

MATHEUS CASARINI SIQUEIRA

Efeito de diferentes concentrações de cobre no crescimento e desenvolvimento
de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de MESTRE em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas
Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2021

MATHEUS CASARINI SIQUEIRA

Efeito de diferentes concentrações de cobre no crescimento e desenvolvimento
de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de MESTRE em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas
Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. ARMANDO REIS TAVARES

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Siqueira, Matheus Casarini

S617e Efeito de diferentes concentrações de cobre no crescimento e desenvolvimento de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica / Matheus Casarini Siqueira -- São Paulo, 2021.
72p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica, Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2021
Bibliografia.

1. *Eugenia uniflora*. 2. Metal pesado. 3. *Schinus terebinthifolia*.
I. Título

CDU: 628.395

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização do projeto - Plano de Desenvolvimento Institucional de Pesquisa (PDIP): Desafios para a Conservação da Biodiversidade frente às Mudanças Climáticas, Poluição e Uso e Ocupação do Solo (processo nº 2017/50341-0); e pela bolsa de mestrado concedida (processo nº 2019/03105-4).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica (PPG-IBt) pelas condições e infraestrutura oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Armando Reis Tavares, pela dedicação em me orientar, auxiliar, e principalmente por me atender onde quer que esteja e em qualquer horário para tirar todas as minhas dúvidas, por mais simples que elas fossem. Por sempre confiar em mim e acreditar no meu potencial.

Aos meus “co-orientadores” Dr. Shoey Kanashiro, Dra. Marisa Domingos e Dra. Mirian Cilene Spasiani Rinaldi, por toda ajuda, conselhos, dicas, incentivos, revisões e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Solange Eulália Brandão, minha orientadora de TCC, que me mostrou o mundo da pesquisa e da vida acadêmica. Que me orientou em tudo desde o começo, e sempre confiou no meu potencial. Me encorajou a entrar no mestrado e me ajudou em todas as etapas desse percurso tão desafiador. Muito obrigado por me mostrar esse caminho e por toda ajuda.

A todos os pesquisadores do Instituto de Botânica que não só me passaram valioso conhecimento, mas também sempre me incentivaram, em especial aos Drs. Nelson Augusto dos Santos Junior, Emerson Alves da Silva, Regina Maria de Moraes, Tania Maria Ceratti e Cláudio José Barbedo.

Aos funcionários dos núcleos de pesquisa que sempre me ajudaram e me orientaram.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Dr. Mauricio Lamano Ferreira e Dra. Marisa Domingos pelas contribuições e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos alunos, ex-alunos e amigos que fiz nos diferentes núcleos do Instituto de Botânica: Os ecólogos Ruan, Leo, Alex, Renata, Bárbara, Geane, Regina, Marina, Gisele, Ricardo e Cassia; Os sementeiros Maiara, Isabela, Wesley, Santiago, Camis e Jhonnathan; As fisiologistas Maria Fernanda e Ingrid; Os ornamentais Alê, Letícia, Victória e Maria Gessi. Vocês não só

aliviavam o estresse e me faziam rir diariamente, como me mantinham no eixo, me davam forças e sempre me colocavam pra cima. O apoio e companheirismo de todos vocês foram mais que essenciais!

À minha namorada Júlia, por todo amor, carinho, compreensão, apoio, motivação e paciência durante todo esse tempo. Por ter ficado ao meu lado em cada decisão e momento difícil. Ter você fez tudo ficar mais fácil, leve e me dar certeza que eu sou capaz de qualquer coisa. Eu te amo!

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos.

À minha família: Minha mãe Valnise, meu pai Tadeu, meu irmão Guilherme, meus avós, tios e todos meus parentes que sempre me incentivaram e apoiaram em qualquer caminho que eu decidi trilhar.

À Deus, pelas oportunidades e acontecimentos que me foram permitidos ao longo da vida.

Muito obrigado!

RESUMO

O cobre (Cu) é um metal pesado e micronutriente essencial necessário para o crescimento e desenvolvimento vegetal. O cobre desempenha papéis cruciais em reações bioquímicas de transferência de elétrons (redox), reações fotossintéticas e é componente estrutural de metaloproteínas e enzimas. Entretanto, altos níveis de cobre nos solos podem causar fitotoxidez, limitando o crescimento das plantas e ser prejudicial ao meio ambiente. A poluição do solo por metais pesados (como o cobre) é causada principalmente por fontes antropogênicas, como deposição atmosférica de material particulado e atividades agrícolas, e é uma das maiores preocupações ambientais em todo o mundo. Devido à sua proximidade com as fontes emissoras, os fragmentos florestais urbanos são altamente afetados pela entrada excessiva de metais pesados no solo. Portanto, o estudo objetivou avaliar as respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, *Schinus terebinthifolia* Raddi e *Eugenia uniflora* L., cultivadas em solos contaminados com concentrações crescentes de cobre. As plantas foram cultivadas em vasos contendo solo coletado de floresta urbana na cidade de São Paulo, SP, Brasil, contaminado com adição de 0 (controle), 60, 120, 180 ou 240 mg Cu kg⁻¹ solo. Altura e diâmetro do caule foram analisados como parâmetros morfológicos, enquanto que o crescimento, teor de cobre nos tecidos vegetais, índice de translocação, fator de bioacumulação, teor de pigmentos, trocas gasosas foliares e fluorescência da clorofila foram analisados para avaliar as alterações fisiológicas. Os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase) e não enzimáticos (ácido ascórbico e glutatona) foram quantificados para avaliar as respostas bioquímicas das espécies. Os resultados mostraram que, quando cultivadas em solos contaminados, as espécies apresentaram alta absorção e acúmulo de cobre nas raízes, com baixas taxas de translocação para a parte aérea; contudo, *S. terebinthifolia* apresentou maior restrição de cobre nas raízes que *E. uniflora*. *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentaram respostas distintas para as trocas gasosas foliares. As espécies não apresentaram alteração na fluorescência da clorofila ou no conteúdo de

pigmentos fotossintéticos. As espécies também não apresentaram diferenças para os teores de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. *S. terebinthifolia* apresentou redução na produção de biomassa foliar, enquanto *E. uniflora* apresentou redução no crescimento em altura. As espécies demonstraram alta tolerância e capacidade de extração de cobre do solo, sendo que a restrição de cobre nas raízes se revela como o principal mecanismo de proteção de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* contra o estresse por cobre. A espécie pioneira *S. terebinthifolia* apresenta potencial para ser indicada como fitoestabilizadora de cobre.

Palavras-chave: Arbóreo, *Eugenia uniflora*, fisiologia vegetal, fitotoxicidade, metal pesado, poluição, *Schinus terebinthifolia*.

ABSTRACT

Copper (Cu) is a heavy metal and an essential micronutrient required for plant growth and development. Copper plays roles in biochemical reactions of electron transfers (redox), photosynthetic reactions, and is a structural component of vital metalloproteins and enzymes. Despite its essentiality, high Cu levels in soils can cause phytotoxicity, restricting plant growth and can be harmful to the environment. Soil pollution by heavy metals (such as copper) is mainly caused by anthropogenic sources, such as atmospheric deposition of particulate matter and agricultural activities, and is one of the most worldwide environmental concerns. Due to its proximity with the emission sources, urban forest fragments are highly affected by the excessive input of heavy metals into the soil. Therefore, this study was conducted to assess morphological, physiological and biochemical responses of the native Atlantic Forest tree species (*Schinus terebinthifolia* Raddi and *Eugenia uniflora* L.) when cultivated in soils contaminated with increasing copper concentrations. The plants were cultivated in soils of an urban forest within São Paulo City, São Paulo State, Brazil contaminated with 0 (control), 60, 120, 180 or 240 mg Cu kg⁻¹ soil. Height and stem diameter were analyzed as morphological parameters, while Cu content in plant tissues, translocation index, bioaccumulation factor, photosynthetic pigment contents, leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence were measured to evaluate the physiological alterations by copper stress. Enzymatic (superoxide dismutase) and non-enzymatic (ascorbic acid and glutathione) antioxidants were quantified to assess the biochemical responses of the species. The results showed that when cultivated in copper contaminated soils, the species presented high uptake and accumulation of copper in roots with low translocation rates to aerial parts; however, *S. terebinthifolia* showed higher copper restriction in roots than *E. uniflora*. *S. terebinthifolia* and *E. uniflora* showed different responses to leaf gas exchange. The species showed no change in chlorophyll fluorescence or photosynthetic pigment content. The species also showed no difference for the levels of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *S. terebinthifolia* showed reduction in leaf biomass

production, while *E. uniflora* showed reduction in height growth. The species showed high tolerance and great capacity for Cu uptake. The restriction of copper in roots reveals to be the principal mechanism of protection of *S. terebinthifolia* and *E. uniflora* against copper stress. *S. terebinthifolia* shows potential to be indicated as a copper phytostabilizer.

Keywords: *Eugenia uniflora*, heavy metal, phytotoxicity, plant physiology, pollution, *Schinus terebinthifolia*, tree.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.....	Assimilação líquida de CO ₂	MSR.....	Massa Seca da Raiz
AA.....	Ácido Ascórbico reduzido	MST.....	Massa Seca Total
AA/AA+DHA.....	Capacidade de oxi-redução do Ácido Ascórbico	PAR.....	Radiação Fotossinteticamente Ativa
AA+DHA.....	Ácido Ascórbico total	pH.....	Potencial hidrogeniônico
ANOVA.....	Análise de Variância	SOD.....	Superóxido Dismutase
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>	SPAD....	Teor relativo de clorofila
Chl <i>a/b</i>	Razão Clorofila <i>a</i> / Clorofila <i>b</i>		
Chl <i>a+b</i>	Clorofila <i>a</i> + Clorofila <i>b</i>		
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>		
Ci.....	Concentração de carbono intercelular		
Cu.....	Cobre		
Cu ⁺	Íon cuproso		
Cu ²⁺	Íon cúprico		
DHA.....	Ácido Ascórbico oxidado		
<i>E</i>	Transpiração foliar		
EROs.....	Espécies Reativas de Oxigênio		
F ₀	Fluorescência inicial		
F _b	Fator de bioacumulação		
F _m	Fluorescência máxima		
F _v	Fluorescência variável		
F _v /F _m	Rendimento quântico máximo do fotossistema II		
<i>gs</i>	Condutância estomática		
GSH.....	Glutathione reduzida		
GSH/GSH+GSSG	Capacidade de oxi-redução da Glutathione		
GSH+GSSG.....	Glutathione total		
GSSG.....	Glutathione oxidada		
IRGA.....	Analisador de Gás Infravermelho		
It.....	Índice de translocação		
M.O.....	Matéria Orgânica		
MFC.....	Massa Fresca do Caule		
MFF.....	Massa Fresca das Folhas		
MFR.....	Massa Fresca da Raiz		
MFT.....	Massa Fresca Total		
MSC.....	Massa Seca do Caule		
MSF.....	Massa Seca das Folhas		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura e umidade na casa de vegetação durante a condução do experimento.....	10
Figura 2. Curvas de luz obtidas em indivíduos saudáveis de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i> .	13
Figura 3. Teores de cobre nos solos cultivados com <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	17
Figura 4. Concentração de cobre em folhas novas, folhas velhas, caule e raízes de <i>S. terebinthifolia</i> (a) e <i>E. uniflora</i> (b).....	20
Figura 5. Assimilação líquida de CO ₂ (a), condutância estomática (b), transpiração foliar (c), concentração de carbono intercelular (d) de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	28
Figura 6. Fluorescência da clorofila de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	30
Figura 7. Altura e diâmetro de <i>S. terebinthifolia</i> (a-b) e <i>E. uniflora</i> (c-d).....	33
Figura 8. Massa fresca das folhas (MFF), caule (MFC), raízes (MFR) e total (MFT) de <i>S. terebinthifolia</i> (a-d) e <i>E. uniflora</i> (e-h).	34
Figura 9. Massa seca das folhas (MSF), caule (MSC), raízes (MSR) e total (MST) de <i>S. terebinthifolia</i> (a-d) e <i>E. uniflora</i> (e-h).	35
Figura 10. Concentração de ácido ascórbico nas formas reduzida (a), oxidada (b) e total (c), glutathiona nas formas reduzida (e), oxidada (f) e total (g), e potencial de oxirredução do ácido ascórbico (d) e glutathiona (h) de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	38
Figura 11. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição inicial do solo do utilizado no experimento.	8
Tabela 2. Balanço iônico das soluções nutritivas de Hoagland & Arnon modificadas com 0, 60, 120, 180 ou 240 mg Cu kg ⁻¹	9
Tabela 3. Índice de translocação e fator de bioacumulação de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	23
Tabela 4. Teor relativo de clorofila e concentração de pigmentos fotossintéticos de <i>S. terebinthifolia</i> e <i>E. uniflora</i>	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hipóteses	7
1.2. Objetivos.....	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Descrição da área de estudo.....	8
2.2. Caracterização das plantas utilizadas	8
2.3. Condução do experimento	9
2.4. Biometria e Biomassa.....	10
2.5. Análise do solo	11
2.6. Concentração de cobre nos tecidos vegetais.....	11
2.7. Índice de translocação (It) e Fator de bioacumulação (Fb)	11
2.8. Teor relativo de clorofila (SPAD)	12
2.9. Concentração de pigmentos fotossintéticos.....	12
2.10. Trocas gasosas foliares	12
2.11. Fluorescência da clorofila.....	13
2.12. Antioxidantes.....	14
2.12.1. Ácido Ascórbico	14
2.12.2. Glutathione.....	15
2.12.3. Superóxido dismutase (SOD)	15
2.13. Delineamento experimental e análise estatística	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Teores de cobre no solo	17
3.2. Concentração de cobre nos tecidos vegetais.....	19
3.3. Índice de translocação (It) e Fator de bioacumulação (Fb)	22
3.4. Teor relativo de clorofila (SPAD) e concentração de pigmentos fotossintéticos.....	25
3.5. Trocas gasosas foliares	27
3.6. Fluorescência da clorofila.....	30
3.7. Biometria e Biomassa.....	32
3.8. Antioxidantes.....	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados são elementos químicos amplamente distribuídos na crosta terrestre, derivados de rochas vulcânicas, sedimentares ou metamórficas (DalCorso *et al.* 2019). Por meio de processos pedogênicos e de intemperismo, esses elementos são incorporados no sistema solo. Dependendo de fatores temporais, do tipo de rocha matricial, presença de matéria orgânica e atividade geológica, a concentração dos metais pesados pode variar nos solos naturais (Ding *et al.* 2017, Li *et al.* 2019a). Entre os metais pesados presentes no solo, estão o Cádmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni), Chumbo (Pb), Antimônio (Sb) e Zinco (Zn) (Marsola *et al.* 2005).

Determinados metais pesados são elementos essenciais para os organismos vivos, pois estão diretamente ou indiretamente relacionados com as atividades metabólicas (Mishra *et al.* 2019). O elemento químico para ser classificado como essencial (nutriente), deve atender a três requisitos básicos: ser requerido para o completo ciclo de vida do vegetal, não ser substituído totalmente por outro elemento e ter efeito direto no metabolismo vegetal (Barker & Pilbeam 2015). Dentre os metais pesados, o cobre é elemento essencial requerido em baixas concentrações (micronutriente) pelas plantas. Quimicamente, o cobre é classificado como metal de transição redox-ativo e encontrado em três formas de oxidação: cobre puro (Cu) na forma metálica ou nas formas iônicas nos estados cuproso (Cu^+) ou cúprico (Cu^{2+}). Na condição de micronutriente vegetal, o cobre é encontrado nas formas iônicas (Cu^+ ou Cu^{2+}) (Mustafa & AlSharif 2018) e a concentração média de cobre nos tecidos vegetais é de 5-20 mg Cu kg⁻¹ massa seca (Barker & Pilbeam 2015). Em concentrações adequadas, cobre desempenha papel fundamental em diversas reações fisiológicas e bioquímicas necessárias para o desenvolvimento e crescimento vegetal (Kabata-Pendias 2011, Shabbir *et al.* 2020). O cobre é requerido em diversos sítios celulares como no citosol, no retículo endoplasmático, nas membranas internas da mitocôndria, no lúmen dos tilacóides, no estroma dos cloroplastos e no apoplasto (Yruela 2009). O cobre também está envolvido na biossíntese de pigmentos

fotossintéticos e lignificação de tecidos (Broadley *et al.* 2012), na assimilação de CO₂ e respiração celular com produção de ATP (Marques *et al.* 2018), na regulação da permeabilidade da parede celular e sinalização hormonal (Caroli *et al.* 2020), na participação em reações redox e proteção contra o estresse oxidativo (Rehman *et al.* 2019). Além disso, é constituinte de proteínas do sistema fotossintético (plastocianina), da cadeia de transporte de elétrons (citocromo oxidase), bem como de enzimas antioxidantes (Cobre-Zinco Superóxido dismutase - CuZnSOD) (Zeng *et al.* 2019).

De forma geral, a concentração de cobre nos solos florestais é baixa, com concentração média de 30 mg kg⁻¹ (Barker & Pilbeam 2015). Porém, nos últimos anos, o acúmulo de cobre nos solos de regiões florestais, rurais e urbanas tem se tornado preocupação ambiental crescente em todo o mundo (Rehman *et al.* 2019). O crescimento das atividades antrópicas é o principal causador do aumento na concentração dos metais pesados no solo (Kabata-Pendias 2011). As principais fontes antropogênicas de cobre incluem mineração, refinaria, combustão de combustível fóssil, incineração de resíduos, resíduos industriais, descarte incorreto de esgoto e uso de fertilizantes/agrotóxicos nos solos agrícolas (Mishra *et al.* 2019, Kumar *et al.* 2020, Shabbir *et al.* 2020). A aplicação de produtos químicos à base de cobre, como fertilizantes inorgânicos e fungicidas cúpricos, destaca-se como uma das principais fontes do aumento das concentrações de cobre em solos agrícolas (Husak 2015, Dogra *et al.* 2020). Além dos fertilizantes inorgânicos, o cobre é quantitativamente o principal elemento traço envolvido na contaminação de solos agrícolas que recebem correções nutricionais via fertilizantes orgânicos (Senesi *et al.* 1999, Laurent *et al.* 2019). A extensa utilização e contaminação do solo com excesso de metais pesados oriundos de diversas fontes poluidoras antrópicas são uma preocupação em solos agrícolas, ecossistemas naturais, visto que esses elementos não são degradados em subprodutos menos tóxicos por meios físico, químicos ou biológicos (Mishra *et al.* 2019). Ainda, a entrada excessiva de metais pesados como o cobre no meio ambiente, pode levar à bioacumulação e se tornar ameaça à segurança da cadeia alimentar e saúde humana,

visto que esses elementos são progressivamente acumulados nos seres de maior nível trófico, efeito conhecido como magnificação trófica (Farias *et al.* 2018, Rai *et al.* 2019).

