

1 **COMPORTAMENTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *CISTUS LADANIFER***
2 **L. PROVENIENTES DE ÁREAS NÃO CONTAMINADAS EM**
3 **ELEMENTOS VESTIGIAIS**

4
5 **ECOPHYSIOLOGICAL BEHAVIOUR OF *CISTUS LADANIFER* L. FROM AREAS**
6 **NON CONTAMINATED IN TRACE ELEMENTS**

7
8
9 E. S. SANTOS^{1,2}, M. M. ABREU², J. SARAIVA³, C. NABAIS⁴

10
11
12
13 **RESUMO**

14
15 Avaliou-se o comportamento das enzimas antioxidativas (catalase, peroxidase e
16 superóxido dismutase) e as concentrações em As, Cu, Pb e Zn nas folhas de duas
17 populações de *Cistus ladanifer* colhidas em solos não contaminados em elementos
18 vestigiais (Caldeirão e Pomarão), com condições climáticas diferentes e duas estações do
19 ano (Primavera e Verão).

20 Nas duas áreas, as concentrações totais e disponíveis (extracção com DTPA) em
21 elementos vestigiais foram baixas. A distribuição dos elementos pelas folhas novas e
22 maduras foi semelhante entre áreas e estações do ano. As actividades enzimáticas variaram
23 consoante a população. As folhas colhidas nas duas estações do ano, excepto as folhas
24 novas de Verão do Pomarão, apresentaram actividade enzimática na fracção solúvel e
25 iónica. Comparando as estações do ano e áreas de amostragem, constatou-se que as
26 actividades enzimáticas representam um mecanismo de tolerância a vários factores de stress
27 (elementos vestigiais, temperatura, seca e radiação UV), o que confere uma elevada
28 plasticidade à espécie.

29
30 **Palavras-chave:** Solos não contaminados, *Cistus ladanifer* L., condições climáticas,
31 elementos vestigiais, enzimas antioxidativas.

32
33
34
35 **ABSTRACT**

36
37 The aim of this study was to evaluate the behaviour of the antioxidant enzymes
38 (catalase, peroxidase and superoxide dismutase) and the concentrations of As, Cu, Pb and
39 Zn in leaves from two populations of *Cistus ladanifer* growing on soils non-contaminated
40 with trace elements (Caldeirão and Pomarão), but with different climatic conditions and in
41 two different seasons (spring and summer).

¹Centro de Investigação em Ciências do Ambiente e Empresariais (CICAE), Instituto Superior Dom Afonso III, Convento Espírito Santo, 8100-641 Loulé - Portugal. erika.santos@inuaf-studia.pt

²Unidade de Investigação Química Ambiental (UIQA), Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa (TULisbon), Tapada da Ajuda, 1399-017 Lisboa - Portugal

³QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro - Portugal

⁴Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Botânica, Universidade de Coimbra, Calçada Martim de Freitas, Arcos do Jardim, 3000 Coimbra - Portugal

42 In both areas, total and available concentrations (DTPA extraction) of trace
43 elements in soils were low. The distribution of elements for young and mature leaves was
44 similar between areas and seasons. The enzyme activities varied with the population.
45 Leaves collected in two seasons, except young leaves from Pomarão collected in summer,
46 showed enzymatic activity in the soluble and ionic fractions. Comparing the seasons and
47 sampling areas, *C. ladanifer* enzymatic activities represent a tolerance mechanism to
48 different stress factors (trace elements concentration, temperature, UV radiation and
49 drought), giving it a high plasticity.

50
51 **Key-words:** Antioxidative enzymes, *Cistus ladanifer* L., climatic conditions, non-
52 contaminated soils, trace elements.

53 54 55 INTRODUÇÃO

56
57 *Cistus ladanifer* L. (esteva) é um arbusto que cresce naturalmente no mediterrâneo.
58 Esta espécie cresce em áreas sujeitas a diferentes condições de stresse tais como: elevada
59 radiação solar e temperatura, baixos conteúdos de água e matéria orgânica no solo, elevadas
60 concentrações de elementos vestigiais no solo e baixo pH.

61 Embora a “verdadeira” tolerância esteja associada a mecanismos fisiológicos
62 controlados geneticamente, existem evidências de que alguns factores ambientais adversos
63 ou induzidos pela acção do Homem podem provocar processos de evolução ou mudanças
64 na adaptação das plantas (Schmid, 1992). A plasticidade existente na esteva pode estar
65 relacionada com o genótipo e/ou condições ambientais (Núñez-Olivera *et al.*, 1996). Assim,
66 de modo a poderem colonizar e desenvolver-se em áreas degradadas e com variações
67 climáticas sazonais, estas plantas desenvolveram uma série de mecanismos fisiológicos e
68 morfológicos de tolerância. Dimorfismo foliar, variações nas concentrações de clorofilas e
69 taxa fotossintética, regulação do ângulo foliar, translocação dos nutrientes para as folhas
70 novas antes da senescência foliar, aumento da espessura da epiderme e da concentração de
71 flavonóides são alguns exemplos de mecanismo de tolerância da esteva face às condições
72 climáticas sazonais, stresse hídrico, térmico e luminoso (radiação UV) (Núñez-Olivera *et*
73 *al.*, 1996; Chaves *et al.*, 1997; Correia, 2002).

