luz e elevam os valores de F_o' , F_m , F_m' , F_v'/F_m' e de F_v' . As diferentes condições de irradiância, altera a espessura da epiderme da face adaxial, destacando a condição com maior nível de irradiância, inclusive espessuras dos parênquimas paliádico e esponjoso, correlacionando em parte com a espessura do mesofilo. Essa condição (I_{100%}) favorece ainda o número de elementos condutores na nervura principal.

REFERÊNCIAS

- ABOUTALEBI, A. Effects of nitrogen and iron on Sweet lime (*Citrus limmetta*) fruit quantity and quality in calcareous. **Journal of Novel Applied Sciences**, v. 2, n. 8, p. 211-213, 2013.
- ADDOR, R. W. Inseticida. In: GODFREY, C.R.A. (Ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker, 1994.
- AFLATUNI, A. **The yield and essential oil content of mint (Mentha ssp.) in Northern Ostrobothnia**. University Press, Finland, 52 p. 2005.
- ALEXANDRE, J. R. et al. Zinco e ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo. **Natureza on Line**, Santa Teresa, v. 10, n.1, p. 23-28, 2012.
- ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; LIMA JUNIOR, E. C.; MAGALHÃES, M. M. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, v.27, p.53-57, 2005.
- ARUMUGAM, G.; SWAMY, M. K.; SINNIAH, U. R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. **Molecules**, v. 21, n. 369, 2016.
- AUDEBERT, A.; FOFANA, M. Rice yield gap due to iron toxicity in West Africa. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, p. 66–76, 2009.
- AUNG, M.S.; MASUDA, H.; KOBAYASHI, T.; NISLIIZAWA, N. K. Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues. **Soil Sei Plant Nutr.**, 2018.
- BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; SHIMO, H.; KAKEI, Y.; SENOURA, T.; TAKAHASHI, R. Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role insolubilizing apoplasmic iron. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 57, p. 803-812, 2011.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, n.4, p.558-573, 2005.
- BEHN, H.; ALBERT, A.; MARX, F.; NOGA, G.; ULBRICH, A. Ultraviolet. B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.7361-7367, 2010.
- BENITEZ, L.B.; SILVA, C. M.; L.; ALVARES, C. Utilização da hortelã-pimenta como agente no controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). **Scientia Plena**, Sergipe, v. 12, n. 126201, 2016.
- BRIAT, J. F.; RAVET, K. ARNAUD, N; DUC, C.; BOUCHEREZ, J.; TOURAINE, B.; CELLIER, F.; GAYMARD, F. New insights into ferritin synthesis and function highlight

a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 811-822, 2010.

BRIAT, J.F.; DUBOS, C.; GAYMARD, F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. **Trends Plant Sci.**, v. 20, p. 33-40, 2015.

BOULY, J. P.; SCHLEICHER, E.; DIONISIO-SESE, M, et al. Cryptochrome blue-light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. **Journal of Biological Chemistry**, 2007.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARSCHNER, P., ed. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3.ed. London, Academic Press Elsevier, p. 191-248, 2012.

CHEN, L.; DING, C.; ZHAO, X.; XU, JUNXU.; MOHAMMAD, A. A.; WANG, S.; DING, Y. Differential regulation of proteins in rice (*Oryza saliva* L.) under iron deficiency. **Plan Cell Reports**, v. 34, n. 1 p. 83-96, 2015.

COSTA, A. G. CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 4, p. 534-540, 2012.

CURIE, C.; BRIAT, J.-B. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 183–206, 2003.

DALCORSO, G.; MANARA, A.; PIASENTIN, S.; FURINI, A. Nutrient metal elements in plants. **Metallomics**, v. 6, p. 1770–1788, 2014.

DAR, R. A.; SHAHNAWAZ, M.; QAZI, P. H. General overview of medicinal plants: A review. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 6, n. 6, p. 349-351, 2017.

DEHSHEIKH, A. B.; SOURESTANI, M. M.; DEHSHEIKH, P. B.; VITALINI, S.; IRITI, M.; MOTTAGHIPISHEH, J. A Comparative Study of Essential Oil Constituents and Phenolic Compounds of Arabian Lilac (*Vitex trifolia* var. *Purpurea*): An Evidence of Season Effects. **Foods**, v. 8, p. 52, 2019.

DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 9-17, 2014.

FOURCROY, P.; SISÓ-TERRAZA, P.; SUDRE, D.; SAVIRÓN, M.; REYT, G.; GAYMARD, F.; BRIAT, J. F. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arahidopsis* roots in response to iron deficiency. **New Phytologist**, v. 201, n. 1, p. 155-167, 2014.

FRIGERI, R. B. C. **Relação entre raiz e parte aérea de plântulas de espécies arbóreas tropicais sob diferentes níveis de radiação solar**. 2007. 152f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. Disponível em: < <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/315143>. Acesso em: 4 nov. 2020.

GHOSH, S.; WATSON, A.; GONZALEZ-NAVARRO, O.E et al. Speed breeding in growth chambers and glasshouses for crop breeding and model plant research. **Nat Protoc**, v. 13, n. 12, p. 2944–63, 2018.