A contaminação do solo por metais pesados é problema crescente em todos os ecossistemas terrestres, sendo ainda mais pronunciado nos ambientes influenciados diretamente por atividades humanas altamente poluentes, como em fragmentos florestais urbanos (Argyraki *et al.* 2018, Li *et al.* 2019a). Fragmentos florestais urbanos são remanescentes de florestas nativas e secundárias inseridas no ambiente urbano, que possuem significativa importância na manutenção dos serviços ecossistêmicos, conservação da biodiversidade, habitat de diversas espécies vegetais (Long *et al.* 2019) e atenuadores de poluição atmosférica (Alarsa *et al.* 2018, Bulbovas *et al.* 2020). Devido à proximidade com as fontes emissoras, fragmentos florestais urbanos sofrem fortes influências negativas destas atividades poluidoras, sendo a deposição atmosférica de material particulado carregado com metais pesados um dos problemas mais expressivos (Ferreira *et al.* 2019). Indústrias e a frota automotiva destacam-se como as principais fontes emissoras de material particulado na atmosfera que atingem os fragmentos florestais urbanos em diferentes compartimentos e intensidade (Domingos *et al.* 2015, Ferreira *et al.* 2019). De acordo com a distância entre o centro do fragmento florestal e a cidade que o contorna, os níveis poluentes no solo do fragmento podem variar de forma significativa, sendo em média mais elevados nas regiões de borda e menos concentrados no centro do fragmento, devido ao amortecimento da vegetação (Trammell *et al.* 2011). Com isso, espécies arbóreas presentes em remanescentes florestais urbanos podem apresentar alterações no estado nutricional e problemas no desenvolvimento devido à poluição (Bulbovas *et al.* 2020).

Embora o cobre seja elemento essencial, em elevadas concentrações o Cu pode causar toxidez e induzir efeitos adversos na morfologia, fisiologia e bioquímica das plantas. De forma geral, a raiz é o principal órgão afetado pelo excesso de cobre. Devido ao acúmulo radicular, excesso de cobre pode causar danos ultraestruturais nas células radiculares (Souza *et al.* 2014) que resultam em diminuição na absorção de água e nutrientes pelas plantas (Conti *et al.* 2020,

Zaouali *et al.* 2020). Nas folhas, o excesso de cobre interfere negativamente na cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II (Jegerschoeld *et al.* 1995, Kabata-Pendias 2011), reduzem a biossíntese de pigmentos fotossintéticos e alteram a composição proteica das membranas fotossintéticas (Kumar *et al.* 2020). Ainda, substituição do Mg central da clorofila por cobre pode ocorrer em situações de toxidez, reduzindo/inviabilizando a atuação do pigmento no processo fotossintético de absorção de luz (Giroto *et al.* 2016). O impacto da toxicidade por cobre também se reflete nas trocas gasosas causando a redução da condutância e abertura estomática, impactando o processo de transpiração e captação de CO₂ (Taiz *et al.* 2017). Devido ao impacto negativo do excesso de cobre na fisiologia e bioquímica, as plantas apresentam sinais visíveis e morfológicos de toxidez, como redução na área, volume e comprimento, juntamente com engrossamento e escurecimento das raízes, além de redução da área foliar, na taxa de crescimento em altura e diâmetro (Singh *et al.* 2016) e diminuição na biomassa (Lange *et al.* 2017).

A toxidez causada pelo cobre pode ser responsável pela formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Saleem *et al.* 2020). EROs são moléculas formadas a partir do O₂ em eventos metabólicos que ocorrem principalmente nas mitocôndrias e cloroplastos - organelas envolvidas na respiração e fotossíntese - no qual o oxigênio está presente de forma expressiva (Karuppanapandian *et al.* 2011). Além de ser o subproduto dessas reações, as EROs possuem função de moléculas sinalizadoras de estresse (Singh *et al.* 2016). A produção e extinção de EROs são bem reguladas no metabolismo celular, entretanto, sob condições adversas como o excesso de metais pesados, pode ocorrer desequilíbrio entre a relação produção e neutralização de EROs, aumentando significativamente as concentrações dessas moléculas no meio intracelular (Barbosa *et al.* 2014). O aumento na produção de EROs, juntamente com a diminuição da eliminação destas moléculas, podem ocasionar estresse oxidativo e danos irreversíveis aos componentes celulares (Zeng *et al.* 2019). Por ser metal de transição redox ativo, o cobre pode induzir a formação de EROs diretamente via reações de Haber-Weiss e

Fenton; tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), causadores de danos em moléculas (DNA, proteínas) e em membranas celulares (Mahmud *et al.* 2019).

Algumas espécies vegetais adquiriram capacidade de tolerância à metais pesados podendo crescer em solos contaminados, e são utilizadas em técnicas naturais de fitorremediação onde atuam na remoção/aprisionamento de contaminantes do solo (Vendruscolo *et al.* 2018). Os mecanismos de tolerância das plantas à toxidez por cobre incluem: a combinação de processos morfológicos, como a redução no tamanho dos vasos xilemáticos e do número de elementos de vaso e feixes vasculares (Marques *et al.* 2019); fisiológicos como compartimentalização dos íons de cobre no vacúolo, controle de pH da rizosfera, exsudação de compostos orgânicos e quelação intercelular (Souza *et al.* 2011, Kumar *et al.* 2020); e bioquímicos como aumento na atividade de compostos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Giampaoli *et al.* 2012). A expressão de moléculas antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD) e os antioxidantes não enzimáticos, ácido ascórbico (AA) e glutathiona (GSH), desempenham papel significativo na mitigação da toxicidade de cobre, sendo responsáveis pelo controle de radicais livres e eliminação de EROs (Sharma *et al.* 2019, Nualla-Ong *et al.* 2020, Saleem *et al.* 2020).

Para a restauração da vegetação em áreas degradadas pelo excesso de cobre, são necessárias espécies tolerantes a toxidade do solo contaminado. Devido ao dinamismo no crescimento e diferentes mecanismos de tolerância, espécies arbóreas apresentam características interessantes para a fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (Marco *et al.* 2016). *Schinus terebinthifolia* Raddi., conhecida popularmente como aroeira vermelha, é árvore pioneira da família Anacardiaceae, nativa da América do Sul. No Brasil, a espécie possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada de sul a nordeste do país em várias formações florestais, desde a restinga até a floresta semidecidual pluvial de locais mais interioranos (Lorenzi 2016). A espécie tem importância medicinal e farmacológica devido às

suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Ademais, a espécie apresenta potencial econômico, devido à procura de seus frutos na culinária, sendo utilizados como condimento (Estevão *et al.* 2017). *S. terebinthifolia* é amplamente utilizada em programas de restauração de áreas degradadas, uma vez que apresenta alta produção de biomassa e crescimento, possui capacidade de tolerância à estresses abióticos e os frutos atraem avifauna. Além disso, *S. terebinthifolia* é recomendada para o paisagismo urbano devido à beleza ornamental, rusticidade e pequeno porte (Lorenzi 2016). *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como Pitangueira, é espécie arbórea não pioneira (secundária inicial) pertencente à família Myrtaceae, nativa da Mata Atlântica e de outros biomas brasileiros próximos. Por possuir frutos comestíveis, é amplamente utilizada com viés comercial, além de ser empregada no paisagismo urbano de forma expressiva pelo pequeno porte, beleza ornamental e fácil cultivo (Bezerra *et al.* 2018). *E. uniflora* apresenta porte pequeno, além de crescimento e produção de biomassa relativamente lentos. Devido a fácil adaptação em variados ambientes e atração da avifauna, *E. uniflora* é também utilizada em programas de restauração (Beise *et al.* 2017).

A maioria dos estudos recentes sobre morfologia, fisiologia, respostas bioquímicas e possibilidade de uso de plantas em fitorremediação em solos contaminados com cobre, são realizados com espécies de interesse agrícola/alimentício convencionais (Li *et al.* 2019b, Zeng *et al.* 2019, Saleem *et al.* 2020, Zaouali *et al.* 2020). Contudo, as atividades fisiológicas e bioquímicas das plantas em resposta ao excesso de cobre no solo são ainda pouco compreendidas em diversas espécies arbóreas florestais nativas de ecossistemas tropicais, em especial espécies da Mata Atlântica. Neste sentido, o presente estudo foi delineado com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o tema. Ainda, tendo em vista a recente declaração do período 2021-2030 como a “década da restauração ambiental” (ONU-PNUMA, 2021), o presente estudo traz à luz sugestões de espécies nativas potencialmente aptas à serem indicadas em programas de restauração florestal de áreas contaminadas e altamente antropizadas.

1.1. Hipóteses

I - O aumento dos teores de cobre na solução nutritiva aplicadas durante o cultivo das espécies causará efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento das espécies pioneira *S. terebinthifolia* e não pioneira *E. uniflora*.

II - As espécies *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*, por terem dinâmica de crescimento diferente, deverão responder diferentemente em relação à contaminação por cobre.

1.2. Objetivos

- Avaliar se a contaminação do solo por cobre causa alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas espécies *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*;
- Avaliar se *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentam mecanismos de tolerância e resistência ao excesso de cobre no solo;
- Considerar se *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* possuem potencial para serem recomendadas na recomposição florestal de áreas degradadas pelo excesso de cobre no solo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição da área de estudo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica (23°30'S e 46°40'W), São Paulo, SP, localizado a cerca de 770 metros acima do nível do mar. O Instituto de Botânica se situa dentro do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), na zona Sul da cidade de São Paulo.

2.2. Caracterização das plantas utilizadas

Foram utilizadas mudas da espécie pioneira *Schinus terebinthifolia* (“Aroeira-vermelha”) (em média, com 46,2 cm altura, 4,8 mm diâmetro, 1,33 g massa fresca das folhas, 4,56 g massa fresca do caule, 4,56 g massa fresca da raiz, 0,33 g massa seca das folhas, 1,67 g massa seca do caule e 0,83 g massa seca da raiz) e não pioneira *Eugenia uniflora* (“Pitangueira”) (em média, com 46,7 cm altura, 4,2 mm diâmetro, 1,57 g massa fresca das folhas, 4,68 g massa fresca do caule, 3,42 g massa fresca da raiz, 0,66 g massa seca das folhas, 2,62 g massa seca do caule e 2,18 g massa seca da raiz), ambas nativas da Mata Atlântica. As mudas em tubetes foram obtidas na Unidade de Produção de Mudas da CESP (Companhia Energética de São Paulo), Paraibuna, SP. As plantas no início da experimentação foram transplantadas para vasos de 2,6 L contendo solo do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) (Tabela 1) coletado na camada de 0-40 cm de profundidade. O solo do PEFI utilizado no experimento é caracterizado como latossolo vermelho-amarelo, constituído por material mineral altamente intemperizado, pH ácido (< 7,0), pouco argiloso e com teores médios de matéria orgânica (Nakazato et al. 2021).

Tabela 1. Composição inicial do solo do utilizado no experimento.

pH	M.O.	P _{resina}	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmol _c dm ⁻³ -----			-----mg dm ⁻³ -----								
5,1	42,0	5,5	33,6	1,6	50,7	9,6	61,9	95,5	64,8	0,6	1,3	25,7	21,3	9,0

2.3. Condução do experimento

Após o transplante, as plantas foram colocadas em casa de vegetação, ficando 1 mês em aclimatação. A experimentação foi iniciada com a aplicação no solo de 75 ml da solução de Hoagland & Arnon n. 1 (Hoagland & Arnon, 1950) modificada com 0, 60, 120, 180 ou 240 mg de cobre por quilo de solo seco (mg Cu kg^{-1}) na forma de sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). As concentrações de cobre foram baseadas no valor de prevenção (60 mg Cu kg^{-1} solo seco) orientados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo para cobre no solo (CETESB 2016). Foi realizado balanço iônico das soluções (Tabela 2), visando manter as concentrações de macro e micronutrientes constantes. o pH da solução foi mantido em 5,8 de forma a não modificar as características de complexação e absorção de cobre em comparação com o solo natural. As plantas foram semanalmente irrigadas com $\frac{1}{4}$ da concentração total, repetindo-se quatro vezes o procedimento para obtenção dos valores totais de cobre no solo. Irrigações com 75 ml de água destilada foram realizadas nos intervalos dos tratamentos. O tratamento no qual não foi adicionado cobre (0 mg Cu kg^{-1}) foi designado como o tratamento controle.

Tabela 2. Balanço iônico das soluções nutritivas de Hoagland & Arnon modificadas com 0, 60, 120, 180 ou 240 mg Cu kg^{-1} .

Fonte do íon	Tratamentos (mg Cu kg^{-1})				
	0	60	120	180	240
	Íons liberados (mmol L^{-1})				
$\text{NH}_4^+ - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	18	13,65669	9,313379	4,970069	0,626759
$\text{NH}_4^+ - \text{NH}_4\text{NO}_3$	1	3,171655	5,34331	7,514966	9,686621
$\text{NO}_3^- - \text{NH}_4\text{NO}_3$	1	3,171655	5,34331	7,514966	9,686621
$[\text{NH}_4^+] + [\text{NO}_3^-]$	20	20	20	20	20
$\text{SO}_4^{2-} - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9	6,828345	4,65669	2,485034	0,313379
$\text{SO}_4^{2-} - \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0	2,171655	4,34331	6,514966	8,686621
$[\text{SO}_4^{2-}]$	9	9	9	9	9
$\text{Cu}^{2+} - \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0	2,171655	4,34331	6,514966	8,686621
$[\text{Cu}^{2+}]$	0	2,171655	4,34331	6,514966	8,686621

O experimento teve a duração de 120 dias, nas estações de primavera e verão (setembro a dezembro de 2019), com 26 °C de temperatura média e 56% umidade relativa do ar dentro da casa de vegetação (Figura 1). Dados coletados de manhã e ao final da tarde duas vezes na semana utilizando do termômetro com higrômetro portátil (Tomate Modelo: PD-002). Todos os parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos foram mensurados ao final do experimento.

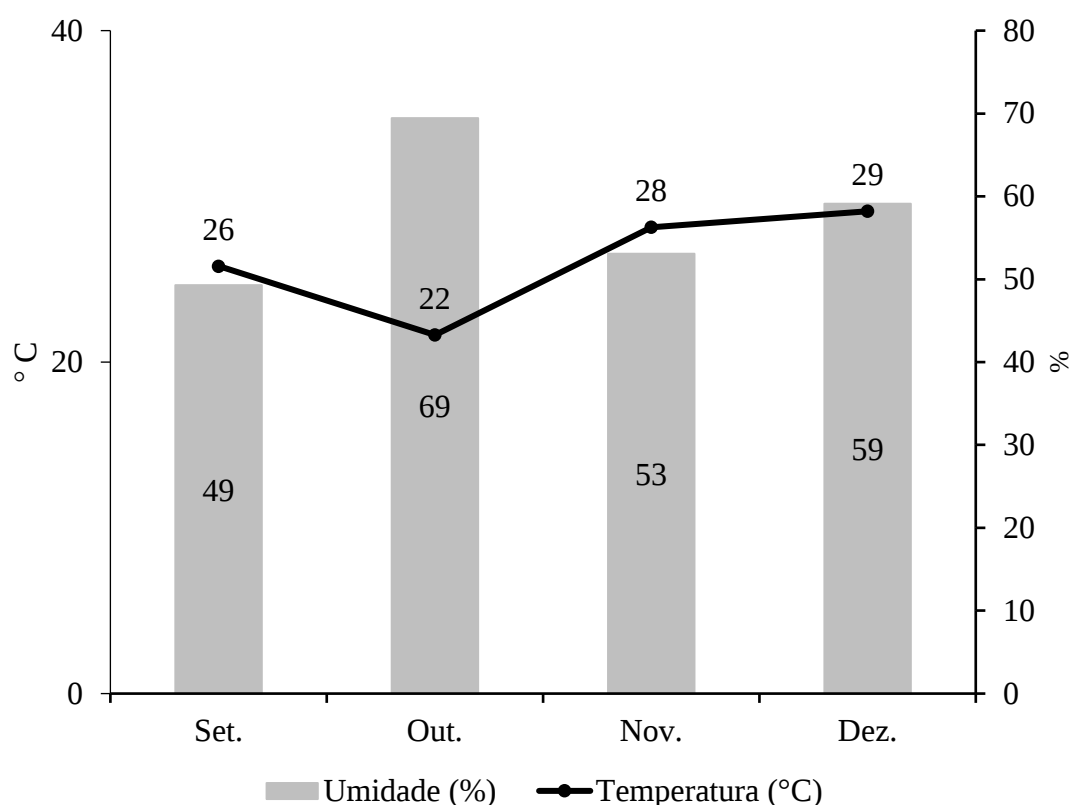


Figura 1. Temperatura e umidade na casa de vegetação durante a condução do experimento.

2.4. Biometria e Biomassa

As plantas foram mensuradas quanto à altura (cm) e diâmetro do caule (mm). Para a medição em altura foi utilizada régua graduada em centímetros, medindo da base do caule (solo) ao ápice da planta. O diâmetro foi medido na base do caule utilizando-se paquímetro digital. Para medição da biomassa, as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas em água corrente, em seguida seccionadas em folhas, caule e raízes. Os valores dos pesos da massa

fresca das folhas (MFF), caule (MFC), raízes (MFR) e total (MFT) foram obtidos com pesagem em balança digital. Posteriormente, foram colocadas em sacos de papel Kraft identificados e secas em estufa a 60 °C até peso constante, para a determinação do peso da massa seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR) e total (MST).

2.5. Análise do solo

Amostras mistas do solo de cada tratamento foram homogeneizadas, secas em estufa a 60 °C até peso constante e enviadas ao laboratório de Nutrição Mineral em Plantas – UNESP, Botucatu, SP. A concentração de cobre disponível no solo (mg Cu dm^{-3} solo) foi determinada em espectrofotometria de absorção atômica em chama (FAAS) após extração em solução de DTPA ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$ Ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ trietanolamina, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)) em pH 7,3 (Raij *et al.* 2001).

2.6. Concentração de cobre nos tecidos vegetais

As folhas velhas (localizadas abaixo da região central do caule e já presentes nas plantas no momento da aplicação das soluções nutritivas), folhas novas (localizadas na região apical que cresceram durante o período experimental), caules e raízes, após secas em estufa até peso constante, foram triturados em moinho de facas para a obtenção de pó homogêneo. As amostras vegetais foram também enviadas ao laboratório de Nutrição Mineral em Plantas em Botucatu. A concentração de cobre nos tecidos (mg Cu kg^{-1} massa seca) foi determinada em espectrofotometria de absorção atômica em chama (FAAS) após digestão em solução nitro perclórica (Malavolta *et al.* 1997).