74 Como consequência de flutuações significativas de intensidade e duração da
75 exposição às condições de stresse ambiental, as plantas podem aumentar a concentração de
76 espécies reactivas de oxigénio (ROS, reactive oxygen species) e ficarem sujeitas a stresse
77 oxidativo. Quando as plantas estão sob este tipo de stresse, podem produzir ou estimular
78 enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase
79 (SOD), e/ou componentes não-enzimáticos que eliminam e neutralizam ROS de modo a
80 protegerem as células de potenciais danos (Alexieva *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2003).

81 A função da SOD é catalisar a transformação das ROS geradas na planta em
82 situações de stresse, o que leva à formação de H₂O₂, na remoção do qual estão envolvidas as
83 enzimas CAT e POD (Cao *et al.*, 2004). Portanto, o equilíbrio entre a actividade da SOD e
84 da POD e/ou CAT nas células é considerada crucial para determinar a homeostasia do O₂ e
85 H₂O₂. Assim, considera-se que é importante estudar o efeito dos elementos vestigiais e
86 outros tipos de stresse no nível da actividade dessas enzimas antioxidativas, como parte da
87 adaptação das plantas ao meio.

88 Algumas enzimas podem ocorrer em duas formas ou fracções activas diferentes
89 consoante a sua localização celular: solúvel no meio aquoso da célula (Ingham *et al.*, 1998)
90 ou ligadas através de interacções electrostáticas à parede celular e a alguns organelos
91 (Moulding *et al.*, 1987; McDougall & Morrison, 1995). A diferenciação entre estas duas
92 formas é baseada no processo de extracção (McDougall & Morrison, 1995). Assim, formas
93 solúveis podem ser extraídas com um tampão de baixa força iónica, enquanto que as formas
94 ionicamente ligadas são extraídas com um tampão de extracção com força iónica elevada
95 contendo, normalmente, 1 M de NaCl ou KCl (Dunand *et al.*, 2002). A diferente
96 localização e actividade destas duas formas enzimáticas podem reflectir diferentes funções
97 fisiológicas, mas é reduzido o conhecimento relativo a esta situação (Saraiva *et al.*, 2007).

98 Sob condições de campo, as plantas estão sujeitas à co-existência de vários factores
99 de stresse, porém pouco é sabido sobre as respostas enzimáticas aos mesmos. Assim, este
100 estudo teve como objectivo comparar as actividades enzimáticas da catalase, peroxidase e
101 superóxido dismutase de duas populações espontâneas de *C. ladanifer* colhidas em locais
102 cujos solos não estão contaminados por elementos vestigiais, mas com condições climáticas
103 relativamente diferentes e em duas estações do ano (Primavera e Verão).

104 105 106 **MATERIAIS E MÉTODOS**

107 **Área de amostragem e materiais**

108 Para este estudo foram seleccionadas duas áreas cujos solos não estão contaminados
109 por elementos vestigiais: Pomarão e Serra do Caldeirão. O Pomarão localiza-se no
110 Concelho de Mértola (SE de Portugal) na margem direita do rio Guadiana, tendo sido o
111 porto a partir do qual o minério proveniente da área mineira de São Domingos era
112 exportado. O local de amostragem situa-se aproximadamente a 2 km do porto do Pomarão e
113 a 25 m da antiga linha-férrea, por onde era transportado o minério, e está orientada a Sul.
114 Os solos nesta área desenvolveram-se a partir de xistos incluídos na Formação de Mértola,
115 do Grupo do Flysh do Baixo Alentejo (Oliveira *et al.*, 1990) e são classificados como
116 Litossolos. O clima é tipicamente mediterrâneo, caracterizando-se por verões longos,
117 quentes e secos e por invernos moderadamente frios e húmidos. A precipitação média anual
118 (período de 1951-1980; INMG, 1990) é de 456 mm e ocorre maioritariamente no inverno e
119 de uma forma irregular.

120
121 A Serra do Caldeirão (S de Portugal) é delimitada pelo Barrocal algarvio e as
122 planícies do Baixo Alentejo. Os solos desta área desenvolveram-se sobre o complexo de
123 xistos argilosos e grauvaques incluídos na Formação de Mira, do Grupo do Flysh do Baixo
124 Alentejo (Oliveira *et al.*, 1992). A área de amostragem situa-se na aldeia de Barranco do
125 Velho, Concelho de Loulé, e está orientada para Sul. Os solos são também classificados
126 como Litossolos. Embora o clima desta área também seja considerado mediterrâneo, as
127 temperaturas são mais amenas no verão, relativamente ao Pomarão, pois está situada a
128 475 m de altitude, e a precipitação média anual (1951-1980; INMG, 1990) é de 991 mm.