GORELICK, J.; BERNSTEIN, N. “Chemical and physical elicitation for enhanced cannabinoid production in cannabis” in *Cannabis sativa L. - botany and biotechnology*. eds. S. Chandra, H. Lata, and M. A. EISOHLY (Cham: **Springer International Publishing**, p. 439–456, 2017.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Curr Opin Plant Biol**, v. 12, n. 3, p. 259–66, 2009.

JAIN, A.; CONNOLLY, E.L. Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 348, p. 1-6, 2013.

JEONG, J.; CONNOLLY, E. L. Iron uptake mechanisms in plants: functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant Sci.**, v. 176, p. 709–714, 2009.

KHANUJA, S. P. S. et al. **Mint plant named ‘Cim Indus’**. 2003.

KLIEBENSTEIN, D.J.; OSBOURN, A. Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 15, p. 415–23, 2012.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. **Anual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 131-52, 2012.

LOPES, J. P. et al. Análise de crescimento e trocas gasosas na cultura de milho em plantio direto e convencional. **Bragantia**, São Paulo, v. 68, n. 4, p.839-848, 2009.

LOPES, M. N. et al. Trocas gasosas e índices de crescimento em capim-braquiária manejado sob lâminas de irrigação e idades de crescimento. **Revista Agro@ambiente On-line**, Roraima, v. 7, n. 1, p. 10-17, 2013.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; GRUSAK, M. A.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 254, p. 1-8, 2013.

MAHENDER, A.; ALI, J.; PRAHALADA, G. D et al. Genetic dissection of developmental responses of agro-morphological traits under different doses of nutrient fertilizers using high-density SNP markers. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, 2019.

MALAQUIAS, G et al. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis L.*, *Salvia officinalis L.* e *Mentha piperita L.* (Família Lamiaceae). **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 50-68, 2014.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal**: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. UFV, p.267-297, 2009.

MARSCHENER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. **Soil, Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 883-894, 2011.

MARSCHENER, P. **Marschener' mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Elsevier Ltd., 2012.

MIRALLES, J.; MARTÍNEZ-SANCHEZ, J. J.; FRANCO, J. A. *Rhamnus alaternus* growth under four simulated shade environments: Morphological, anatomical and physiological responses. **Scientia Horticulturae**, v. 127, p.562-570, 2011.

PALA, N. A.; NEGI, A. K.; TODARIA, N. P. Traditional uses of medicinal plants of Pauri Garhwal Uttarkhand. **New York Science Journal**, v. 3, p. 61-65, 2010.

PAULUS, D. et al. Teor e qualidade do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) produzida sob cultivo hidropônico e em solo. **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 80-87, 2007.

PONS, T. L.; BERKEL, Y. J. Species-specific variation in the importance of the spectral quality gradient in canopies as a signal for photosynthetic resource partitioning. **Annals of Botany**, v. 94, p. 725-732, 2004.

POVH, J. A.; ONO, E. O. Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de sob ação de reguladores vegetais. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 189-193, 2006.

PUIG, S.; NURIA, ANDRE´S-COLA´S.; ANTONI, GARCI´A-MOLINA.; PENARRUBIA, L. Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. **Plant Cell Environ.**, v. 30, n. 3, p. 271–290, 2007.

ROODBARI, N.; ROODBARI, S.; GANJALI, A.; SADEGHINEJAD, F.; ANSARIFARD, M. Te effect of salinity stress on growth parameters and essential oil percentage of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Int J Adv Biol Biom Res.**, v. 1, n. 9, p. 1009–15, 2013.

ROSA, Y. R. S. et al. Influência do horário de colheita no óleo essencial de diferentes partes da planta de dois genótipos de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). **Scientia Plena**, Sergipe, v. 6, n.10, p.1-6, 2010.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, v. 3, p. 1-24, 2015.

SAHARKHIZ, M. J. et al. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. **International Scholarly Research Network**, v. 20, p. 6, 2012.

- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Cháfer, Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 1–16, 2011.
- SANTOS, H.S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 601-604, 2008.
- SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v.54, n. 6, p.817-826, 2013.
- SINGH, R. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1-1, p. 50-55, 2015.
- SIQUEIRA, J. B. V.; et al. Uso de plantas medicinais por hipertensos e diabéticos de uma estratégia saúde da família rural. **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 17, n. 32, 2017.
- SOUZA, M. A. A.; ARAUJO, O. J. L.; FERREIRA, M. A. F.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 25, p. 41-48, 2007.
- STEIN, R. J.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 2, p. 135-146, 2014.
- TAVISH, H.M.; HARRIS, D. An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs. For the Government Industry, Forum for Non-Food Crops. **The Scotch Parliament**, Edinburg 2002.
- VERMA, R. S.; PANDEY, V.; PADALIA R. C.; SAIKIA, D.; KRISHNA, B. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Aqueous Distillate Volatiles of Indian Peppermint (*Mentha piperita*) and Spearmint (*Mentha spicata*). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 17, n. 3, p. 258 - 267, 2011.
- ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiol Plant**, v. 162, n. 1, p. 2-12, 2018.
- ZEHTAB-SALMASI, S.; HEIDARI, F.; ALYARI, H. Efeitos de microelementos e densidade de plantas na produção de biomassa e óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). **Plant Science Research**, v. 1, p. 24-26, 2008.
- ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, v. 44, p. 1-7, 2009.