2.7. Índice de translocação (It) e Fator de bioacumulação (Fb)

A partir dos dados obtidos do teor nutricional das partes vegetativas das plantas, foi estabelecido o índice de translocação e o fator de bioacumulação dos minerais para as espécies. O Índice de Translocação (It) foi determinado dividindo-se a concentração de cobre no caule e folhas (mg Cu kg^{-1} massa seca) pelo conteúdo de cobre nas raízes (mg Cu kg^{-1} massa seca): Cu

$parte\ aérea / Cu_{raiz}$ (Vendruscolo *et al.* 2018). O Fator de bioacumulação (Fb) foi estimado através da fração entre a concentração de cobre nas raízes ($mg\ Cu\ kg^{-1}$ massa seca) sobre a concentração de cobre no solo ($mg\ Cu\ kg^{-1}$ solo): Cu_{raiz} / Cu_{solo} (Zang *et al.* 2020).

2.8. Teor relativo de clorofila (SPAD)

Para a determinação do teor relativo de clorofila utilizou-se o clorofilômetro manual SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Konica Minolta). As medidas foram realizadas na 3ª folha totalmente expandida (contando-se do ápice para a base) de todas as plantas de cada espécie, em triplicata. Os valores obtidos foram expressos na forma de índice SPAD (Amarante *et al.* 2008).

2.9. Concentração de pigmentos fotossintéticos

Foram removidos três discos ($\varnothing = 0,5\ cm$, $n = 10$) da região central da folha, evitando-se as nervuras, nos quais foram determinadas a massa fresca ($\approx 0,02\ g$). Os teores de pigmentos (clorofilas *a* e *b*, e carotenoides) foram determinados a partir das amostras imersas em 2,5 ml de DMF (Dimetilformamida) mantidas no escuro por 24 h. As soluções foram analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda $\lambda = 664\ nm$ (clorofila *a*), $647\ nm$ (clorofila *b*), $480\ nm$ (carotenoides) e $750\ nm$ (residual). A partir dos valores de absorbância obtidos, foram calculadas as concentrações de clorofilas *a* (Chl *a*) e *b* (Chl *b*), carotenoides, clorofila total (Chl *a* + *b*) e razão de clorofila (Chl *a/b*), expressas em $\mu g\ g^{-1}$ de massa de matéria fresca (Minocha *et al.* 2009).

2.10. Trocas gasosas foliares

Os parâmetros de trocas gasosas analisados foram a assimilação líquida de CO_2 (*A*) ($\mu mol\ de\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$), transpiração foliar (*E*) ($mmol\ de\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$), condutância estomática (*gs*) ($mol\ de\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) e concentração de carbono intercelular (*Ci*) ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) (Barbosa *et al.* 2019). Os parâmetros foram analisados com a utilização do analisador de gás infravermelho – IRGA (LCpro+, ACD BioScientific Ltd., Herts, UK), em cinco plantas por

tratamento selecionadas aleatoriamente, totalizando 25 plantas analisadas para cada espécie. As medições ocorreram entre às 8 e 11 h, utilizando-se umidade relativa, CO₂ e temperatura do ar ambiente. A luminosidade utilizada para a análise da taxa de fotossíntese foi previamente estimada através do teste de curva de luz em um indivíduo saudável de cada espécie, não submetidos aos tratamentos (Figura 2). Foi determinado o valor máximo da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em 1.655 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *S. terebinthifolia* e 1.056 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *E. uniflora*.

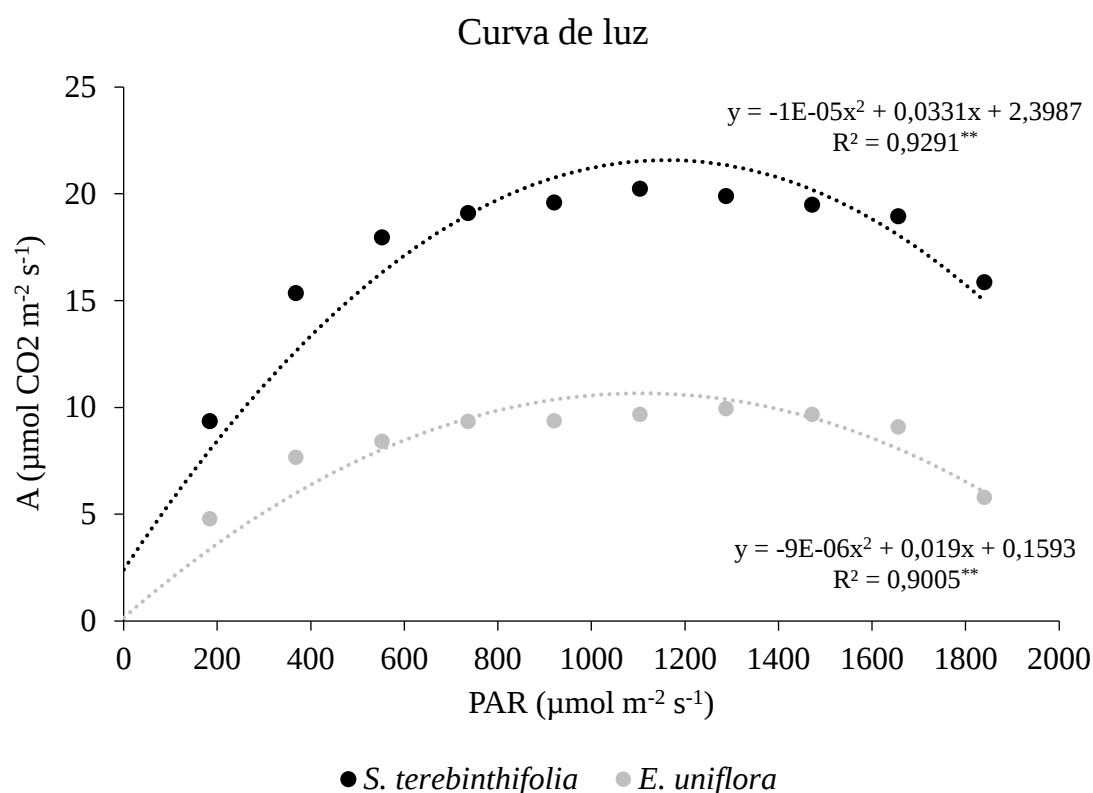


Figura 2. Curvas de luz obtidas em indivíduos saudáveis de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*.

2.11. Fluorescência da clorofila

O rendimento quântico máximo do fotossistema II, expresso através da razão F_v/F_m , foi determinado utilizando-se o fluorômetro portátil de pulso modulado OS5p (Opti-Sciences, Hudson, USA) nas mesmas plantas utilizadas para a medição das trocas gasosas e condutância estomática. As áreas foliares analisadas foram submetidas a 30 minutos de escuro e em seguida tiveram a razão F_v/F_m mensurada (Campostrini 2001).

2.12. Antioxidantes

Foram retiradas amostras compostas de folhas localizadas na porção mediana do caule principal das plantas de cada tratamento ($n = 25$). As folhas foram pesadas em balança analítica para obtenção da biomassa fresca e, posteriormente, trituradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises de antioxidantes.

2.12.1. Ácido Ascórbico

Foram quantificadas as formas: reduzida (AA), oxidada (DHA) e total (AA+DHA) de ácido ascórbico (mg g^{-1} massa fresca da folha). O material vegetal (250 mg folhas) foi triturado com 6 ml de ácido metafosfórico (HPO_3) em misturador mecânico. O extrato foi centrifugado à 10.000 rpm ($11.393,4 \times g$), por 15 minutos à $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi coletado, filtrado ($20\text{ }\mu\text{m}$) e transferido para tubos de ensaio. A amostra principal foi separada em 2 sub-amostras, que foram utilizadas para obtenção dos valores de AA e AA+DHA. Para a quantificação do ácido ascórbico reduzido (AA), 4 ml de água tipo 1 (ultra pura) foram adicionados na amostra principal. O extrato foi filtrado em filtros tipo Millex ($0,22\text{ }\mu\text{m}$) e analisado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector UV ($\lambda = 245\text{ nm}$), em coluna C18, com vazão de $1,00\text{ mL min}^{-1}$, utilizando-se fase móvel solução aquosa acidificada (pH 2,3) com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). Para análise do ácido ascórbico total (AA+DHA), adicionou-se 200 μl dithiothreitol (DTT) em tampão de fosfato de sódio pH 7,0 e fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4) mantidos por 20 minutos no escuro, à amostra principal para a redução total do DHA para AA. Após a redução, adicionou-se 200 μl de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) + 3,5 ml de água tipo 1 (ultra pura). O extrato foi filtrado e realizada a leitura do mesmo modo ao AA. O conteúdo de DHA foi calculado pela subtração entre total e reduzido (López *et al.* 2005). Foram calculadas as razões AA/AA+DHA para avaliar a capacidade de oxirredução do ácido ascórbico (Burkey *et al.* 2006).

2.12.2. Glutathiona

Foram quantificadas as formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH+GSSG) da glutathiona (mg g^{-1} massa fresca da folha). O material vegetal (500 mg folha) foi preparado com 3 ml de solução de ácido sulfosalicílico (0,1%) em misturador mecânico. O extrato foi centrifugado à 11.000 rpm ($13.786 \times g$), por 20 minutos à 4 °C, coletado o sobrenadante e transferido para tubos de ensaio. O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi obtido adicionando-se 1,75 ml de solução EDTA + 100 μl de solução DTNB (ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)) 3 mM à 250 μl de extrato. A amostra foi mantida na luz por 5 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 412 \text{ nm}$). Na amostra utilizada para obtenção do GSH, foram adicionados 4 ml de glutathiona redutase + 100 μl de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida) 0,4 mM. A amostra foi mantida na luz por 20 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 412 \text{ nm}$), obtendo-se a glutathiona total (GSH total). O conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) foi calculado pela subtração entre GSH total e GSH reduzida. Também foram calculadas as razões GSH/GSH+GSSG, com a finalidade de determinar a capacidade de oxirredução da glutathiona (Szalai 2009).

2.12.3. Superóxido dismutase (SOD)

O material vegetal (400 mg folhas) foi homogeneizado com 15 mg de PVPP (polivinil polipirrolidona) 0,5% e solução extração (tampão fosfato 50 mM pH 7,5 contendo EDTA- Na_2 1 mM, NaCl 50 mM e ácido ascórbico 1 mM) em misturador mecânico. O extrato foi centrifugado à 10.000 rpm à 2 °C, por 25 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de ensaio. A amostra principal foi separada em 2 sub-amostras. Na primeira, aos extratos foram adicionados 500 μl EDTA- Na_2 0,54 mM, 500 μl metionina 0,13 mM, 800 μl tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, 500 μl NBT (azul p-nitrotetrazolio) 0,44 mM e 200 μl riboflavina 1 mM e exposta a luz fluorescente (80 W) por 60 min. Na segunda subamostra, o extrato foi preparado seguindo o mesmo procedimento, porém as amostras foram mantidas no escuro pelo mesmo período. Em espectrofotômetro ($\lambda = 560 \text{ nm}$), foi medida a diferença

entre as absorbâncias do extrato exposto à luz fluorescente (amostra) e o mantido no escuro (branco). A atividade da SOD foi determinada pela diferença entre as absorbâncias, que se baseia na inibição da redução do NBT pela dismutação enzimática do superóxido. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima SOD que cause 50% de inibição da redução de NBT (Zeng *et al.* 2019).

2.13. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, composto por 5 blocos com 5 tratamentos e 20 plantas por parcela, totalizando 100 plantas de cada espécie. Os dados foram submetidos à análise de variância de 2 fatores (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para avaliação das diferenças entre tratamentos e espécies, utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.7. Os parâmetros de trocas gasosas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de análises de regressão ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de cobre no solo

Os teores de cobre no solo (mg Cu dm^{-3}) ao final do experimento foram 4,1; 11,3; 21,6; 25,6 e 31,2 (*S. terebinthifolia*) e 2,2; 9,0; 17,8; 23,8 e 28,3 (*E. uniflora*) nos tratamentos 0, 60, 120, 180 ou 240 (mg Cu kg^{-1}) respectivamente (Figura 3), mostrando o aumento na concentração de cobre no solo, com o aumento da concentração de cobre na solução nutritiva. Os solos dos tratamentos 0 e 60 mg Cu kg^{-1} apresentaram os menores valores de cobre no solo de cultivo das espécies, não havendo diferenças entre os tratamentos ($p \geq 0,05$). As maiores concentrações de cobre foram observadas nos tratamentos 120, 180 e 240 mg Cu kg^{-1} no solo com *S. terebinthifolia*, enquanto no solo com *E. uniflora* as maiores concentrações de cobre foram observadas nos tratamentos 180 e 240 mg Cu kg^{-1} . Não houve diferença estatística para as concentrações de cobre no solo entre *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* em todos os tratamentos.

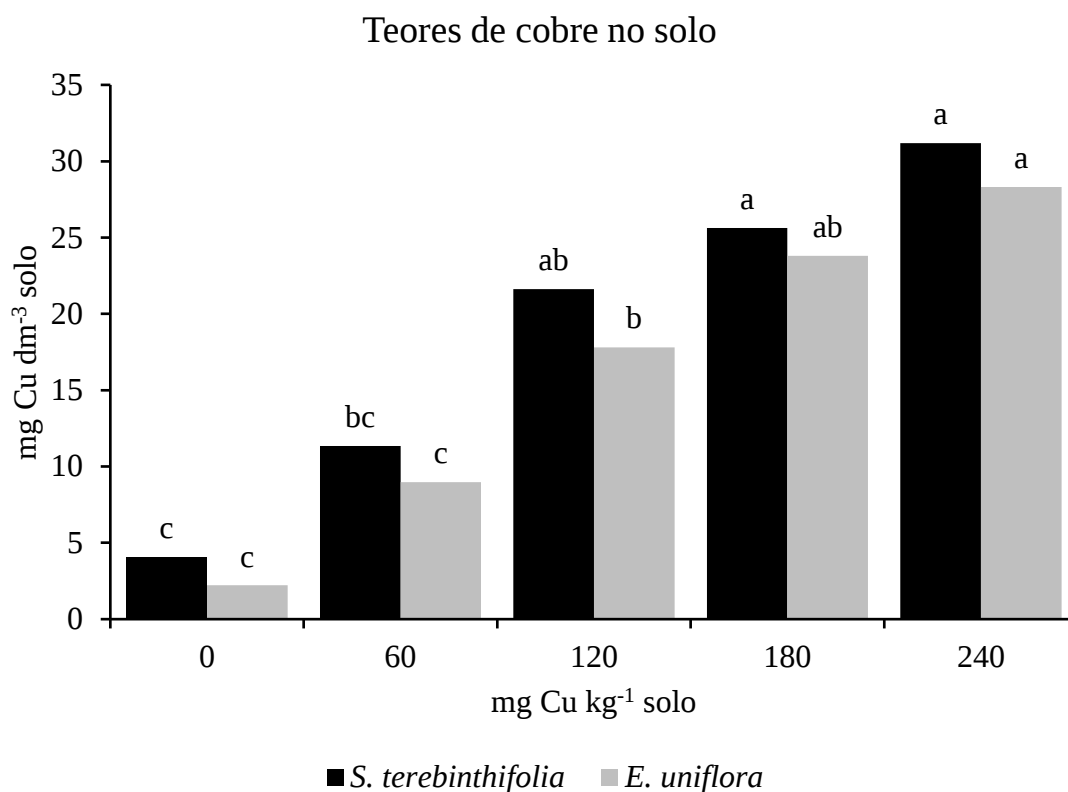


Figura 3. Teores de cobre nos solos cultivados com *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As concentrações de cobre no solo ao final do experimento apresentaram valores inferiores aos aplicados nos tratamentos e em relação ao valor de prevenção da CETESB (60 mg Cu kg⁻¹) para solos contaminados com cobre (CETESB 2016). A disponibilidade de cobre no solo é influenciada pelo tipo de solo, pH, teor de matéria orgânica, quantidade de partículas de argila, umidade do solo, temperatura, permeabilidade e, presença de diferentes íons metálicos e seus óxidos nos solos (Wang *et al.* 2015, Zhao *et al.* 2018, Campillo-Cora *et al.* 2020). O cobre é o metal pesado mais imóvel do sistema solo devido à sua alta afinidade pela matéria orgânica e óxidos de Fe e Mg, via processos de quelação e complexação, tornando-o insolúvel (Zhou *et al.* 2017). Além disso, os íons cúpricos são fortemente adsorvidos pelas partículas argilosas negativamente carregadas do solo, formando complexos orgânicos altamente estáveis (Taiz *et al.* 2017, Gonzaga *et al.* 2020). A presença de altas concentrações de matéria orgânica dissolvida no solo também aumenta o número de sítios de adsorção e tem como consequência aumento na imobilização do elemento e diminuição na atividade dos íons livres de Cu²⁺ (Laurent *et al.* 2019). Em contrapartida, o cobre em pH ácido (< 7,0) possui maior solubilidade e biodisponibilidade, sendo descomplexado da matéria orgânica e mantendo-se em condições iônicas (Cu²⁺), capaz de ser absorvido pelas raízes (Campillo-Cora *et al.* 2019). A diminuição do pH do solo, reduz o número de sítios negativos na superfície das partículas coloidais do solo, nas quais agregam-se os íons de cobre, resultando na diminuição da capacidade de retenção de íons pelo solo e aumento na sua mobilidade e disponibilidade (Gonzaga *et al.* 2020). A alta concentração de cobre em condições iônicas promovida pelo baixo pH, aumenta a biodisponibilidade e permite a absorção do elemento pelas raízes (Zhou *et al.* 2017). Portanto, devido às características do solo utilizado no experimento (ácido e pouco argiloso) favorecerem a biodisponibilidade do cobre (Nakazato *et al.* 2021), a maior parte do cobre adicionado ao solo foi absorvido pelas espécies e, e desta forma os valores finais foram inferiores aos aplicados, e também inferiores ao valor de referência estabelecido pela CETESB.

3.2. Concentração de cobre nos tecidos vegetais

Conforme esperado, *S. terebinthifolia* apresentou os menores valores de concentração de cobre nas raízes no tratamento controle (41,0 mg Cu kg⁻¹), enquanto os maiores valores foram observados nos tratamentos 180 e 240 mg Cu kg⁻¹ (88,3 e 84,3 mg Cu kg⁻¹, respectivamente) (Figura 4 a). *S. terebinthifolia* apresentou concentração de cobre significativamente maior nas raízes (41,0 – 88,3 mg Cu kg⁻¹), em comparação com as folhas novas (4,0 – 6,0 mg Cu kg⁻¹), folhas velhas (5,3 – 6,3 mg Cu kg⁻¹) e caule (4,0 – 6,3 mg Cu kg⁻¹) em todos os tratamentos. Não houve diferença na concentração de cobre entre folhas novas, folhas velhas e caule em todos os tratamentos.