129 Em cada uma das áreas delimitaram-se três parcelas contíguas de 150 m² onde se
130 colheram amostras compósitas de solo (Primavera de 2005), até uma profundidade máxima
131 de 20 cm, e folhas novas e maduras de *C. ladanifer*, de 15 plantas por parcela, em duas
132 estações do ano (Primavera e Verão de 2005). Ambas as áreas de amostragem estão
133 orientadas a sul.

134

135 **Métodos**

136 Após secagem à temperatura ambiente, os solos foram crivados. A fracção <2 mm
137 do solo foi caracterizada física e quimicamente (Póvoas & Barral, 1992): pH em água na
138 proporção 1:2,5 (m:v); análise granulométrica; carbono orgânico por oxidação por via
139 húmida; capacidade de troca catiónica (CTC) e catiões de troca (método do acetato de
140 amónio a pH 7); azoto total (método de Kjeldahl); P e K assimiláveis (método de Egner-
141 Riehm).

142 A análise química total de As, Cu, Pb e Zn nos solos (fracção <2 mm) foi realizada
143 por análise instrumental por activação de neutrões (INAA) ou espectrofotometria de
144 emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-EAS) após digestão ácida com
145 HF+HClO₄+HNO₃+HCl (Activation Laboratories, 2006). A fracção disponível (solúvel em
146 água e a fracção associada ao complexo de troca do solo) destes mesmos elementos foi
147 extraída com uma solução de DTPA (0,005 mol/L DTPA + 0,1 mol/L TEA + 0,01 mol/L
148 CaCl₂ - Lindsay & Norvell, 1978) sendo posteriormente analisado o Cu, Pb e Zn por
149 espectrofotometria de absorção atómica em chama (F-AAS) e em câmara de grafite (GF-
150 AAS) e o As por geração de hidretos (GH-AAS).

151 O material vegetal de *Cistus ladanifer* (folhas novas e maduras) foi lavado, seco a
152 40 °C, finamente moído e analisado pelas mesmas técnicas que a fracção disponível (F-
153 AAS, GF-AAS e GH-AAS) após extracção, através de digestão ácida com HNO₃
154 concentrado, sob pressão.

155 Para a obtenção dos extractos enzimáticos (fracção solúvel e fracção ligada
156 iónicamente), realizou-se uma extracção sequencial baseada em Ingham *et al.* (1998) e
157 Pang *et al.* (2003). Assim, para a extracção adicionou-se a 0,50 g de folhas, previamente
158 liofilizadas e moídas finamente, 10 ml de tampão fosfato (pH 7,2) a 50 mM, contendo
159 EDTA a 1 mM e 1 % (p/v) PVPP. A extracção realizou-se durante 15 minutos a 4 °C com
160 agitação, sendo depois o homogeneizado centrifugado (10 minutos a 22000 g e 4 °C). O
161 sobrenadante resultante foi congelado com azoto líquido, sendo posteriormente utilizado
162 nos ensaios de quantificação da actividade enzimática da catalase (CAT), peroxidase (POD)
163 e superóxido dismutase (SOD) na fracção solúvel. Ao resíduo resultante da extracção da
164 fracção solúvel adicionou-se 10 ml de tampão fosfato (pH 7,2) a 50 mM que continha
165 1 mM de EDTA, 1 % (p/v) PVPP e 1 M de NaCl. A extracção decorreu também durante 15
166 minutos a 4 °C, a que se seguiu centrifugação durante 10 minutos a 22000 g e 4 °C. O
167 sobrenadante resultante foi congelado com azoto líquido, sendo utilizando posteriormente
168 nos ensaios de quantificação da actividade das mesmas enzimas, na fracção iónica.

169 A quantificação da actividade da CAT foi realizada com base no método descrito
170 por Chance & Maehly (1955) e Wong & Whitaker (2003). Soluções de peróxido de
171 hidrogénio (H₂O₂) a 200 mM, tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,0 e água Milli-Q foram
172 previamente incubadas a 25 °C. Em cuvetes de quartzo foram adicionados 2 ml de tampão
173 fosfato, 50 a 150 µl de extracto enzimático, 150 µl de H₂O₂ e um volume de água Milli-Q
174 de modo a perfazer 3 ml, sendo a reacção iniciada pela adição de H₂O₂. O consumo de
175 H₂O₂ foi seguido a 240 nm (espectrofotómetro UV-VIS) durante 2 min. O declive da
176 porção linear da curva que relaciona a absorvência com o tempo foi calculado (ΔAbs_{240}
177 min^{-1}) e utilizado para determinar a actividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ peso fresco),
178 utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) do H₂O₂ de 36,0 M⁻¹ cm⁻¹ (Verma & Dubey, 2003).