Da mesma forma, *E. uniflora* também apresentou os menores valores de concentração de cobre nas raízes no tratamento controle (12,7 mg Cu kg⁻¹), enquanto os maiores valores foram observados nos tratamentos 120, 180 e 240 mg Cu kg⁻¹ (25,7; 33,7 e 34,3 mg Cu kg⁻¹, respectivamente) (Figura 4 b). *E. uniflora* não apresentou diferença entre tratamentos para as concentrações de cobre nas folhas novas, folhas velhas e caule. *E. uniflora* apresentou maior concentração de cobre nas raízes (25,7 mg Cu kg⁻¹) em comparação com o caule (13,0 mg Cu kg⁻¹) no tratamento 120 mg Cu kg⁻¹ e maior concentração de cobre nas raízes (33,7 e 34,3 mg Cu kg⁻¹) em comparação com folhas novas (19,0 e 18,3 mg Cu kg⁻¹), folhas velhas (18,7 e 20,7 mg Cu kg⁻¹) e caule (13,7 e 11,7 mg Cu kg⁻¹) nos tratamentos 180 e 240 mg Cu kg⁻¹. Comparando-se as duas espécies, *S. terebinthifolia* apresentou maior concentração de cobre nas raízes do que *E. uniflora* nos tratamentos 60, 120, 180 e 240 mg Cu kg⁻¹. Não houve diferença na concentração de cobre nas folhas novas, folhas velhas e caule entre as espécies, em todos os tratamentos.

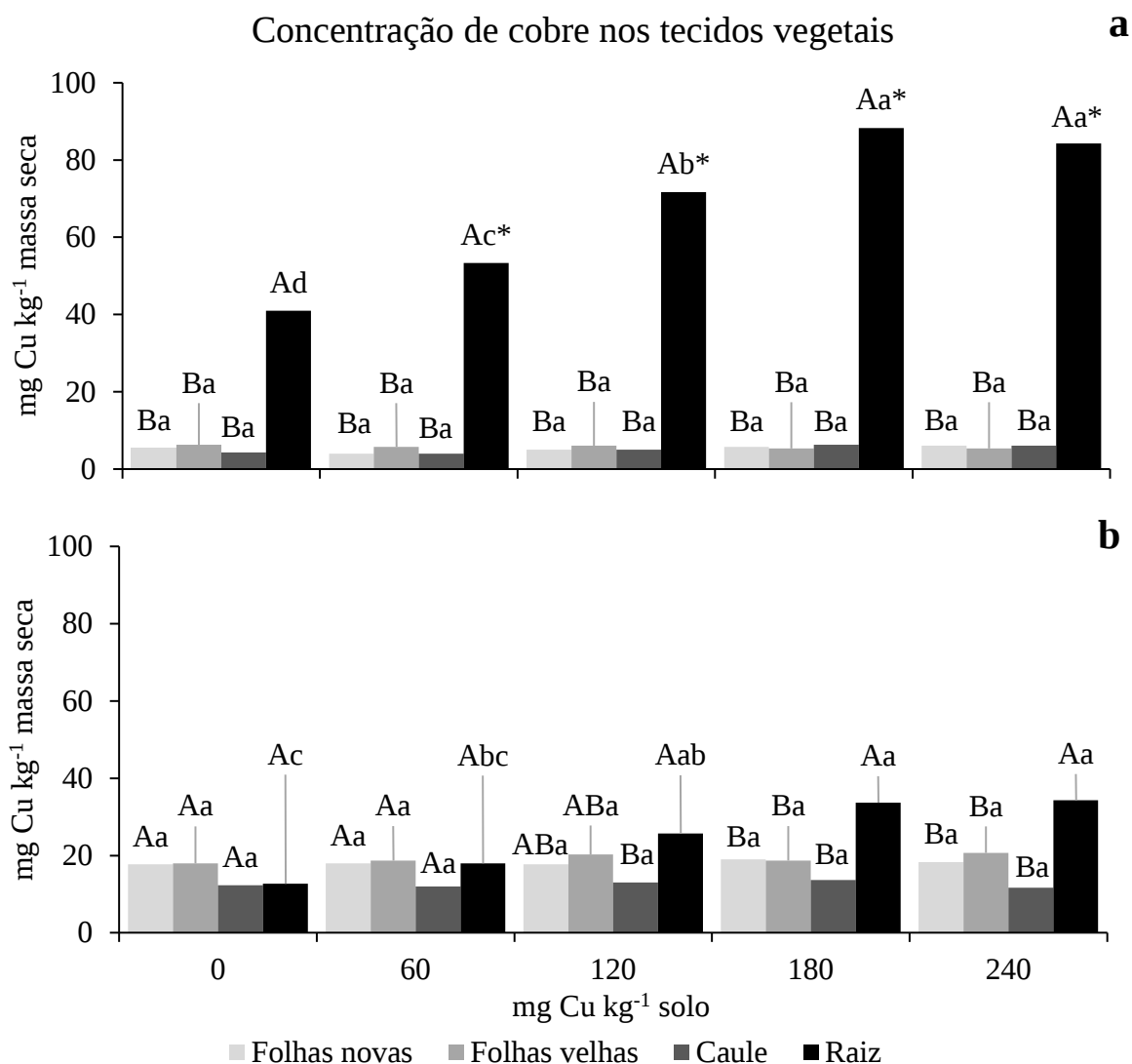


Figura 4. Concentração de cobre em folhas novas, folhas velhas, caule e raízes de *S. terebinthifolia* (a) e *E. uniflora* (b). Letras maiúsculas comparam entre órgãos e minúsculas entre tratamentos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Indica diferença entre as espécies dentro de cada órgão e tratamento.

S. terebinthifolia e *E. uniflora* apresentaram aumento na concentração de cobre nas raízes conforme aumento na concentração de cobre aplicada ao solo, sendo que a concentração de cobre no solo apresentou valores inferiores aos aplicados nos tratamentos ao final do experimento (Figura 3). Isso indica que, apesar de parte do cobre ter sido retido no solo (possivelmente na forma indisponível), a maior parte do cobre adicionado ao solo foi efetivamente absorvida pelas raízes de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*, e incorporado aos tecidos vegetais. O cobre do solo é absorvido via simplasto pelas plantas através das células epidérmicas da raiz, que em seguida o transferem para o córtex através do parênquima,

endoderme e xilema (Taiz *et al.* 2017). A absorção pode ser realizada através de difusão passiva simples através da membrana plasmática ou a partir do auxílio de diversos transportadores específicos de metais pesados localizados na membrana plasmática que trabalham em coordenação com outras moléculas transportadoras de metal (sequestradores, quelantes, e acompanhantes de cobre) (Printz *et al.* 2016, Comin *et al.* 2018). Os principais transportadores específicos envolvidos na captação, absorção e transporte de cobre são *P-type ATPase (HMA1-HMA8)*, *COPT/Ctr-like* e transportadores *ZIP*, além de transportadores não específicos da família *NRAMP* (Kumar *et al.* 2020).

Após a absorção, o cobre é acumulado nas células radiculares e, pouco ou nenhum aumento na concentração desse elemento nos demais órgãos é observado. Isso se deve pelas características das células que compõem o sistema radicular, que apresentam grupos moleculares de alta afinidade pelo cobre (como por exemplo, pectinas), que promovem acúmulo nas raízes e limitam a mobilidade através da planta (Colzi *et al.* 2012, Ambrosini *et al.* 2017). As espécies apresentaram acúmulo de cobre nas raízes, sendo que *S. terebinthifolia* apresentou maior acúmulo radicular que *E. uniflora*. Os resultados obtidos corroboram com Zabotto *et al.* (2020), no qual foi verificado que a espécie *S. terebinthifolia* apresenta elevado acúmulo de cobre na raiz, enquanto *E. uniflora* apresenta maior translocação para as folhas e menor acúmulo nas raízes. Tratando-se de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, devido à alta biodiversidade e distintas estratégias de crescimento e tolerâncias contra estressores ambientais, o acúmulo e retenção de cobre nas raízes ocorre em diferentes intensidades. Por exemplo, *Myracrodruon urundeuva* acumula elevadas concentrações de cobre nas raízes enquanto *Cedrela fissilis* apresenta maior translocação do metal para as folhas (Asensio *et al.* 2019). *Senna multijuga* acumula cerca de 3 vezes mais cobre nas raízes do que a espécie *Erythrina crista-galli* (Marco *et al.* 2016). A espécie pioneira *Bauhinia forficata* possui maior capacidade de acúmulo radicular de cobre do que a pioneira *Enterolobium contortisiliquum* e a não pioneira *Pterogyne nitens* (Silva *et al.* 2015). Portanto, o acúmulo radicular de cobre ocorre de forma

espécie-específica, podendo apresentar acúmulos divergentes entre espécies, principalmente entre espécies de diferentes grupos sucessionais, como *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*. Ainda, visto que as espécies absorveram o cobre adicionado ao solo e acumularam-no nas raízes, *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentam características favoráveis para serem indicadas em programas de restauração em ambientes contaminados com altas concentrações de cobre no solo.

3.3. Índice de translocação (It) e Fator de bioacumulação (Fb)

S. terebinthifolia apresentou os maiores valores de It no tratamento controle (0,26) e os menores valores nos tratamentos 120, 180 e 240 mg Cu kg⁻¹ (0,15; 0,13 e 0,14, respectivamente) (Tabela 3). *S. terebinthifolia* apresentou os maiores valores de Fb no tratamento 60 mg Cu kg⁻¹ (4,79) e os menores valores no tratamento 240 mg Cu kg⁻¹ (2,87) (Tabela 3). *E. uniflora* apresentou os maiores valores de It no tratamento controle (2,44) e os menores valores nos tratamentos 120, 180 e 240 mg Cu kg⁻¹ (1,25; 1,06 e 0,95, respectivamente). *E. uniflora* não apresentou diferenças para Fb entre tratamentos. *S. terebinthifolia* apresentou menor It e maior Fb que *E. uniflora* em todos os tratamentos.

Tabela 3. Índice de translocação e fator de bioacumulação de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*.

Espécie	Tratamentos (mg Cu kg ⁻¹)	Índice de translocação (It)	Fator de bioacumulação (Fb)
<i>S. terebinthifolia</i>	0	0,26 a	--
	60	0,17 ab	4,79 A a *
	120	0,15 b	3,55 A ab*
	180	0,13 b	3,48 A ab*
	240	0,14 b	2,87 A b*
<i>E. uniflora</i>	0	2,44 a *	--
	60	1,71 ab*	2,02 A a
	120	1,25 b*	1,57 A a
	180	1,06 b*	1,40 A a
	240	0,95 b*	1,22 A a

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Indica diferença entre as espécies dentro de cada tratamento.

S. terebinthifolia e *E. uniflora* apresentaram redução no Índice de Translocação com o aumento da concentração de cobre no solo; contudo foi possível observar que *S. terebinthifolia* apresentou menor translocação que *E. uniflora* em todos os tratamentos. Após a absorção radicular, o cobre pode ser transportado através do xilema nas formas iônicas Cu⁺ ou Cu²⁺ livre, mas geralmente é feito na forma complexada com metalotioneínas, nicotinamidas, histidinas, entre outros (Deng *et al.* 2013, Printz *et al.* 2016). A translocação eficiente do cobre das raízes para a parte aérea é realizada através do xilema por meio de transportadores específicos de metais pesados e proteínas de captação de cobre altamente seletivas (Printz *et al.* 2016). Em situações de toxidez, a translocação de cobre das raízes para as partes aéreas é limitada e o acúmulo ocorre no sistema radicular da maioria das espécies vegetais. A própria fitotoxidez do cobre pode ser responsável pela baixa translocação deste, pois o estresse causado pelo excesso de cobre causa alterações na funcionalidade das raízes, levando à redução na absorção de água e solutos do solo (Farias *et al.* 2018). Como resposta ao excesso de cobre no solo, algumas espécies vegetais podem apresentar alterações anatômicas no sistema radicular, como o aumento da área do apoplasto (espaço existente exteriormente à membrana plasmática)

(Ambrosini *et al.* 2015). O cobre possui forte interação com grupos tióis (-SH) de enzimas e proteínas presentes no apoplasto das células radiculares (Yruela 2009); portanto, a expansão da área apoplástica aumenta o número de grupos moleculares que interagem com o cobre, consequentemente ocasionando seu acúmulo nas raízes (Giroto *et al.* 2016).

Algumas espécies apresentam mecanismos ativos de retenção radicular e limitação na translocação de metais pesados para as partes aéreas, sendo essa capacidade indicativo de tolerância contra metais pesados (Vendruscolo *et al.* 2018). A restrição na translocação de cobre para a parte aérea em situações de toxicidade é o padrão de comportamento mais comum encontrado em diversas espécies de diferentes grupos funcionais e famílias botânicas (Tiecher *et al.* 2017, Marques *et al.* 2018, Li *et al.* 2019b, Torasa *et al.* 2019). A resposta é resultado de mecanismos de tolerância desenvolvidos contra os efeitos tóxicos causados pelo excesso de metais pesados, que buscam diminuir a mobilidade e evitar o transporte do metal para as partes aéreas que são mais sensíveis, preservando as atividades metabólicas, protegendo o aparato fotossintético, e mitigando potenciais efeitos prejudiciais no crescimento e desenvolvimento vegetal (Comin *et al.* 2018, Zeng *et al.* 2019). As principais estratégias de retenção radicular de cobre das plantas superiores são a quelação, sequestro e armazenamento dos íons de cobre no vacúolo (Klaumann *et al.* 2011, Kumar *et al.* 2020). Como *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentaram redução na translocação com o aumento de cobre no solo, isso evidencia que as espécies apresentam mecanismos eficientes de restrição do cobre nas raízes e limitada translocação, protegendo os órgãos fotossintetizantes mais sensíveis. As diferentes taxas de translocação e acúmulo de cobre nas raízes entre *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* podem ser devidas à diferentes níveis de mecanismos bioquímicos de retenção radicular que cada espécie vegetal apresenta (Silva *et al.* 2015).

Conforme as concentrações de cobre aplicadas ao solo aumentaram, os fatores de bioacumulação para *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* reduziram significativamente, implicando que as raízes atingiram o ponto de saturação de absorção de cobre, diminuindo a sua absorção

(Chua *et al.* 2019). *S. terebinthifolia* apresentou maior Fb que *E. uniflora* em todos os tratamentos, sinalizando maior capacidade de absorção e acúmulo de cobre nas raízes. Ainda, *S. terebinthifolia* apresentou fator de bioacumulação > 1 e índice de translocação < 1 , o que significa que a espécie é capaz de extrair cobre do solo, mas não transloca o metal para a parte aérea, restringindo-o nas raízes. A fitoestabilização é o processo de estabilizar / imobilizar o poluente (neste caso o cobre), diminuindo sua mobilidade no solo por meio da complexação da rizosfera e/ou acumulação de raízes (Sarwar *et al.* 2017). Espécies vegetais podem ser classificadas como fitoestabilizadoras de metais pesados quando são capazes de tolerar altas concentrações do elemento sem sinais de toxicidade (Ali *et al.* 2013), além de apresentarem alto fator de bioacumulação no tecido radicular ($Fb > 1$), e baixo índice de translocação para as partes aéreas ($It < 1$) (Shackira & Puthur 2019). Como *S. terebinthifolia* apresentou baixo índice de translocação de cobre e alto fator de bioacumulação nas raízes, a espécie apresenta potencial para ser indicada como fitoestabilizadora de cobre. *E. uniflora* apresentou alta capacidade de absorção de cobre sem sintomas visuais de toxicidade, demonstrando ser espécie tolerante ao excesso de cobre. Porém, em comparação com a espécie pioneira, *E. uniflora* apresentou menor acúmulo de cobre nas raízes com maior translocação para a parte aérea e, portanto, baixo potencial para ser indicada como espécie fitorremediadora de cobre.

3.4. Teor relativo de clorofila (SPAD) e concentração de pigmentos fotossintéticos

S. terebinthifolia e *E. uniflora* não apresentaram diferença entre tratamentos para os teores relativos de clorofila (índice SPAD), concentração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, total (*a* + *b*) e carotenóides, e razão clorofila *a/b* (Tabela 4).

Tabela 4. Teor relativo de clorofila e concentração de pigmentos fotossintéticos de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*.

Espécie	Tratamentos (mg Cu kg ⁻¹)	Índice SPAD	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> + <i>b</i>	Carotenoides	Chl <i>a/b</i>
			----- mg g ⁻¹ -----			--	
<i>S. terebinthifolia</i>	0	49,3 a	0,29 a	0,12 a	0,42 a	0,08 a	2,41 a
	60	48,0 a	0,27 a	0,11 a	0,38 a	0,07 a	2,45 a
	120	47,7 a	0,26 a	0,11 a	0,37 a	0,07 a	2,45 a
	180	45,9 a	0,25 a	0,10 a	0,35 a	0,06 a	2,45 a
	240	49,0 a	0,28 a	0,13 a	0,41 a	0,07 a	2,20 a
<i>E. uniflora</i>	0	41,1 a	0,22 a	0,12 a	0,35 a	0,08 a	1,87 a
	60	40,1 a	0,20 a	0,11 a	0,31 a	0,07 a	1,85 a
	120	39,6 a	0,20 a	0,11 a	0,31 a	0,07 a	1,83 a
	180	39,1 a	0,19 a	0,11 a	0,30 a	0,07 a	1,85 a
	240	40,8 a	0,23 a	0,12 a	0,35 a	0,07 a	1,95 a

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve efeitos negativos na concentração de pigmentos e teores relativos de clorofila em plantas de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* crescidas em todos os tratamentos. Sob condições de toxicidade por cobre, as plantas geralmente apresentam redução na biossíntese e diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos nos tecidos foliares (Goswami & Das 2016, Zaouali *et al.* 2020). Assim como outros metais pesados, o excesso de cobre pode provocar desbalanços nutricionais e induzir deficiência de outros elementos essenciais nas plantas, acarretando a diminuição nos teores totais de clorofila nas folhas devido à interferência no fornecimento de nutrientes para a biossíntese da clorofila (Shams *et al.* 2019). O excesso de cobre nos tecidos foliares pode levar a substituição do Mg central da clorofila pelo cobre, reduzindo/inviabilizando a atuação deste pigmento no processo fotossintético de absorção de luz (Giroto *et al.* 2016) e alteração na composição proteica das membranas fotossintéticas, impactando negativamente no processo de utilização da luz (Kumar *et al.* 2020). O excesso de cobre nas células foliares pode desencadear modificações ultra estruturais como a desorganização das membranas do cloroplasto e tilacóides, inchaço dos tilacóides e aumento

do espaço intertilacoidal, e ruptura da membrana dupla externa e interna ao redor do cloroplasto, além de provocar ausência de grãos de amido no estroma (Souza *et al.* 2014).