179 A actividade da POD foi quantificada usando guaiacol como substrato, como
180 descrito por Chance & Maehly (1955) e Yuan & Jiang (2003). Soluções de 135 mM de
181 guaiacol, 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,0), 200 mM de H₂O₂ e água Milli-Q foram

Deleted: espectrómetro

182 previamente incubadas a 25 °C. Em cuvetes de quartzo adicionaram-se 1,2 ml de tampão
183 fosfato, 500-1000 µl de extracto enzimático, 30 µl de H₂O₂, 200 µl de guaiacol e água
184 Milli-Q para completar 3 ml de volume, sendo a reacção iniciada pela adição do guaiacol.
185 O aumento da absorvência foi seguido a 420 nm (~~espectrofotómetro UV-VIS~~) durante 5
186 min. O declive da porção linear da curva, que relaciona a absorvência com o tempo, foi
187 calculado ($\Delta\text{Abs}_{420} \text{ min}^{-1}$) e utilizado para determinar a actividade da POD ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$
188 consumidos $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ peso fresco), utilizando o coeficiente de extinção (ϵ) de $2,60 \text{ mM}^{-1}$
189 cm^{-1} que corresponde ao produto de oxidação do guaiacol, tetraguaiacol (Verma & Dubey,
190 2003).

Deleted: espectrómetro

191 A actividade da SOD foi determinada de acordo com Sun & Zigman (1977) e
192 Khopde *et al.* (2001). Soluções de 0,1 M de tampão hidrogenocarbonato de sódio (pH
193 10,0), 5 mM de epinefrina (pH 2,0) e água Milli-Q foram incubadas a 25 °C. Em cuvetes de
194 quartzo adicionaram-se 1,5 ml de tampão, 25-100 µl da amostra, 300 µl de epinefrina e
195 água Milli-Q para completar 3 ml de volume, sendo a reacção iniciada pela adição de
196 epinefrina. O aumento da absorvência foi seguido a 320 nm (~~espectrofotómetro UV-VIS~~)
197 durante 1 minuto e a taxa de oxidação da epinefrina foi calculada pelo declive da porção
198 linear da curva que relaciona a absorvência com o tempo ($\Delta\text{Abs}_{320} \text{ min}^{-1}$). A taxa de auto-
199 oxidação da epinefrina foi calculada nas mesmas condições, mas sem extracto enzimático.
200 Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a
201 taxa de auto-oxidação da epinefrina em 50 %.

Deleted: espectrómetro

202 Para todos os casos foram realizadas réplicas, excepto para os teores totais. A
203 comparação dos parâmetros bioquímicos entre as duas áreas foi analisada por ANOVA e
204 teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico SPSS v17.0. As correlações
205 bivariadas de Pearson foram utilizadas para relacionar a influência de elementos vestigiais
206 nas actividades enzimáticas das folhas.

207

208

209 RESULTADOS E DISCUSSÃO

210

211 As características químicas dos solos amostrados constam do Quadro 1. Os solos de
212 ambas as áreas apresentaram valores semelhantes de pH e textura franco-limosa.

213

214 **Quadro 1** – Caracterização química dos solos colhidos nas áreas do Caldeirão e Pomarão.

Características dos solos	Áreas de amostragem	
	Caldeirão	Pomarão
pH (H ₂ O)	5,54 ± 0,16 ^a	5,99 ± 0,06 ^a
CTC (cmol _c kg ⁻¹)	15,17 ± 0,93 ^a	7,78 ± 0,39 ^b
C orgânico (g kg ⁻¹)	40,53 ± 2,42 ^a	11,67 ± 2,90 ^b
N total (mg kg ⁻¹)	147,5 ± 13,58 ^a	58,8 ± 3,05 ^b
K assimilável (mg kg ⁻¹)	153,5 ± 13,15 ^a	81,54 ± 1,60 ^b
P assimilável (mg kg ⁻¹)	5,28 ± 1,40 ^a	1,54 ± 0,17 ^b

Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e representam médias ± desvio padrão.

215

216

217

218 A capacidade de troca catiónica foi maior nos solos da Serra do Caldeirão, o que
 219 está de acordo com os valores do carbono orgânico ($r=0,98$). Em ambas as áreas, o Ca e
 220 Mg foram os catiões de troca maioritários.

221 Relativamente à fertilidade, os solos na serra do Caldeirão apresentaram
 222 concentrações de carbono orgânico, azoto total e fósforo e potássio assimiláveis
 223 significativamente superiores às dos solos do Pomarão, o que pode estar relacionado com a
 224 maior cobertura de plantas existente nesses solos e às condições mais húmidas. De uma
 225 maneira geral, os solos do Caldeirão apresentaram fertilidade alta ou média-alta, embora o
 226 P assimilável <10 mg/kg para ambas as áreas possa indicar fertilidade baixa. Os solos do
 227 Pomarão apresentaram fertilidade média ou baixa (Anónimo, 2000).

228 As concentrações em As, Cu, Pb, e Zn nos solos e nas folhas de *C. ladanifer*
 229 colhidas no Caldeirão e Pomarão em ambas as estações do ano apresentam-se no Quadro 2.
 230

231 **Quadro 2** – Concentrações em As, Cu, Pb e Zn nos solos e nas folhas novas e maduras de
 232 *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera e Verão, no Caldeirão e Pomarão.