No entanto, os efeitos deletérios na síntese e concentração de pigmentos fotossintéticos sob toxicidade por cobre ocorrem apenas quando as concentrações estão com níveis elevados nas folhas (Saleem *et al.* 2020). A restrição e acúmulo de cobre nas raízes em detrimento da translocação para a parte aérea, atua como forma de preservar as atividades metabólicas e mitigar os potenciais danos ao aparato fotossintético (Marques *et al.* 2018, Torasa *et al.* 2019). Portanto, os efeitos fitotóxicos do cobre na biossíntese e concentração de pigmentos fotossintéticos foram evitados devido à retenção e acúmulo de cobre nas raízes, demonstrando que esse mecanismo de proteção foi eficaz na preservação da integridade dos pigmentos fotossintéticos.

3.5. Trocas gasosas foliares

S. terebinthifolia e *E. uniflora* apresentaram tendência de aumento (não significativa) na assimilação líquida de carbono (A) com o aumento inicial da concentração de cobre, seguido de declínio em concentrações superiores (Figura 5 a). *S. terebinthifolia* apresentou tendência de declínio linear (não significativo) na condutância estomática (g_s) (Figura 5 b) e na transpiração foliar (E) (Figura 5 c), enquanto *E. uniflora* apresentou aumento linear significativo nestes parâmetros conforme aumento da concentração de cobre. *S. terebinthifolia* apresentou tendência de aumento linear (não significativo) da concentração de carbono intercelular (C_i), enquanto *E. uniflora* apresentou redução significativa deste parâmetro com o aumento inicial da concentração de cobre, seguido de aumento significativo em concentrações superiores (Figura 5 d).

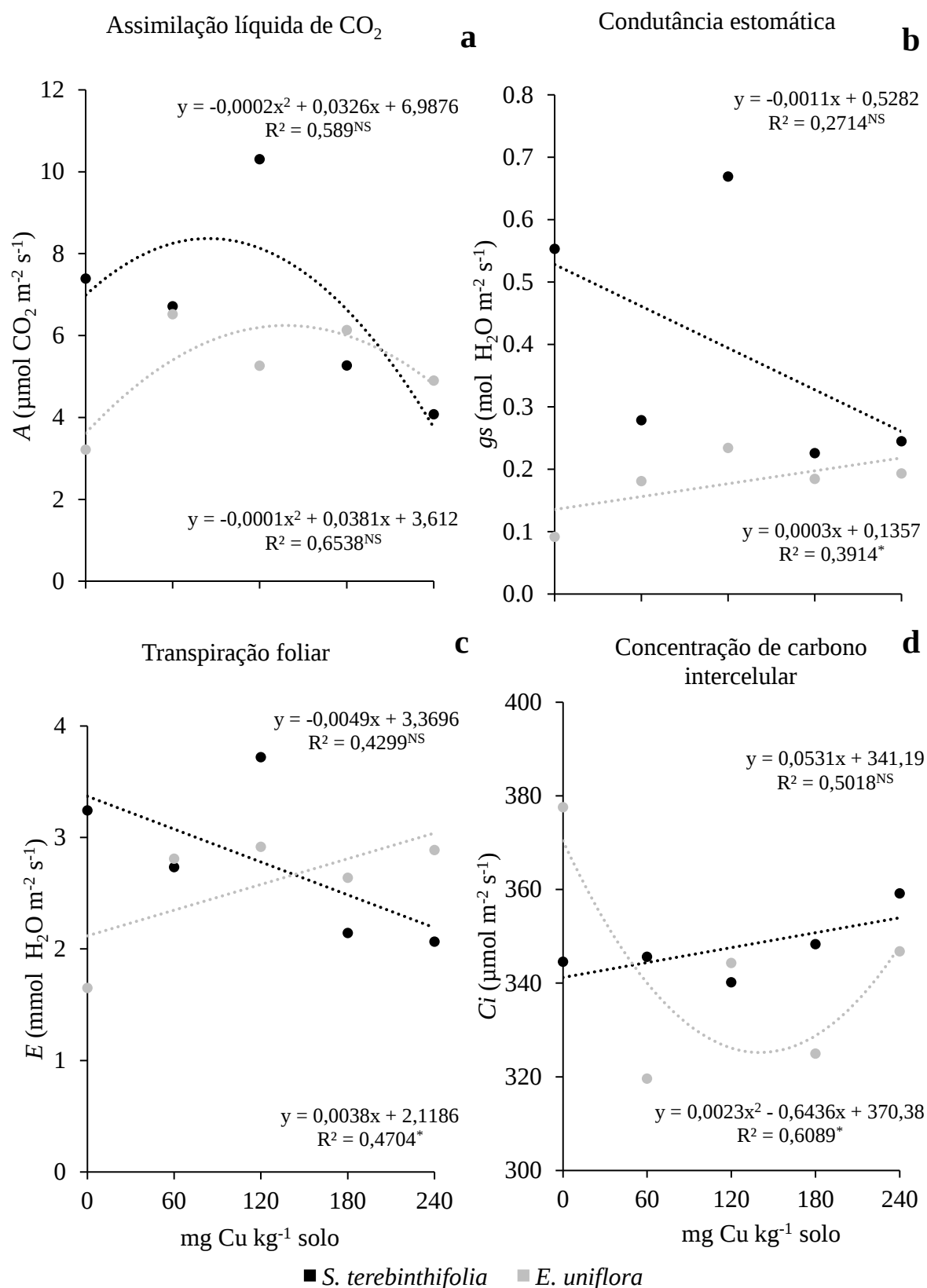


Figura 5. Assimilação líquida de CO₂ (a), condutância estomática (b), transpiração foliar (c), concentração de carbono intercelular (d) de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*.

S. terebinthifolia e *E. uniflora* apresentaram tendência de declínio na assimilação líquida de CO₂ (A) quando cultivadas nos solos com as maiores concentração de cobre. Embora não significativa, a tendência de declínio na A de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* conforme aumento na concentração de cobre no solo indica que concentrações superiores de cobre, ou maior tempo de cultivo em solo contaminado, provavelmente resultarão em diminuição significativa da assimilação de carbono. A tendência de diminuição na A foi acompanhada de aumento da *Ci* nas maiores concentrações de cobre aplicadas. Isso sugere que a tendência de diminuição na A em resposta ao estresse por cobre pode estar relacionada com limitações não estomáticas, visto que a entrada de CO₂ não foi prejudicada. Diminuição na A juntamente com aumento ou inalteração na *Ci*, é um padrão verificado em diversas espécies cultivadas em substratos contaminados com excesso de cobre (Vinit-Dunand *et al.* 2002; Kevat & Sharma 2016, Li *et al.* 2019b). Altas concentrações de cobre provocam alterações ultra estruturais nas células radiculares, como plasmólise das células, retração do tonoplasto e ruptura/disfunção da membrana plasmática (Souza *et al.* 2014), e alterações morfológicas como a redução do comprimento, aérea específica, diâmetro médio, volume e biomassa seca (Marques *et al.* 2018). Alterações na morfologia e funcionalidade das raízes, causam alterações na absorção, distribuição, mobilização e regulação de outros nutrientes essenciais (Janicka-Russak *et al.* 2012, Marques *et al.* 2018, Zaouali *et al.* 2020). A alteração na homeostase juntamente com distúrbios nutricionais, podem levar à diminuição na taxa de assimilação líquida de carbono pelas plantas, ocasionada por diminuição na atividade da RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenasse) e na efetividade do ciclo de Calvin-Benson (Demirevska-Kepova *et al.* 2004, Shahbaz *et al.* 2015, Suganami *et al.* 2020). Portanto, visto que a entrada de CO₂ não foi prejudicada, os efeitos adversos do excesso de cobre na regulação homeostática, aquisição e mobilidade de água e nutrientes, possivelmente foram os fatores causadores das alterações na transpiração e condutância estomática das espécies, bem como na tendência de diminuição na assimilação de carbono em *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*.

Os resultados evidenciam que altas concentrações de cobre no solo podem afetar as trocas gasosas foliares de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*, mesmo quando o elemento é retido nas raízes. Ainda, com exceção da assimilação de carbono, *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentam respostas fisiológicas distintas nas trocas gasosas foliares frente ao aumento da concentração de cobre no solo.

3.6. Fluorescência da clorofila

S. terebinthifolia e *E. uniflora* não apresentaram diferenças entre tratamentos para a fluorescência da clorofila (Figura 6).

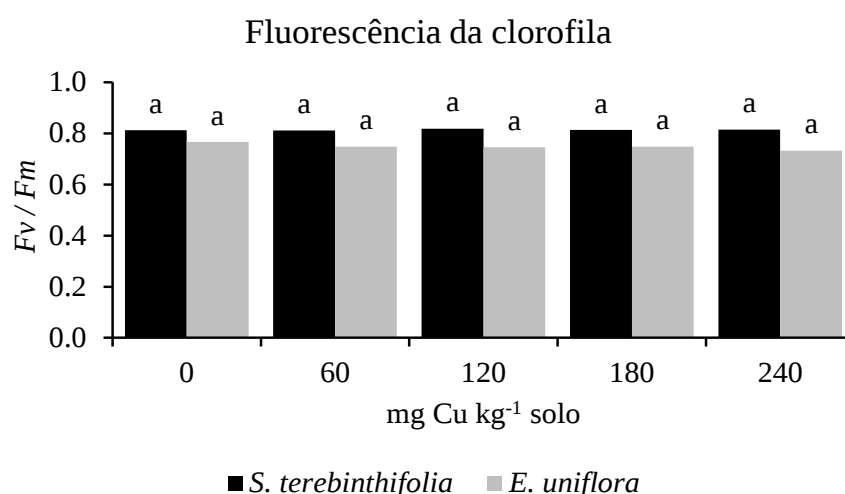


Figura 6. Fluorescência da clorofila de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A razão F_v/F_m representa o rendimento quântico máximo do fotossistema 2 (PSII) que pode ser interpretado como a eficiência máxima da utilização da luz pelas clorofilas (Campostrini 2001). Os parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila (como a razão F_v/F_m) são frequentemente utilizados para determinar a eficiência fotossintética de plantas e detectar alterações quando cultivadas sob estresse (Kalaji *et al.* 2016). Diversos estudos identificaram que o excesso de cobre pode causar impactos significativos na fluorescência da clorofila em plantas. Por exemplo, *Alternanthera tenella* cultivada in vitro apresenta redução em diversos parâmetros relacionados com a fluorescência quando cultivada sob altas

concentrações de cobre, como a redução na atividade potencial do PSII, no número total de centros de reação ativos, na taxa de transporte de elétrons, e no rendimento quântico fotoquímico máximo do PSII (F_v/F_m) (Martins *et al.* 2020). A toxicidade por cobre em *Helianthus annuus* induz ao aumento das fluorescências mínima (F_0), máxima (F_m) e variável (F_v), além de diminuição do número de transportadores de elétrons por centro de reação, causando impactos negativos no complexo de captura de luz (LHC) (Ouzounidou & Ilias 2005). O excesso de cobre em *Ipomoea batatas* provoca a redução da atividade fotoquímica com aumento da dissipação da energia luminosa do PSII (Cuchiara *et al.* 2015). Sob condições de toxicidade por cobre, a região receptora de elétrons (oxidante) do PSII é negativamente afetada, ocasionando diminuição na constante de taxa de captura de energia pelos centros de reação (Li *et al.* 2019b). O PSII é o complexo do aparato fotossintetizante mais sensível à toxicidade do cobre, e a redução na eficiência quântica de PSII (F_v/F_m) é comumente observada como resultado deste estresse (Santabarbara *et al.* 2019). Além da diminuição na recepção de elétrons no PSII, a toxicidade por cobre também leva à redução na taxa de transporte de elétrons (ETR) do PSII para os aceptores de elétrons no fotossistema 1 (PSI), acarretando em redução na eficiência do processo fotossintético, além de proporcionar aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gonzalez-Mendoza *et al.* 2013).

Redução na razão F_v/F_m indica que parte da energia luminosa absorvida é perdida através de re-emissão na forma de fluorescência ou na forma de calor, e portanto, sinaliza diminuição na utilização da luz para os processos fotossintético, pois (Goltsev *et al.* 2016). No entanto, o excesso de cobre se torna prejudicial para a eficiência no uso da luz pelas clorofilas quando está em altas concentrações nos tecidos responsáveis pela captação e utilização da luz. Como *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* foram capazes de acumular o excesso de cobre nas raízes e evitaram que quantidades excessivas deste metal pesado fossem para a parte aérea e se acumulassem nas folhas, isso indica que danos diretos aos centros de reação dos fotossistemas foram evitados. Dessa forma, a retenção radicular em *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* demonstrou

ser um eficiente mecanismo de proteção contra possíveis danos causados pelo excesso de cobre na utilização da luz pelas clorofilas.

3.7. Biometria e Biomassa

S. terebinthifolia não apresentou diferenças entre tratamentos para as variáveis altura e diâmetro do caule (Figura 7 a-b). *E. uniflora* apresentou os maiores valores de altura no tratamento controle (54 cm), enquanto os menores valores foram observados nos tratamentos 60 e 180 mg Cu kg⁻¹ (48 e 49 cm, respectivamente) (Figura 7 c). *E. uniflora* não apresentou diferença entre tratamentos para a variável diâmetro do caule (Figura 7 d).

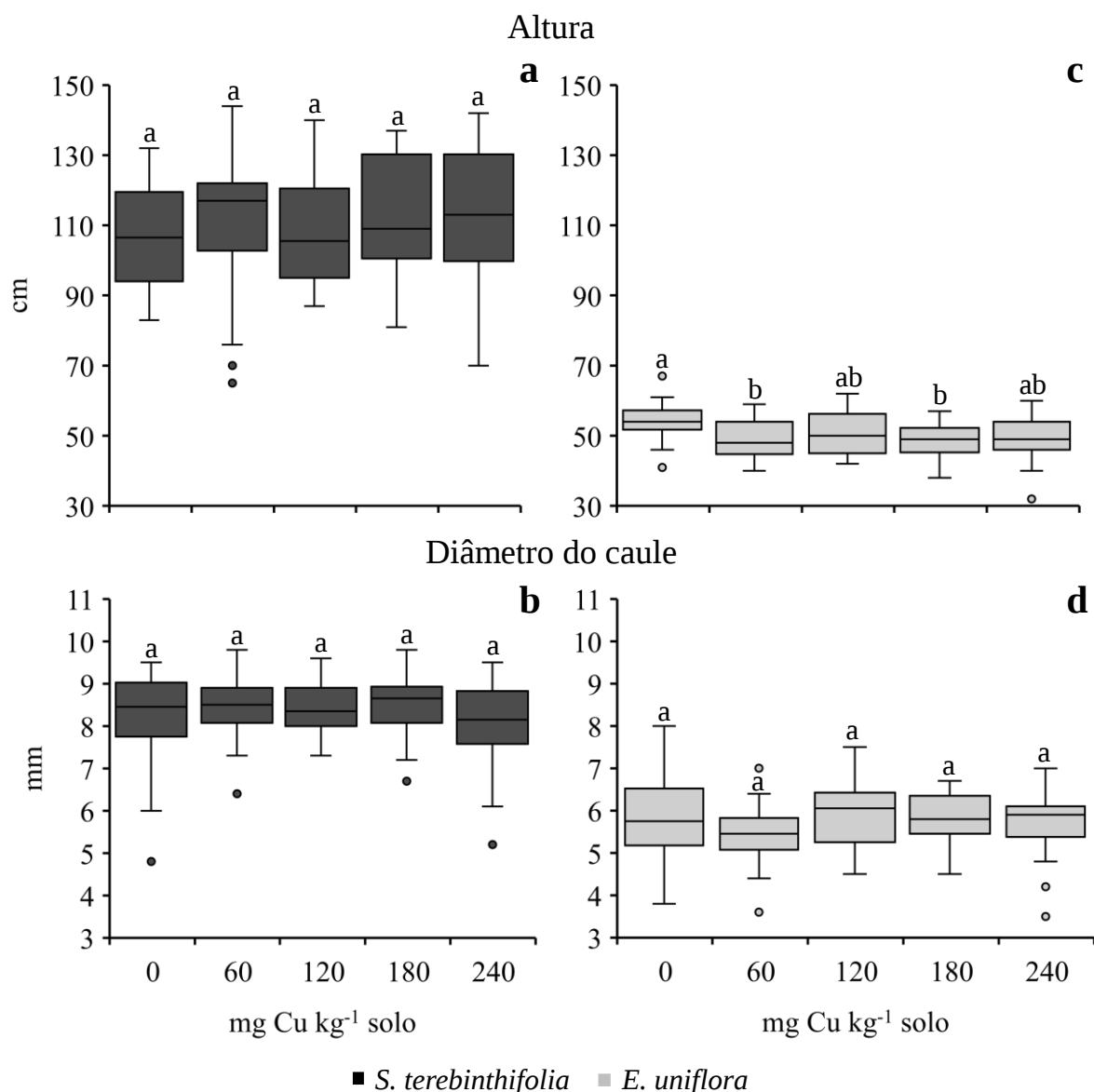


Figura 7. Altura e diâmetro de *S. terebinthifolia* (a-b) e *E. uniflora* (c-d). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

S. terebinthifolia apresentou os maiores valores de MFF (Figura 8 a) e MSF (Figura 9 a) no tratamento 60 mg Cu kg⁻¹ (30,2 e 10,7, respectivamente), enquanto os menores valores foram observados no tratamento 240 mg Cu kg⁻¹ (26,5 e 9,0, respectivamente). *S. terebinthifolia* não apresentou diferença entre tratamentos para MFC, MFR, MFT (Figuras 8 b-d) e para MSC, MSR e MST (Figura 9 b-d). *E. uniflora* não apresentou diferença entre tratamentos para as variáveis de biomassa fresca (Figuras 8 e-h) e seca (Figuras 9 e-h).

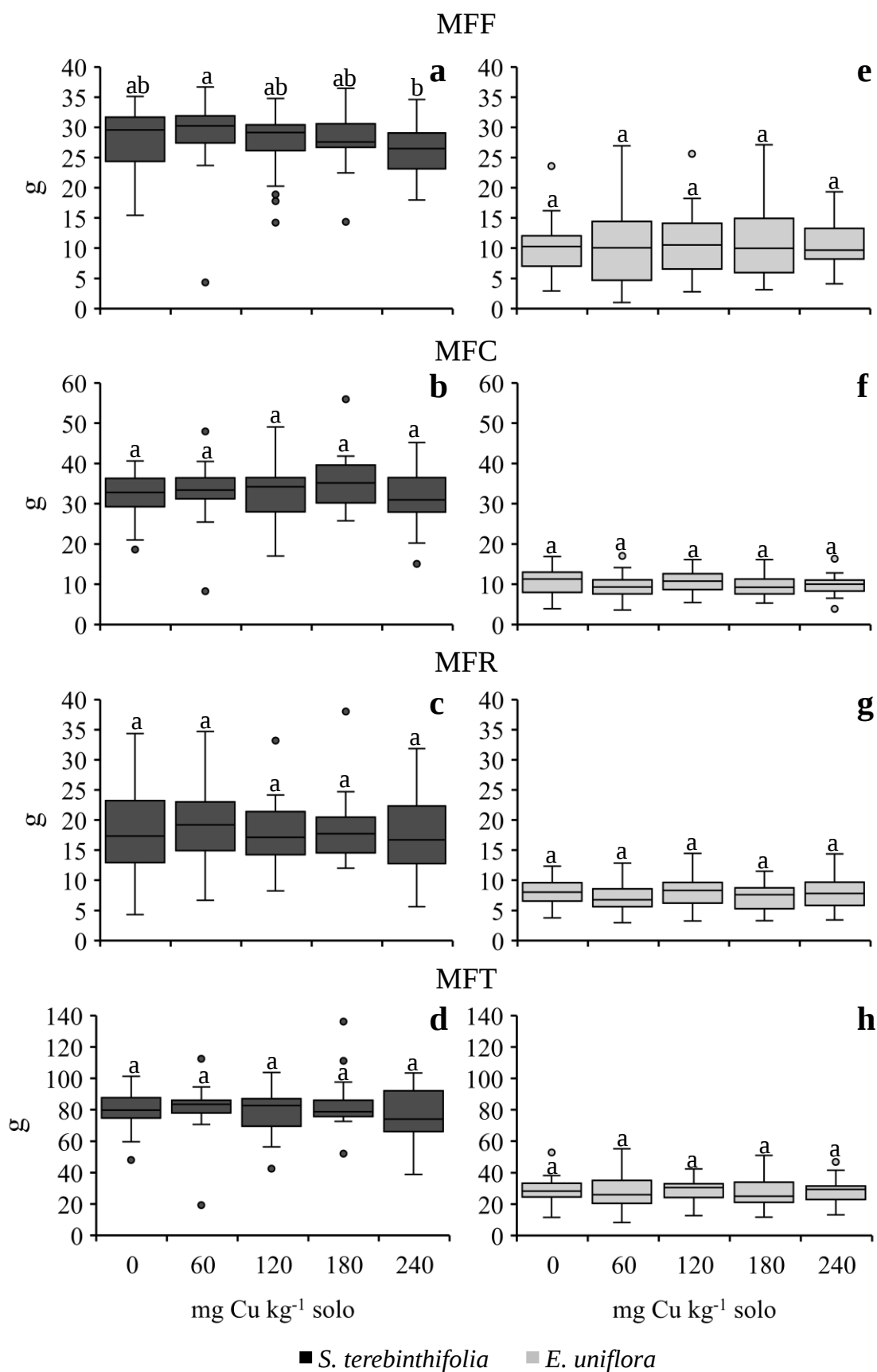


Figura 8. Massa fresca das folhas (MFF), caule (MFC), raízes (MFR) e total (MFT) de *S. terebinthifolia* (a-d) e *E. uniflora* (e-h). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

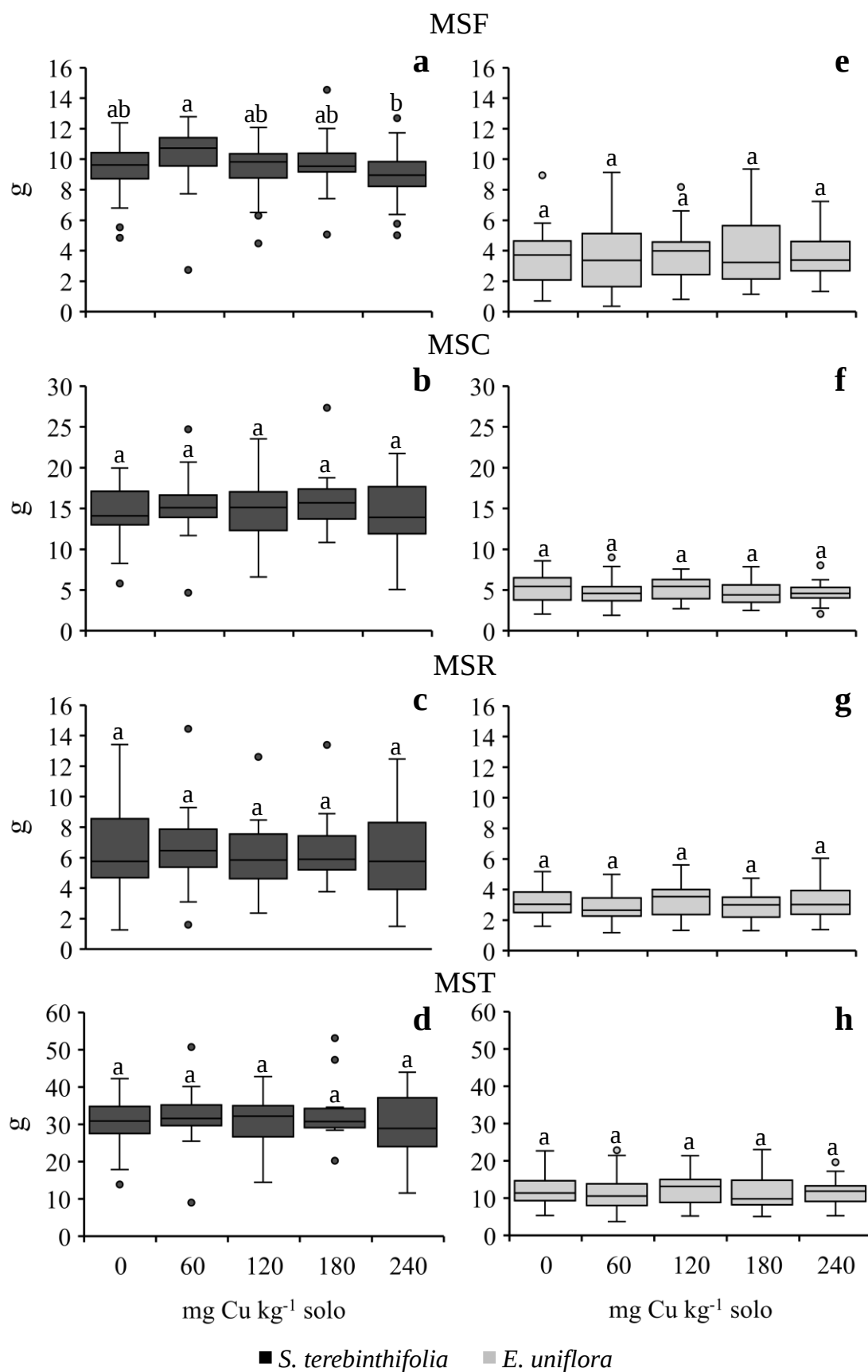


Figura 9. Massa seca das folhas (MSF), caule (MSC), raízes (MSR) e total (MST) de *S. terebinthifolia* (a-d) e *E. uniflora* (e-h). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A espécie pioneira *S. terebinthifolia* apresentou redução nas biomassas fresca e seca das folhas, mas não apresentou alteração para a altura e diâmetro do caule; enquanto a espécie não pioneira *E. uniflora* apresentou diminuição na altura, mas não apresentou alteração na biomassa. Respostas distintas na biometria e biomassa são observadas em diferentes espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica cultivadas em solos contaminados com cobre; dependendo não apenas da espécie, mas também da concentração e do tempo de exposição ao cobre. Por exemplo, *Bauhinia forficata* e *Pterogyne nitens* apresentam redução linear na biomassa total conforme aumento de cobre no solo, enquanto *Enterolobium contortisiliquum* demonstra crescimento inicial na biomassa com baixas concentrações de cobre, seguido de diminuição em concentrações superiores (Silva *et al.* 2015). *Cedrella fissilis* e *Enterolobium contortisiliquum* apresentam comportamento similar com aumento de matéria seca nas doses iniciais, seguido de diminuição em maiores concentrações de cobre (Caires *et al.* 2011). *Erythrina crista-galli* apresenta redução linear na altura e aumento de diâmetro em baixas concentrações com redução em doses superiores; enquanto *Senna multijuga* apresenta redução quadrática na altura com redução linear no diâmetro (Marco *et al.* 2016). *Peltophorum dubium* apresenta decréscimo na altura, diâmetro, biomassa da parte aérea e radicular, e comprimento e área superficial específica radicular (Silva *et al.* 2010). De forma similar, a espécie não pioneira *Luehea divaricata* apresenta o mesmo comportamento em todos os parâmetros acima mencionados, enquanto a espécie pioneira *S. terebinthifolia* não apresenta alterações (Silva *et al.* 2011). *Cedrella fissilis* apresenta diminuição na biomassa da parte aérea e aumento na biomassa radicular, enquanto *Myracrodruon urundeuva* não apresenta diferença na biomassa quando cultivada sob altas concentrações de cobre no solo (Asensio *et al.* 2019).

S. terebinthifolia apresentou aumento inicial na biomassa seca das folhas e *E. uniflora* em altura, seguido de diminuição dos parâmetros. Esse aumento inicial provavelmente se deve à essencialidade do cobre para o crescimento e desenvolvimento vegetal quando em concentrações adequadas (Barker & Pealbem 2015). Contudo, o excesso de cobre afeta

negativamente a morfologia e funcionalidade dos tecidos vegetais, e causam efeitos fitotóxicos ao metabolismo, reduzindo a biomassa e os parâmetros biométricos como consequência das alterações morfológicas (Lalau *et al.* 2015, Zang *et al.* 2020). O excesso de cobre causa danos ultraestruturais nas células radiculares, prejudicando o crescimento e funcionalidade das raízes, impactando negativamente a absorção de água e nutrientes (Souza *et al.* 2014, Li *et al.* 2019b), podendo ser fator determinante para a redução da biomassa e parâmetros biométricos de espécies arbóreas (Yuan *et al.* 2018). Dessa forma, as alterações na absorção de água e nutrientes pelas raízes, bem como mudanças na homeostase nutricional, provavelmente foram os fatores que culminaram na redução dos parâmetros biométricos de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* cultivadas sob excesso de cobre. Porém, *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentaram distintos impactos na biometria e biomassa, indicando que as diferentes respostas fisiológicas (acúmulo radicular, taxas de translocação e trocas gasosas) possuem influência na resposta morfológica de cada espécie frente ao aumento da concentração de cobre no solo. Ainda que *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentaram diminuição na taxa de crescimento e na produção de biomassa, as espécies não apresentaram anormalidades no desenvolvimento nem sintomas visíveis de toxicidade. Portanto, as espécies demonstram ser tolerantes e possuem capacidade de crescimento e desenvolvimento em solos contaminados pelo excesso de cobre.

3.8. Antioxidantes

S. terebinthifolia e *E. uniflora* não apresentaram diferenças entre tratamentos para a concentração de ácido ascórbico reduzido (AA), oxidado (DHA), total (AA+DHA), e para a razão oxidado/total (AA/AA+DHA) (Figuras 10 a-d). *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* não apresentaram diferença entre tratamentos para glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG), total (GSH+GSSG) e para a razão oxidado/total (GSH/GSH+GSSG) (Figuras 10 e-h). *S. terebinthifolia* apresentou maiores valores de AA (Figura 10 a) e AA+DHA (Figura 10 c) que *E. uniflora* em todos os tratamentos; e maiores valores de AA/AA+DHA (Figura 10 d) nos tratamentos 60, 120 e 180 mg Cu kg⁻¹. *S. terebinthifolia* apresentou maiores valores de GSH

(Figura 10 e) que *E. uniflora* nos tratamentos controle e 60 mg Cu kg⁻¹; e maiores valores de GSH+GSSG (Figura 10 g) nos tratamentos controle, 60 e 120 mg Cu kg⁻¹.

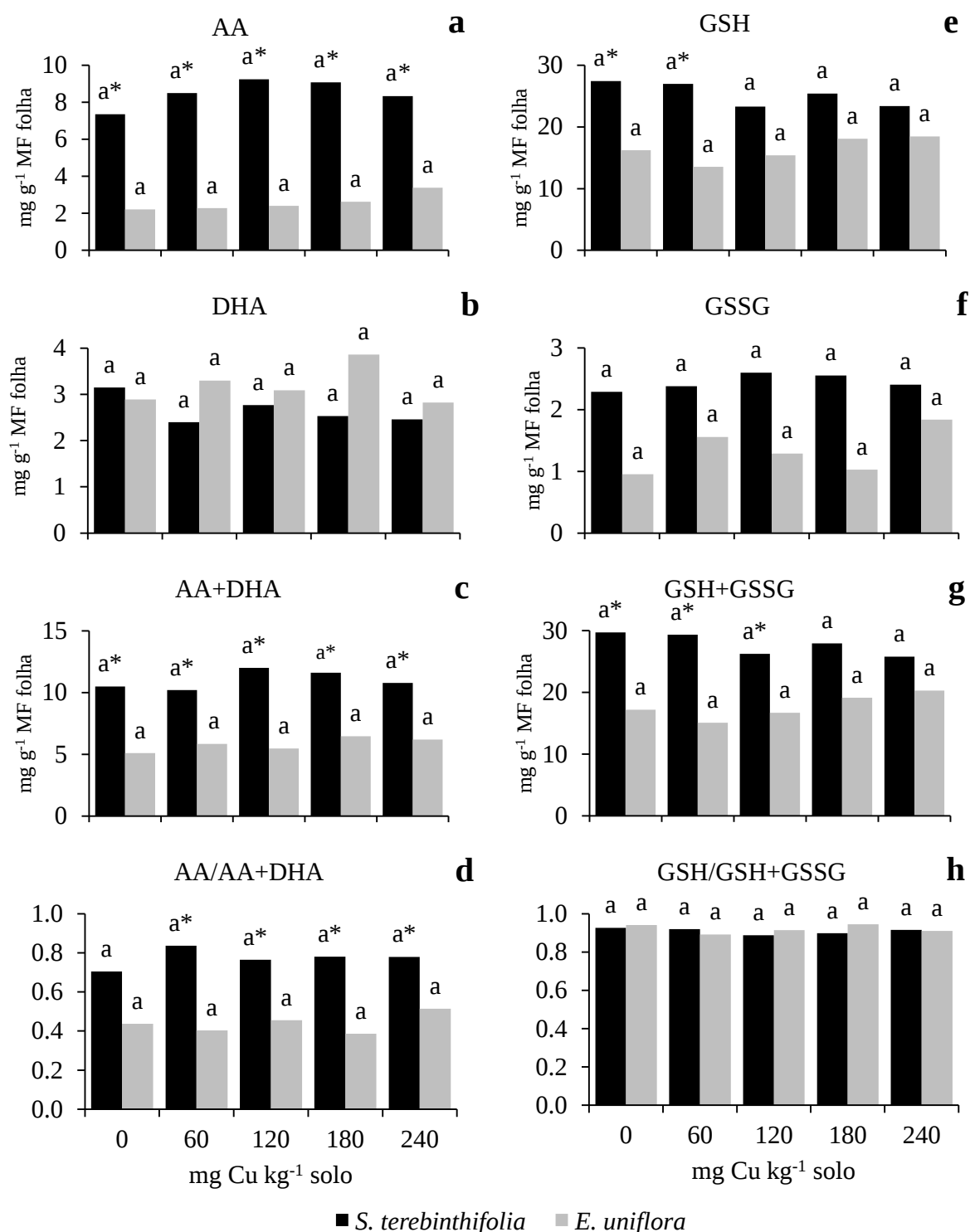


Figura 10. Concentração de ácido ascórbico nas formas reduzida (a), oxidada (b) e total (c), glutatona nas formas reduzida (e), oxidada (f) e total (g), e potencial de oxirredução do ácido ascórbico (d) e glutatona (h) de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Indica diferença entre as espécies dentro de cada tratamento.

S. terebinthifolia e *E. uniflora* não apresentaram diferença entre tratamentos para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 11).

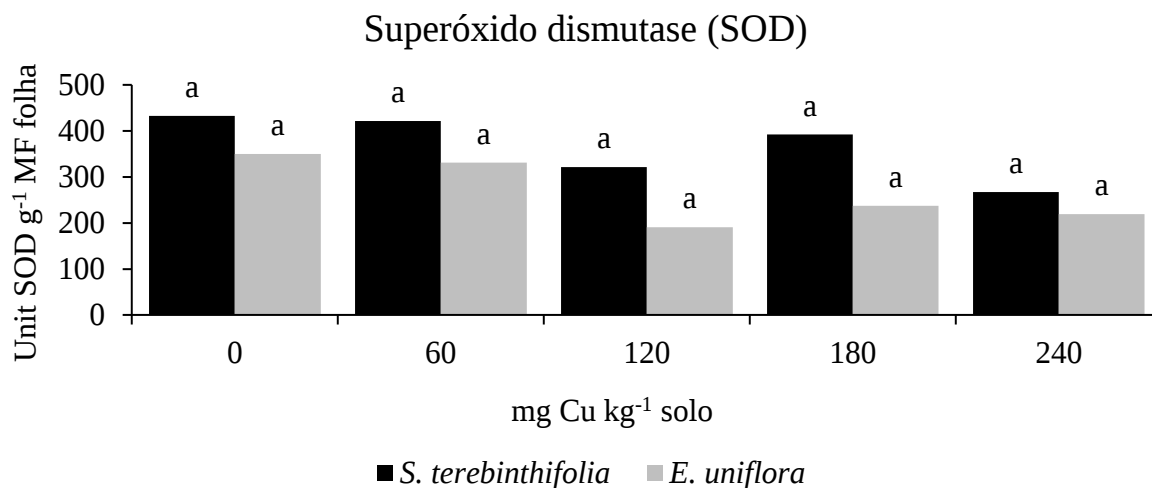


Figura 11. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora*. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os níveis de antioxidantes não enzimáticos (AA) e enzimáticos (GSH e SOD) nas folhas de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* não apresentaram alterações significativas entre tratamentos. A exposição à altas concentrações de cobre induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas folhas, diretamente via reações de Haber-Weiss e Fenton (Mahmud *et al.* 2019). O acúmulo de EROs causa danos oxidativos aos componentes foliares, comumente evidenciados pelo aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e vazamento de eletrólitos, que são indicadores de peroxidação lipídica e danos celulares (Li *et al.* 2019b). De forma geral espécies vegetais cultivadas em solo com excesso de cobre elevam a síntese de antioxidantes enzimáticos (Goswami & Das 2016, Tiecher *et al.* 2017, Saleem *et al.* 2020, Zaouali *et al.* 2020) e não enzimáticos (Giampaoli *et al.* 2012, Adrees *et al.* 2015), a fim de evitar o estresse oxidativo, combater o acúmulo de EROs e promover a estabilidade oxidativa das células. A síntese de moléculas antioxidantes em resposta à metais pesados possui comportamento espécie-específica e cada molécula pode apresentar respostas diferentes das demais; podendo

ser estimuladas, inibidas ou inalteradas dependendo da espécie e da concentração do metal (Buapet *et al.* 2019, Zeng *et al.* 2019, Zaouali *et al.* 2020). Assim como o ácido ascórbico e a glutatona, a atividade da enzima SOD também tende a aumentar em folhas (Drażkiewicz *et al.* 2004, Lombardi & Sebastiani 2005, Thounaojam *et al.* 2012) e raízes (Zhang *et al.* 2008) de plantas submetidas ao excesso de cobre, mas estudos já reportaram diminuição na atividade da SOD sob estas condições (Palma *et al.* 1987, Luna *et al.* 1994, Weckx & Clijters 1996). *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* não apresentaram alterações na síntese de moléculas antioxidantes nas folhas entre tratamentos provavelmente devido à retenção do cobre nas raízes e inibição da translocação para a parte aérea, que preveniram o potencial estresse oxidativo nas folhas.