Concentração dos elementos vestigiais (mg kg ⁻¹ Peso seco)				
	As	Cu	Pb	Zn
Solo (n=3 para cada área de amostragem)				
Total				
Caldeirão	18,73 ± 0,95 ^a	61,33 ± 22,90 ^b	47,67 ± 16,77 ^a	69,33 ± 25,11 ^a
Pomarão	15,93 ± 0,40 ^a	124,67 ± 40,20 ^a	44,67 ± 9,61 ^a	74,67 ± 16,07 ^a
Fracção disponível (Extraída com DTPA)				
Caldeirão	0,19 ± 0,17 ^a	0,17 ± 0,09 ^b	1,89 ± 1,51 ^a	< Ld
Pomarão	0,01 ± 0,01 ^a	5,88 ± 0,68 ^a	0,90 ± 0,12 ^a	< Ld
Plantas (n=3 para cada área de amostragem)				
Primavera				
Folhas novas				
Caldeirão	0,65 ± 0,32 ^{ab}	10,52 ± 4,10 ^a	71,48 ± 4,44 ^a	95,43 ± 19,99 ^{ab}
Pomarão	0,18 ± 0,11 ^b	10,44 ± 4,42 ^a	41,23 ± 6,45 ^b	67,80 ± 13,13 ^b
Folhas maduras				
Caldeirão	0,83 ± 0,38 ^{ab}	5,34 ± 1,11 ^a	44,45 ± 5,94 ^{ab}	117,82 ± 17,73 ^a
Pomarão	0,86 ± 0,24 ^{ab}	7,67 ± 2,33 ^a	51,13 ± 3,71 ^{ab}	93,37 ± 8,04 ^{ab}
Verão				
Folhas novas				
Caldeirão	1,42 ± 0,41 ^{ab}	9,07 ± 3,02 ^a	59,69 ± 7,29 ^{ab}	71,98 ± 14,25 ^b
Pomarão	1,75 ± 0,19 ^a	8,87 ± 1,57 ^a	72,10 ± 7,49 ^a	70,19 ± 5,98 ^b
Folhas maduras				
Caldeirão	1,75 ± 0,86 ^a	7,15 ± 2,05 ^a	45,30 ± 17,08 ^{ab}	79,94 ± 8,02 ^b
Pomarão	1,79 ± 0,48 ^a	9,11 ± 1,52 ^a	55,01 ± 5,36 ^{ab}	92,09 ± 6,00 ^{ab}

Ld – Limite de detecção. Valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e representam médias ± desvio padrão.

233 Os solos do Caldeirão e Pomarão não apresentaram diferenças significativas nas
234 concentrações totais de todos os elementos vestigiais bem como, na fracção disponível de
235 As e Pb (extraída com DTPA). A fracção de Cu disponível para os organismos nos solos do
236 Pomarão foi superior, porém só representa 4,7 % do teor total. Ambas as áreas
237 apresentaram valores para a fracção de Zn disponível inferiores ao limite de detecção do
238 aparelho analítico.

239 Embora as folhas maduras apresentem maiores concentrações em elementos
240 químicos vestigiais do que as folhas novas, esta variação não foi significativa. De uma
241 maneira geral, as concentrações destes elementos nas folhas colhidas em ambas as estações
242 e áreas foram similares. Estes factos, podem relacionar-se com a similaridade observada
243 entre as concentrações totais e da fracção disponível nos solos (excepto para o Cu) e podem
244 sugerir uma elevada mobilidade interna dos elementos vestigiais no xilema e floema
245 (Clemens *et al.*, 2002; Yruela, 2005).

246 Apesar das concentrações de Cu nos solos serem maiores no Pomarão, estes valores
247 não reflectem o Cu nas folhas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas
248 para a concentração deste elemento entre os tipos de folhas, áreas estudadas e estações do
249 ano. A translocação do Cu entre as várias partes das plantas desempenha um papel
250 predominante na utilização do mesmo pela planta. Assim, sob condições de excesso, os
251 tecidos das raízes podem demonstrar uma elevada capacidade de manter o nível de Cu em
252 vez de o translocar para a parte aérea (Kabata Pendias & Pendias, 2001).

253 Apesar de as concentrações de Pb no solo serem baixas, ambas as populações
254 concentram quantidades consideradas fitotóxicas nas suas folhas ($30-300 \text{ mg kg}^{-1}$; Kabata
255 Pendias & Pendias, 2001) mas não demonstraram sinais visíveis de toxicidade (folhas
256 verdes muito escuras, murchamento das folhas maduras, folhagem atrofiada; Kabata
257 Pendias & Pendias, 2001) sugerindo uma elevada tolerância da planta a este elemento.

258 Os valores obtidos para a actividade enzimática da CAT, POD e SOD nas folhas
259 novas e maduras de *C. ladanifer*, colhidas na Primavera e Verão, nas duas áreas de
260 amostragem constam da Figura 1. Em ambas as áreas e estações do ano, as folhas novas e
261 maduras apresentaram actividade da CAT nas fracções solúvel e iónica sendo a fracção
262 solúvel a que demonstrou maior percentagem da actividade total (50-78 %).

263 Na Primavera, as folhas novas do Pomarão apresentaram uma actividade da CAT na
264 fracção solúvel cerca de 3 vezes superior à das folhas maduras da mesma área e às folhas
265 do Caldeirão, sugerindo que esta actividade enzimática no Pomarão decorre também como
266 mecanismo de tolerância ao stresse hídrico, térmico e à radiação solar nas folhas
267 fotossinteticamente mais activas. O aumento da actividade total de CAT face ao stresse UV
268 também foi documentado por Yannarelli *et al.* (2006) em estudos feitos com *Helianthus*
269 *annuus*. Em ensaios realizados com *Pisum sativum* L. e *Triticum aestivum* L. sujeitos a
270 stresse hídrico e à radiação solar simultaneamente, a actividade de CAT total também
271 aumentou relativamente ao controlo (Alexieva *et al.*, 2001).

272 No Pomarão e Caldeirão (nesta área de uma forma não significativa
273 estatisticamente), o decréscimo das actividades da CAT na fracção solúvel das folhas novas
274 para as maduras pode relacionar-se com o aumento dos teores em Zn ($r=-0,75$ e $r=-0,93$,
275 respectivamente) nas folhas, que apesar de não ocorrerem em concentrações consideradas
276 tóxicas, estão muito próximas, nas folhas maduras, do valor mínimo da gama de
277 fitotoxicidade (100 mg/kg ; Kabata-Pendias e Pendias, 2000). O decréscimo da actividade
278 desta enzima face ao Zn foi também observado em *Salix viminalis* (Landberg & Greger,
279 2002) cultivado em hidroponia. As actividades da CAT na fracção iónica das folhas (novas

Deleted: total

280 e maduras) colhidas na Primavera não apresentaram diferenças significativas entre as áreas.
281 Entre as folhas novas e maduras de cada uma das áreas, a diminuição das actividades da
282 CAT nesta fracção não foi significativa o que pode relacionar-se com o aumento (não
283 significativo) das concentrações de elementos vestigiais entre os dois tipos de folhas (As
284 nas folhas do Caldeirão, $r=-0,91$; e Zn nas folhas do Pomarão, $r=-0,78$).
285

286 **Figura 1** – Actividade das enzimas CAT, SOD e POD nas fracções solúvel e iónica em
287 folhas de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera e Verão, no Caldeirão (C) e Pomarão (P).
288 Valores na mesma fracção seguidos de letras diferentes (maiúsculas para a fracção iónica e
289 minúsculas para a fracção solúvel) são significativamente diferentes ($p<0,05$) e representam
290 médias \pm desvio padrão.
291

292 No Verão, as actividades da CAT nas fracções solúvel e iónica foram semelhantes
293 entre as áreas e estádios de desenvolvimento das folhas. As actividades enzimáticas, na
294 fracção solúvel das folhas de ambas as áreas e na fracção iónica das folhas do Pomarão, não
295 parecem estar associadas a nenhum dos elementos químicos estudados. Porém, a actividade
296 da fracção iónica nas folhas do Caldeirão pode ser estimulada caso as concentrações de As
297 aumentem para níveis tóxicos ($r=0,835$). Comparando as duas estações do ano, constatou-se
298 que as folhas de Verão demonstraram maior actividade da CAT na fracção solúvel que
299 as da Primavera da mesma área (excepto folhas novas do Pomarão da Primavera), o que
300 será devido, possivelmente, à intervenção da CAT como mecanismo de tolerância ao
301 stresse hídrico e luminoso. O estímulo da actividade da CAT total face ao aumento da seca
302 e radiação UV, em coexistência ou não, foi também observado para outras plantas
303 (Alexieva *et al.*, 2001; Yannarelli *et al.*, 2006).

304 Para o Caldeirão verificou-se ainda uma inter-relação entre a actividade da CAT e
305 SOD na fracção solúvel das folhas colhidas na Primavera ($r=0,98$) e na fracção iónica das
306 folhas colhidas no Verão ($r=0,83$).

307 Relativamente à POD, a actividade da fracção iónica foi superior à da actividade da
308 fracção solúvel em todos os casos, variando entre 54 e 100% da actividade total. Na
309 Primavera, as actividades da POD na fracção solúvel foram similares entre áreas e estádios
310 de desenvolvimento das folhas, não estando correlacionadas com nenhum dos elementos
311 estudados. Relativamente à fracção iónica verificaram-se diferenças significativas entre as
312 áreas mas não entre as folhas novas e maduras da mesma área. No Caldeirão, a actividade
313 da POD na fracção iónica nas folhas novas e maduras pode relacionar-se com a
314 concentração de Zn ($r=-0,82$) e/ou radiação UV existente. O estímulo da actividade da POD
315 face ao aumento da radiação foi também verificado com *Helianthus annuus* L. e *Pisum*
316 *sativum* L. (Alexieva *et al.*, 2001; Yannarelli *et al.*, 2006). Em contraste, no Pomarão a
317 actividade da POD na fracção iónica parece não se relacionar com nenhum dos elementos
318 químicos estudados. Assim, a existência de menores valores de POD nesta fracção no
319 Pomarão, relativamente à do Caldeirão, pode relacionar-se com o stresse hídrico como
320 reportado por Alexieva *et al.* (2001) em ensaios com *Triticum aestivum* L.