S. terebinthifolia apresentou maiores valores de antioxidantes não enzimáticos reduzidos e totais do que *E. uniflora*. Altos teores de antioxidantes nas formas reduzida e total sinalizam maior potencial tolerância basal em resposta à estressores oxidativos ambientais (Brandão *et al.* 2017). Portanto, isso indica que a espécie pioneira *S. terebinthifolia* possui maior nível basal de antioxidantes não enzimáticos. Esses resultados vão de acordo com estudo realizado em outras espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, onde constatou-se que espécies pioneiras possuem o sistema antioxidante mais ativo do que espécies não pioneiras (Esposito *et al.* 2018). Outro importante indicativo de prevenção contra danos oxidativos é a capacidade de oxirredução dos antioxidantes (razão reduzido/total). *S. terebinthifolia* apresentou maior capacidade de oxirredução do ácido ascórbico que *E. uniflora* (exceto controle). Como a capacidade de oxirredução sinaliza o potencial de atuação do antioxidante contra a excessiva produção de EROs (Burkey *et al.* 2006), é possível inferir que *S. terebinthifolia*, além de apresentar maior nível basal, também possui um sistema antioxidante mais eficiente que *E. uniflora*, e, portanto, maior capacidade de tolerância contra o estresse oxidativo. Dessa forma enquanto *E. uniflora* demonstra ser tolerante ao excesso de cobre no solo, *S. terebinthifolia* apresenta alto potencial de utilização em recuperação de áreas degradadas devido ao eficiente sistema antioxidante, somado à maior capacidade de acúmulo radicular de cobre.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, foi possível atingir os objetivos propostos pelo estudo. A primeira hipótese foi parcialmente aceita, visto que o crescimento de *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* foi alterado pelas concentrações de cobre utilizadas no experimento, mas não foram suficientes para prejudicar o desenvolvimento das espécies. A segunda hipótese do estudo foi confirmada, uma vez que *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* apresentaram respostas fisiológicas distintas quando cultivadas em solos contaminados com concentrações crescente de cobre no solo.

A análise química mostrou que o solo reteve parte do cobre adicionado, porém apresenta características favoráveis à biodisponibilidade e absorção de cobre pelas espécies vegetais. A espécie pioneira *S. terebinthifolia* e a não pioneira *E. uniflora*, apresentam alta capacidade de extração de cobre do solo aliado à comportamento de acúmulo e restrição radicular do cobre. Entretanto, o acúmulo nas raízes e a translocação do cobre para a parte aérea ocorreu de forma específica para cada espécie. *S. terebinthifolia* apresenta maior capacidade de restrição de cobre nas raízes e baixa translocação para a parte aérea, apresentando potencial para ser indicada como fitoestabilizadora de cobre. *E. uniflora*, apesar de revelar-se espécie tolerante ao excesso de cobre no solo, apresenta maior translocação e menor bioacúmulo; portanto, não apresenta características para ser indicada como espécie fitorremediadora de cobre.

A restrição da translocação do cobre para as partes aéreas evidencia ser o principal mecanismo de proteção contra o excesso de cobre pelas espécies. A retenção de cobre nas raízes efetivamente impediu a redução no teor relativo e na concentração de pigmentos fotossintéticos, preservando a integridade do sistema de captação e utilização da luz pelas clorofilas, e por fim evitou danos oxidativos às folhas sem a necessidade de elevação na síntese do sistema antioxidante. A espécie pioneira *S. terebinthifolia* apresenta o sistema antioxidante com maior nível basal e mais ativo, do que a espécie não pioneira *E. uniflora*.

S. terebinthifolia e *E. uniflora* apresentaram alterações nas trocas gasosas e redução dos parâmetros biométricos, demonstrando que o excesso de cobre pode ser prejudicial ao crescimento e desenvolvimento das espécies. Contudo, tanto *S. terebinthifolia* quanto *E. uniflora* não apresentam sintomas visíveis de fitotoxicidade, nem anormalidades no desenvolvimento durante a condução do experimento, evidenciando que a retenção do cobre nas raízes é capaz de preservar as funcionalidades fisiológicas e garantir o desenvolvimento das espécies. Finalmente, os resultados mostram que *S. terebinthifolia* e *E. uniflora* são espécies tolerantes e podem ser cultivadas em solos contaminados por excesso de cobre.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-ur-Rehman, M., Irshad, M. K. & Bharwana, S. A.** 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(11): 8148-8162.
- Alarsa, C., Furlan, S.A. & Colangelo, A.C.** 2018. Aspectos do meio físico no cenário dos serviços ecossistêmicos. *Revista do Departamento de Geografia* 184-195.
- Ali, H., Khan, E. & Sajad, M.A.** 2013. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere* 91(7): 869-881.
- Amarante, C.V.T.D., Zanardi, O.Z., Miqueloto, A., Steffens, C.A., Erhart, J. & Almeida, J.A.D.** 2009. Quantificação da área e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira 'Cabernet Sauvignon' mediante métodos não destrutivos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(3): 680-686.
- Ambrosini, V.G., Rosa, D.J., Basso, A., Borghezan, M., Pescador, R., Miotto, A., Melo, G.W.B., Soares, C.R.F.S., Comin, J.J. & Brunetto, G.** 2017. Liming as an ameliorator of copper toxicity in black oat (*Avena strigosa* Schreb.). *Journal of Plant Nutrition* 40(3): 404-416.
- Ambrosini, V.G., Rosa, D.J., Prado, J.P.C., Borghezan, M., Melo, G.W.B., Soares, C.R.F.S., Comin, J.J., Simão, D.G. & Brunetto, G.** 2015. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 96: 270–280.
- Argyaki, A., Kelepertzis, E., Botsou, F., Paraskevopoulou, V., Katsikis, I. & Trigoni, M.** 2018. Environmental availability of trace elements (Pb, Cd, Zn, Cu) in soil from urban, suburban, rural and mining areas of Attica, Hellas. *Journal of Geochemical Exploration* 187: 201-213.

- Asensio, V., Flórido, F.G., Ruiz, F., Perlatti, F., Otero, X.L., Oliveira, D.P. & Ferreira, T.O.** 2019. The potential of a Technosol and tropical native trees for reclamation of copper-polluted soils. *Chemosphere* 220: 892-899.
- Barbosa, E.A.A., Digner, E., Teixeira, W.Z., Otto, R.F. & Ohse, S.** 2019. Potencial de água no solo e fertirrigação nitrogenada na produção e trocas gasosas da alface. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada* 13(3): 3444-3453.
- Barbosa, M.R., de Araújo Silva, M.M., Willadino, L., Ulisses, C. & Camara, T.R.** 2014. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44(3): 453-460.
- Barker, A.V. & Pilbeam, D.J.** 2015. *Handbook of plant nutrition*. 2 ed. CRC press, Boca Raton.
- Beise, D., Castro, R.M., Rosa, V.G., Matielo, C.B.D.O., Stefenon, V.M. & Lemos, R.P.M.** 2017. Avaliação de *Eugenia uniflora* L. como potencial espécie para restauração de áreas degradadas. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão* 9(2).
- Bezerra, J., Lira Junior, J.S. & Silva Junior, J.F.** 2018. *Eugenia uniflora*: pitanga. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Capítulo em livro científico (ALICE).
- Brandão S.E., Bulbovas P., Lima M.E. & Domingos M.** 2017 Biochemical leaf traits as indicators of tolerance potential in tree species from the Brazilian Atlantic Forest against oxidative environmental stressors. *Science of the Total Environment* 575: 406-417.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z. & Zhao, F.** 2012 Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner, P. (eds). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Academic, Amsterdam, pp. 191–248.
- Buapet, P., Mohammadi, N.S., Pernice, M., Kumar, M., Kuzhiumparambil, U. & Ralph, P.J.** 2019. Excess copper promotes photoinhibition and modulates the expression of antioxidant-related genes in *Zostera muelleri*. *Aquatic Toxicology* 207: 91-100.

- Bulbovas, P., Camargo, C.Z., Ferreira, M.L. & Domingos, M.** 2020. Anthropogenic interferences in the nutritional status of tree species growing in urban and peri-urban Atlantic forest remnants. *Urban Forestry & Urban Greening* 50: 126642.
- Burkey, K.O., Neufeld, H.S., Souza, L., Chappelka, A.H. & Davison, A.W.** 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143: 427-434.
- Caires, S.M., Fontes, M.P.F., Fernandes, R.B.A., Neves, J.C.L. & Fontes, R.L.F.** 2011. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. *Revista Árvore* 35(6): 1181-1188.
- Cambrollé, J., García, J.L., Figueroa, M.E. & Cantos, M.** 2015. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* 120: 171-178.
- Campillo-Cora, C., Conde-Cid, M., Arias-Estévez, M., Fernández-Calviño, D. & Alonso-Vega, F.** 2020. Specific adsorption of heavy metals in soils: individual and competitive experiments. *Agronomy* 10(8): 1113.
- Campillo-Cora, C., Fernández-Calviño, D., Pérez-Rodríguez, P., Fernández-Sanjurjo, M. J., Núñez-Delgado, A., Álvarez-Rodríguez, E., Arias-Estévez, M. & Nóvoa-Muñoz, J.C.** 2019. Copper and zinc in rhizospheric soil of wild plants growing in long-term acid vineyard soils. Insights on availability and metal remediation. *Science of the Total Environment* 672: 389-399.
- Campostrini, E.** 2001. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. UFNF, Rio de Janeiro.
- Caroli, M., Furini, A., DalCorso, G., Rojas, M. & Di Sansebastiano, G.P.** 2020. Endomembrane reorganization induced by heavy metals. *Plants* 9(4): 482.
- CETESB – Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo.** 2016. Valores orientadores para solo e água subterrânea no estado de São Paulo. *Diário Oficial Estado de São Paulo - Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I)* 126 (219): 55-56.

- Colzi, I., Arnetoli, M., Gallo, A., Doumett, S., Del Bubba, M., Pignattelli, S., Gabrbrielli, R. & Gonnelli, C.** 2012. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. *Environmental and Experimental Botany* 78: 91-98.
- Comin, J.J., Ambrosini, V.G., Rosa, D J., Basso, A., Loss, A., Melo, G.W.B.D. & Brunetto, G.** 2018. Liming as a means of reducing copper toxicity in black oats. *Ciência Rural* 48(4): e20170278.
- Conti, L., Cesco, S., Mimmo, T., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Melo, G.W., Ceretta, C.A., Trentin, E., Marques, A.C.R. & Brunetto, G.** 2020. Iron fertilization to enhance tolerance mechanisms to copper toxicity of ryegrass plants used as cover crop in vineyards. *Chemosphere* 243: 125298.
- CQFS - Comissão de Química e Fertilidade do Solo.** 2004. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. SBCS/NRS, Porto Alegre, pp. 401.
- Cuchiara, C.C., Silva, I.M.C., Dalberto, D.S., Bacarin, M.A. & Peters, J.A.** 2015. Chlorophyll a fluorescence in sweet potatoes under different copper concentrations. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(1): 179-189.
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G. & Furini, A.** 2019. Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(14): 3412.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R. & Feller, U.** 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* 52(3): 253-266.
- Deng, F., Yamaji, N., Xia, J. & Ma, J.F.** 2013. A member of the heavy metal P-Type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiology* 163: 1353–1362.
- Ding, Q., Cheng, G., Wang, Y. & Zhuang, D.** 2017. Effects of natural factors on the spatial distribution of heavy metals in soils surrounding mining regions. *Science of the Total Environment* 578: 577-585.

- Dogra, N., Sharma, M., Sharma, A., Keshavarzi, A., Minakshi, Bhardwaj, R., Thukral, A.K. & Kumar, V.** 2020. Pollution assessment and spatial distribution of roadside agricultural soils: a case study from India. *International Journal of Environmental Health Research* 30(2): 146-159.
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S., Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., DafréMartinelli, M., Dias, A.P.L., Engela, M.R.G.S., Gagliano, J., Moura, B.B., Alves, E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P.C., Furlan, C.M. & Figueiredo, A.M.G.** 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. *Environmental Pollution* 202: 85–95.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E. & Krupa, Z.** 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17(4): 379-387.
- Esposito, M.P., Nakazato, R.K., Pedroso, A.N.V., Lima, M.E.L., Figueiredo, M.A., Diniz, A.P., Kozovits, A.R. & Domingos, M.** 2018. Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. *Science of the Total Environment* 625: 382–393.
- Estevão, L.R.M., Simões, R.S., Cassini-Vieira, P., Canesso, M.C.C., Barcelos, L.S., Rachid, M.A., Câmara, C.A.G. & Evêncio-Neto, J.** 2017. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice. *Acta Cirurgica Brasileira* 32: 726-735.
- Farias, J.G., Nunes, S.T., Sausen, D., Nunes, M.A., Neis, F.A., Garlet, L.C., Nunes, P.A.A, Dressler, V.L., Schetinger, M.R.C., Rossato, L.V., Girotto, E., Brunetto, G. & Nicoloso, F.T.** 2018. Agricultural contamination: Effect of copper excess on physiological parameters of potato genotypes and food chain security. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 91: 249-259.
- Ferreira, M.L., Andrade, N.G.V., Costa, M.C.L.D., Araujo, D.M., Côrtes, P.L., Quaresma, C.C., Conti, D.M. & Camargo, P.B.** 2019. Soil fertility and litterfall assessment

in a peri-urban forest of São Paulo, SP: understanding for urban green areas management. *Holos* 3: 1-16.

Giampaoli, P., Tresmondi, F., Lima, G.P.P., Kanashiro, S., Alves, E.S., Domingos, M. & Tavares, A.R. 2012. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown in vitro. *Biologia Plantarum* 56(1): 83-88.

Giroto, E., Ceretta, C.A., Rossato, L.V., Farias, J.G., Brunetto, G., Miotto, A., Tiecher, T.L., De Conti, L., Lourenzi, C.R., Schmatz, R., Giachini, A. & Nicoloso, F.T. 2016. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 199–207.

Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Băba, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H. & Allakhverdiev, S.I. 2016. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russian Journal of Plant Physiology* 63(6): 869-893.

Gonzaga, M.I.S., Matias, M.I.D.A.S., Andrade, K.R., Jesus, A.N., Costa Cunha, G., Andrade, R.S. & Jesus Santos, J.C. 2020. Aged biochar changed copper availability and distribution among soil fractions and influenced corn seed germination in a copper-contaminated soil. *Chemosphere* 240: 124828.

Gonzalez-Mendoza, D., Escoboza-Garcia, F., Santamaria, J.M. & Zapata-Perez, O. 2013. Copper stress on photosynthesis of black mangrove (*Avicennia germinans*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(2): 665-670.

Goswami, S. & Das, S. 2016. Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126: 211-218.

Hippler, F.W.R., Petená, G., Boaretto, R.M., Quaggio, J.A., Azevedo, R.A. & Mattos-Jr, D. 2018. Mechanisms of copper stress alleviation in Citrus trees after metal uptake by leaves or roots. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 13134-13144.

- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, Berkeley.
- Husak, V.V.** 2015. Copper and copper-containing pesticides: metabolism, toxicity and oxidative stress. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University* 2(1): 39-51.
- Iglesias, D.J., Lliso, I., Tadeo, F.R. & Talon, M.** 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* 116(4): 563-572.
- Janicka-Russak, M., Kabala, K. & Burzyński, M.** 2012. Different effect of cadmium and copper on H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. *Journal of Experimental Botany* 63(11): 4133-4142.
- Jegerschoeld, C., Arellano, J.B., Schroeder, W.P., van Kan, P.J., Baron, M. & Styring, S.** 1995. Copper (II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry* 34(39): 12747-12754.
- Kabata-Pendias, A.** 2011. Trace elements in soils and plants. 3 ed. CRC press, Boca Raton.
- Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V. & Ladle R.J.** 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiology Plantarum* 4: 1–11.
- Karkush, M.O. & Ali, S.D.** 2019. Effects of copper sulfate contamination on the geotechnical behavior of clayey soils. *Journal of GeoEngineering* 14(1): 47-52.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K. & Kim, W.** 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5(6): 709-725.
- Kevat, N.V. & Sharma, P.K.** 2016. Photosynthesis in copper mediated plant is affected due to oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS) generation. *International Journal of Recent Scientific Research* 7: 14009-14015.

- Klaumann, S., Nickolaus, S.D., Fürst, S.H., Starck, S., Schneider, S., Ekkehard Neuhaus, H. & Trentmann, O.** 2011. The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 192: 393–404.
- Kumar, V., Pandita, S., Sidhu, G.P.S., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S. & Setia, R.** 2020. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*: 127810.
- Lalau, C.M., Almeida Mohedano, R., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Ouriques, L.C., Santos, R.W., Costa, C.H., Vicentini, V.S. & Matias, W.G.** 2015. Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma* 252(1): 221-229.
- Lange, B., van der Ent, A., Baker, A. J. M., Echevarria, G., Mahy, G., Malaisse, F., Meerts, P., Pourret, O., Verbruggen, N. & Faucon, M. P.** 2017. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytologist* 213(2): 537-551.
- Laurent, C., Bravin, M.N., Crouzet, O., Pelosi, C., Tillard, E., Lecomte, P. & Lamy, I.** 2019. Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. *Science of the Total Environment* 709: 135927.
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X. & Han, W.** 2019a. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 28(4): 380-394.
- Li, Q., Chen, H.H., Qi, Y.P., Ye, X., Yang, L.T., Huang, Z.R. & Chen, L.S.** 2019b. Excess copper effects on growth, uptake of water and nutrients, carbohydrates, and PSII photochemistry revealed by OJIP transients in *Citrus* seedlings. *Environmental Science and Pollution Research* 26(29): 30188-30205.