321 No Verão, a ausência de actividade da POD na fracção solúvel das folhas novas do
322 Pomarão distinguiu-se significativamente e está, possivelmente, relacionada com o
323 aumento da radiação UV absorvida pelas folhas de esteva e indisponibilidade de água. A
324 similaridade entre as actividades da POD na fracção iónica de ambas as áreas de
325 amostragem, os menores valores relativamente aos de Primavera e a não correlação com
326 nenhum dos elementos químicos estudados, sugere que a actividade desta enzima poderá

327 estar apenas associada ao aumento da temperatura e radiação. É de realçar que as folhas
328 novas de Primavera apresentaram maior actividade de POD relativamente às de Verão o
329 que pode sugerir um acréscimo na defesa contra o stresse oxidativo, já que a planta está na
330 fase de desenvolvimento e, conseqüentemente, fotossinteticamente mais activa.

331 Em ambas as áreas observou-se actividade da SOD nas fracções solúvel e iónica,
332 independentemente do tipo de folha e estação do ano, sendo a fracção solúvel a que
333 demonstrou maior percentagem da actividade total (57-78 %). Na Primavera, a actividade
334 da SOD na fracção solúvel foi diferente entre as áreas mas, não entre tipo de folhas da
335 mesma área. Porém, na fracção iónica foram semelhantes entre as áreas e estádios de
336 desenvolvimento das folhas.

337 Na Primavera, só as actividades da SOD na fracção solúvel e iónica do Caldeirão se
338 relacionaram com um dos elementos vestigiais nas folhas (Zn: $r=-0,84$ e $r=-0,76$,
339 respectivamente). As maiores actividades da SOD solúvel no Pomarão, relativamente ao
340 Caldeirão, e a não relação com nenhum dos elementos vestigiais estudados pode sugerir a
341 intervenção desta enzima contra o stresse UV e hídrico. Em ensaios com *Triticum aestivum*
342 L e *Pisum sativum* L. sujeitas a stress UV e UV+hídrico também foi observado um
343 aumento da actividade da SOD total (Alexieva *et al.*, 2001).

344 No Verão, as actividades da SOD nas fracções solúvel e iónica foram semelhantes
345 entre as áreas e tipos de folhas não se relacionando com nenhum dos elementos vestigiais
346 estudados. Assim, esta enzima pode estar relacionada com a tolerância às condições de
347 temperatura elevada, baixa humidade relativa do ar e com a maior incidência da radiação
348 solar como observado em outros estudos (Alexieva *et al.*, 2001).

349
350

351 CONCLUSÕES

352

353 Apesar de as concentrações de Pb no solo serem baixas ambas as populações
354 acumularam quantidades deste elemento consideradas fitotóxicas nas suas folhas. As
355 plantas de *Cistus ladanifer* parecem estar bem adaptadas à coexistência de um vasto
356 conjunto de stresses ambientais (radiação UV, seca, temperaturas altas e elementos
357 vestigiais no solo) presentes nas áreas do Caldeirão e Pomarão. Esta tolerância pode estar
358 relacionada com o funcionamento eficaz de diferentes isoenzimas de CAT, POD e SOD. A
359 menor actividade das enzimas antioxidativas, nomeadamente da POD na fracção solúvel,
360 pode ser compensada pela actividade de outras enzimas ou funcionamento de outros
361 sistemas antioxidativos.

362

363

364 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

365

366 Activation Laboratories, 2010 - Code 1H - Au + 48. Disponível em
367 <http://www.actlabs.com/methsub_code1h.htm> (Acesso em: 21 de Maio de 2010).

368 Anónimo, (2000) - *Manual de Fertilização de Culturas*. Ed. INIA-Laboratório Químico
369 Agrícola Rebelo da Silva, 221 pp.

370 Alexieva, V.; Sergier, I.; Mappelli, S. & Karanov, E. (2001) - The effect of drought and
371 ultraviolet radition on growth and stress marked in pea and wheat. *Plant Cell*
372 *Environment* 24: 1337-1344.