- Lombardi, L. & Sebastiani, L.** 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science* 168(3): 797-802.
- Long, L.C., D'Amico, V. & Frank, S.D.** 2019. Urban forest fragments buffer trees from warming and pests. *Science of the Total Environment* 658: 1523-1530.
- López, A., Montaña, A., Garcia, P. & Garrido, A.** 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. *Food Science and Technology International* 11(3): 199-204.
- Lorenzi, H.** 2016. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7 ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Luna, C.M., Gonzalez, C.A. & Trippi, V.S.** 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiology* 35(1): 11-15.
- Mahmud, J., Bhuyan, M.B., Anee, T.I., Nahar, K., Fujita, M. & Hasanuzzaman, M.** 2019. Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. In: Hasanuzzaman M., Hakeem K., Nahar K., Alharby H. (eds.). *Plant Abiotic Stress Tolerance*. Springer, Cham, pp. 221-257.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A.** 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas. 1 ed. POTAFOS, Piracicaba.
- Marco, R.D., Silva, R.F.D., Ros, C.O.D., Vanzam, M. & Boeno, D.** 2016. *Senna multijuga* and peat in phytostabilization of copper in contaminated soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21: 421-426.
- Marques, D.M., Júnior, V.V., da Silva, A.B., Mantovani, J.R., Magalhães, P.C. & de Souza, T.C.** 2018. Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). *Water, Air & Soil Pollution* 229(5): 138.
- Marsola, T., Miyazawa, M. & Pavan, M.A.** 2005. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro e relação com o extraído do solo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9(1): 92-98.

- Martins, J.P.R., Vasconcelos, L.L., Souza Braga, P.D.C., Rossini, F.P., Conde, L.T., Almeida Rodrigues, L.C., Falqueto, A.R. & Gontijo, A.B.P.L.** 2020. Morphophysiological responses, bioaccumulation and tolerance of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) to excess copper under in vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 143(2): 303-318.
- Minocha, R., Martinez, G., Lyons, B. & Long, S.** 2009. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. *Canadian Journal of Forest Research* 39(4): 849-861.
- Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S. & Chowdhary, P.** 2019. Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. *In*: Sobti R., Arora N., Kothari R. (eds.). *Environmental biotechnology: For sustainable future*. Springer, Singapore, pp. 103-125.
- Mustafa, S.K. & AlSharif, M.A.** 2018. Copper (Cu) an essential redox-active transition metal in living system - A Review Article. *American Journal of Analytical Chemistry* 9(1): 15-26.
- Nakazato, R.K., Lourenço, I.S., Esposito, M.P., Lima, M.E., Ferreira, M.L., Campos, R.O.A, Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2021. Trace metals at the tree-litter-soil-interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by sources of air pollution. *Environmental Pollution* 268: 115797.
- Nualla-Ong, A., Phongdara, A. & Buapet, P.** 2020. Copper and zinc differentially affect root glutathione accumulation and phytochelatin synthase gene expression of *Rhizophora mucronata* seedlings: Implications for mechanisms underlying trace metal tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 205: 111175.
- Oguh, C.E. & Obiwulu, E.N.O.** 2020. Human risk on heavy metal pollution and bioaccumulation factor in soil and some edible vegetables around active auto-mechanic workshop in Chanchaga Minna Niger State, Nigeria. *Annals of Ecology and Environmental Science* 4(1): 12-22.

- Ouzounidou, G. & Ilias, I.** 2005. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity. *Biologia Plantarum* 49(2): 223.
- Palma, J.M., Gómez, M., Yáñez, J. & Del Río, L.A.** 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in copper-tolerant pea plants. *Plant Physiology* 85(2): 570-574.
- PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente.** 2021. United Nations decade on ecosystem restoration. Disponível em: <https://www.decadeonrestoration.org/> (acesso em 18-06-2021).
- Printz, B., Lutts, S., Hausman, J.F. & Sergeant, K.** 2016. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science* 7: 601.
- Rai, P.K., Lee, S.S., Zhang, M., Tsang, Y.F. & Kim, K.H.** 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International* 125: 365-385.
- Raij, B.V., Andrade, J.C., Cantarella, H. & Quaggio, J.A.** 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
- Rehman, M., Liu, L., Wang, Q., Saleem, M.H., Bashir, S., Ullah, S. & Peng, D.** 2019. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: A review. *Environmental Science and Pollution Research* 26(18): 18003-18016.
- Saleem, M.H., Fahad, S., Khan, S.U., Din, M., Ullah, A., Sabagh, A.E., Hossain, A., Llanes, A. & Liu, L.** 2020. Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China. *Environmental Science and Pollution Research* 27(5): 5211-5221.
- Santabarbara, S., Villafiorita Monteleone, F., Remelli, W., Rizzo, F., Menin, B. & Casazza, A. P.** 2019. Comparative excitation-emission dependence of the *Fv/Fm* ratio in model green algae and cyanobacterial strains. *Physiologia Plantarum* 166(1): 351-364.

- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M.R., Ishaque, W., Kamran, M.A., Matloob, A., Rehim, A. & Hussain, S.** 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171: 710-721.
- Seguel, C.G., Muñoz, H., Segovia, J., Ávalos, B. & Martín, J.R.** 2019. Assessment of soil contamination in Caleta Vitor and surrounding areas, northern Chile, due to heavy metal enrichment caused by an abandoned copper mine. *Interciencia* 44(4): 241-246.
- Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N. & Radina, B.** 1999. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* 39: 343-377.
- Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., Natasha, Murtaza, G., Dumat, C. & Shahid, M.** 2020. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere* 127436.
- Shackira, A.M. & Puthur, J.T.** 2019. Phytostabilization of heavy metals: Understanding of principles and practices. In: Srivastava, S., Srivastava, A.K., Suprasanna, P. (ed.) *Plant-metal interactions*, 1 ed. Springer, Cham, pp. 263-282.
- Shahbaz, M., Ravet, K., Peers, G. & Pilon, M.** 2015. Prioritization of copper for the use in photosynthetic electron transport in developing leaves of hybrid poplar. *Frontiers in Plant Science* 6: 407.
- Shams, M., Ekinici, M., Turan, M., Dursun, A., Kul, R. & Yildirim, E.** 2019. Growth, nutrient uptake and enzyme activity response of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) to excess copper. *Environmental Sustainability* 2(1): 67-73.
- Sharma, R., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., Al-Huqail, A.A., Siddiqui, M.H. & Ahmad, P.** 2019. Oxidative stress mitigation and initiation of antioxidant and osmoprotectant responses mediated by ascorbic acid in *Brassica juncea* L. subjected to copper (II) stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182: 109436.
- Silva, R.F., Saidelles, F.L.F., Silva, A.S. & Bolzan, J.S.** 2011. Influência da contaminação do solo por cobre no crescimento e qualidade de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.

& Zucc.) e aroeira-vermelha (*Schinus therebinthifolius* Raddi). *Ciência Florestal* 21(1): 111-118.

Silva, R.F.D., Antonioli, Z.I., Lupatini, M., Trindade, L.L. & Silva, A.S.D. 2010. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. *Ciência Florestal* 20(1): 147-156.

Silva, R.F.D., Ros, C.O.D., Scheid, D.L., Grolli, A.L., Marco, R.D. & Missio, E.L. 2015. Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 19(11): 1093-1099.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P. & Prasad, S.M. 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science* 6: 1143.

Souza, E.P., Silva, I.D.F. & Ferreira, L.E. 2011. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. *Current Agricultural Science and Technology* 17(2-4): 167-173.

Souza, V.L., de Almeida, A.A.F., Souza, J.D.S., Mangabeira, P.A., Jesus, R.M., Pirovani, C.P., Ahnert, D., Baligar, V.C. & Loguercio, L.L. 2014. Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 21(2): 1217-1230.

Suganami, M., Suzuki, Y., Kondo, E., Nishida, S., Konno, S. & Makino, A. 2020. Effects of overproduction of Rubisco activase on Rubisco content in transgenic rice grown at different N levels. *International Journal of Molecular Sciences* 21(5): 1626.

Szalai, G., Kellós, T., Galiba, G. & Kocsy, G. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(1): 66-80.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M. & Murphy, A. 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Artmed Editora, Porto Alegre.

- Thounaojam, T.C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L. & Sanjib, P.** 2012. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 33-39.
- Tiecher, T.L., Tiecher, T., Ceretta, C.A., Ferreira, P.A., Nicoloso, F.T., Soriani, H.H., De Conti, L., Kulmann, M.S.S., Schneider, R.O. & Brunetto, G.** 2017. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. *Scientia Horticulturae* 222: 203-212.
- Torasa, S., Boonyarat, P., Phongdara, A. & Buapet, P.** 2019. Tolerance mechanisms to copper and zinc excess in *Rhizophora mucronata* Lam. seedlings involve cell wall sequestration and limited translocation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102(4): 573–580.
- Trammell, T.L., Schneid, B.P. & Carreiro, M.M.** 2011. Forest soils adjacent to urban interstates: soil physical and chemical properties, heavy metals, disturbance legacies, and relationships with woody vegetation. *Urban Ecosystems* 14(4): 525-552.
- Vendruscolo, D., Santana, N.A., Souto, K.M., Ferreira, P.A.A., Melo, G.W.B. & Jacques, R.J.S.** 2018. Differential behavior of the summer cover crops in the absorption and translocation of copper. *Ciência Rural* 48(12): e20180005.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sossé, B. & Badot, P.M.** 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science* 163: 53-58.
- Wang, Q.Y., Liu, J.S., Wang, Y. & Yu, H.W.** 2015. Accumulations of copper in apple orchard soils: distribution and availability in soil aggregate fractions. *Journal of Soils and Sediments* 15(5): 1075-1082.
- Weckx, J.E.J. & Clijsters, H.M.M.** 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiologia Plantarum* 96(3): 506-512.

- Wyszkowski, M.** 2019. Soil Contamination with copper and its effect on selected soil properties after applying neutralizing substances. *Polish Journal of Environmental Studies* 28(4): 2465-2471.
- Yruela, I.** 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology* 36(5): 409-430.
- Yuan, M., Li, Y.F., Zhang, C.B., Wang, J.X., Li, S.J., Fu, X.Z., Lin, L.L., Cao, L. & Peng, L.Z.** 2018. Review of research on copper in Citrus. *Journal of Fruit Sciences* 35: 347–357
- Zabotto, A.R., França, W.S., Domingos, M., Rinaldi, M.C.S., Kanashiro, S., Ferreira, M.L. & Tavares, A.R.** 2020. Copper accumulation and distribution in two arboreal species of the Atlantic Forest. *Floresta e Ambiente* 27(1): e20190027.
- Zang, F., Wang, S., Chen, Y., Nan, Z. & Zhao, C.** 2020. Accumulation and translocation of copper in Cu-polluted sierozem in northwest China. *Archives of Agronomy and Soil Science* 1-12.
- Zaouali, W., Mahmoudi, H., Salah, I. B., Mejri, F., Casabianca, H., Hosni, K. & Ouerghi, Z.** 2020. Copper-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidative system activities and lipid metabolism of cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *Biologia* 75(3): 367-380.
- Zeng, Q., Ling, Q., Wu, J., Yang, Z., Liu, R. & Qi, Y.** 2019. Excess copper-induced changes in antioxidative enzyme activity, mineral nutrient uptake and translocation in sugarcane seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 103(6): 834-840.
- Zhang, H., Xia, Y., Wang, G. & Shen, Z.** 2008. Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* 227(2): 465-475.
- Zhao, Y.P., Cui, J.L., Chan, T.S., Dong, J.C., Chen, D.L. & Li, X.D.** 2018. Role of chelant on Cu distribution and speciation in *Lolium multiflorum* by synchrotron techniques. *Science of the Total Environment* 621: 772-781.

Zhou, D., Liu, D., Gao, F., Li, M. & Luo, X. 2017. Effects of biochar-derived sewage sludge on heavy metal adsorption and immobilization in soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(7): 681.

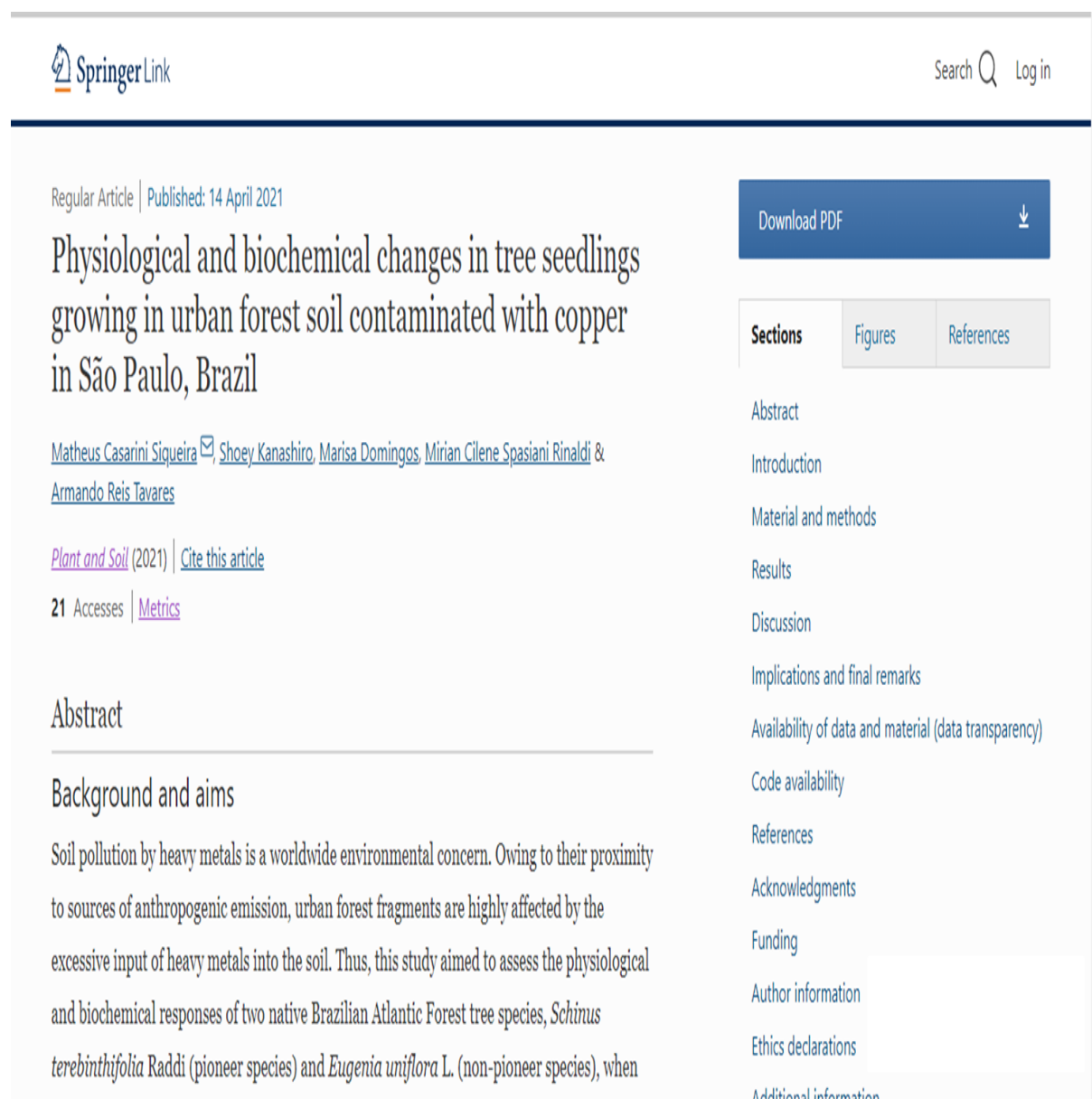
ANEXO

Artigo oriundo da dissertação, publicado de forma on-line na revista *Plant and Soil* (Editora: Springer Nature), com o título: “Physiological and biochemical changes in tree seedlings growing in urban forest soil contaminated with copper in São Paulo, Brazil”

link: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11104-021-04948-3>

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04948-3>

Citação: Siqueira, Matheus Casarini; Kanashiro, Shoey; Domingos, Marisa; Rinaldi, Mirian Cilene Spasiani; Tavares, Armando Reis. Physiological and biochemical changes in tree seedlings growing in urban forest soil contaminated with copper in São Paulo, Brazil. *Plant and Soil* (Dordrecht. Online), v. 1, p. 1-15, 2021.



The screenshot shows the SpringerLink interface for a research article. At the top, the SpringerLink logo is on the left, and search and login options are on the right. The article title is prominently displayed in the center. Below the title, the authors' names are listed with links to their profiles. A 'Download PDF' button is located to the right of the title. Below the authors, there are links for 'Cite this article' and 'Metrics'. The article is categorized as a 'Regular Article' and was published on '14 April 2021'. On the right side, there is a vertical list of sections including Abstract, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Implications and final remarks, Availability of data and material (data transparency), Code availability, References, Acknowledgments, Funding, Author information, Ethics declarations, and Additional information. The 'Sections' tab is currently selected.

Regular Article | Published: 14 April 2021

Physiological and biochemical changes in tree seedlings growing in urban forest soil contaminated with copper in São Paulo, Brazil

[Matheus Casarini Siqueira](#) , [Shoey Kanashiro](#), [Marisa Domingos](#), [Mirian Cilene Spasiani Rinaldi](#) & [Armando Reis Tavares](#)

Plant and Soil (2021) | [Cite this article](#)

21 Accesses | [Metrics](#)

Abstract

Background and aims

Soil pollution by heavy metals is a worldwide environmental concern. Owing to their proximity to sources of anthropogenic emission, urban forest fragments are highly affected by the excessive input of heavy metals into the soil. Thus, this study aimed to assess the physiological and biochemical responses of two native Brazilian Atlantic Forest tree species, *Schinus terebinthifolia* Raddi (pioneer species) and *Eugenia uniflora* L. (non-pioneer species), when

Download PDF

Sections | [Figures](#) | [References](#)

- Abstract
- Introduction
- Material and methods
- Results
- Discussion
- Implications and final remarks
- Availability of data and material (data transparency)
- Code availability
- References
- Acknowledgments
- Funding
- Author information
- Ethics declarations
- Additional information