Deleted: baixa

- 373 Cao, X.; Ma, L. Q. & Tu, C. (2004) - Antioxidative responses to arsenic in the arsenic
374 hyperaccumulator chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution*
375 128: 317-325.
- 376 Chance, B. & Maehly, A.C. (1955) - Assay of catalases and peroxidases. *Methods in*
377 *Enzymology* 2: 764-817.
- 378 Chaves, N.; Escudero, J.C. & Gutiérrez-Merino, C. (1997) - Quantitive variation of
379 flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* poulation. *Biochemical*
380 *Sytematics and Ecology* 25, 5: 429-435.
- 381 Clemens, S.; Bloss, T.; Vess, C.; Neumann, D.; Nies, D. H. & zur Nieden, U. (2002) - A
382 transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells
383 mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of*
384 *Biological Chemistry* 277: 18215-18221.
- 385 Correia, O. (2002) - Os *Cistus*: as Espécies do Futuro?. In: Loução, K.A. (Eds),
386 *Fragmentos de Ecologia*. Escolar Editora, Lisboa, pp. 97-119.
- 387 Dunand, C; Tognolli, M.; Overney, S.; von Tobel, L.; Meyer, M.; Simon, P. & Penel C.
388 (2002) - Identification and characterisation of Ca²⁺-pectate binding peroxidases in
389 *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 159, 11:1165-1171.
- 390 Grant, J.J. & Loake, G.J. (2000) - Role of active oxygen intermediates and cognate redox
391 signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.
- 392 Ingham, L.M.; Parker, M.L. & Waldron, W. (1998) - Peroxidase: changes in soluble and
393 bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiologia Plantarum* 102:
394 93-100.
- 395 Landberg, T. & Greger, M. (2002) - Differences in oxidative stress in heavy metal resistant
396 and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Journal of Plant Physiology* 159: 69-75.
- 397 Lindsay, W.L. & Norvell, W.A. (1978) - Development of a DTPA soil test for zinc, iron,
398 manganese and copper. *Soil Science* 42, 421-428.
- 399 Kabata-Pendias A. & Pendias, H. (2001) - *Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd ed. CRC
400 Press, Boca Raton, 413 pp.
- 401 Khopde, S.M.; Priyadarsini, K.I.; Mohan, H.; Gawandi, V.B.; Satav, J.G.; Yakhmi, J.V.;
402 Banavaliker, M.M.; Biyani, M.K. & Mittal, J.P. (2001) - Characterizing the
403 antioxidant activity of amla (*Phyllanthus emblica*) extract. *Current Science* 81:
404 185-190.
- 405 McDougall, G.J. & Morrison, I.M. (1995) - Ionically-bound and covalently-bound wall
406 peroxidases differ in their substrate specificity. *Biochemical Society Transaction* 23:
407 150S.
- 408 Moulding, P.H.; Grant, H.F.; McLeilan, K.M. & Robinson, D.S. (1987) - Heat stability of
409 soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. *Internacional*
410 *Journal of Food Science and Technology* 22: 391-391.
- 411 Núñez-Olivera, E.; Martínez-Abaigar, J. & Escudero, J.C. (1996) - Adaptability of leaves
412 of *Cistus ladanifer* to widely varying environmental conditions. *Functional Ecology*
413 10: 636-646.
- 414 Pang, J.; Chan, G.S.Y.; Zhang, J.; Liang, J. & Wong, M.H. (2003) - Physiological aspects
415 of vertiver grass for rehabilitation in abandoned metalliferous mine wastes.
416 *Chemosphere* 52: 1559-1570.
- 417 Oliveira, J.T.; Brandão Silva, J.; Romão, J.A.; Carvalho, D.; Van den Boogaard, M. &
418 Ribeiro, A. (1990). *Carta Geológica de Portugal na escala de 1:50 000, Folha 46-*
419 *D-Mértola*. Serviços Geológicos de Portugal.

- 420 Oliveira, J.T.; Pereira, E.; Ramalho, M.; Antunes, M.T. & Monteiro, J.H. (1992) - 5ª
421 Edição da Carta Geológica de Portugal na escala de 1:500 000. Serviços
422 Geológicos de Portugal.
- 423 Póvoas, I. & Barral, M.F. (1992) - *Métodos de análise de solos. Comunicações do Instituto*
424 *de Investigação Científica Tropical*, Série de Ciências Agrárias, Nº 10. Ministério
425 do Planeamento e da Administração do Território, Secretaria de Estado da Ciência e
426 Tecnologia, Lisboa.
- 427 Saraiva, J.; Nunes, C. & Coimbra, M. (2007). Purification and characterization of olive
428 (*Olea europaea* L.) peroxidase - Evidence for the occurrence of a pectin binding
429 peroxidase. *Food Chemistry* 101:1571-1579.
- 430 Schmid, B. (1992) - Phenotypic variation in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 6, 45-60.
- 431 Sun, M. & Zigman, S. (1977) - An improved spectrophotometric assay for superoxide
432 dismutase based on epinephrine autoxidation, *Analytical Biochemistry* 90: 81-89.
- 433 Wong, D.W.S. & Whitaker, J.R. (2003) - Catalase. *In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.;*
434 *Wong, D. W. S. (Eds), Handbook of Food Enzymology.* Marcel Dekker Inc., New
435 York, pp. 389-401.
- 436 Yannarelli, G.; Gallego, S.M. & Tomaro, L.M. (2006) - Effect of UV-B radiation on the
437 activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons.
438 *Environmental and Experimental Botany* 56: 174-181.
- 439 Yruela, I. (2005) - Copper in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 145-156.
- 440 Yuan & Jiang (2003) - Peroxidase. *In: Whitaker, J.R.; Voragen, A.G.J.; Wong, D.W.S.*
441 *(Eds), Handbook of Food Enzymology.* Marcel Dekker Inc., New York, pp. 389.

