

GEANE MARTINS BARBOSA

Níveis de tolerância de espécies da Floresta Atlântica ao excesso de metais e elevação da temperatura

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais 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

2022

GEANE MARTINS BARBOSA

Níveis de tolerância de espécies da Floresta Atlântica ao excesso de metais e elevação da temperatura

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais 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.

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Barbosa, Geane Martins
B238n Níveis de tolerância de espécies da Floresta Atlântica ao excesso de metais e
elevação de temperatura / Geane Martins Barbosa - - São Paulo, 2022.
85p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de
Infraestrutura e Meio Ambiente, 2022.
Bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Mudanças climáticas. 3. Metais. I. Título

CDU: 628.395

“O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, por toda estrutura do curso de pós-graduação, ao Instituto de Pesquisas Ambientais (antigo Instituto de Botânica) e ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia por toda infraestrutura e ambiente de trabalho. 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 2019/03001-4).

Às minhas queridas orientadoras Marisa Domingos e Mirian Rinaldi pela oportunidade e que mesmo enfrentando grandes desafios, como foi desenvolver este trabalho em um cenário pandêmico, deram a mim toda a ajuda e suporte, conselhos valiosos e grandes conhecimentos. Sou grata pela confiança a mim dada desde a iniciação científica e por tudo que construímos até aqui. Gratidão!

À Dra. Solange Eulália Brandão, quem me ensinou tudo que sei sobre rotina em um laboratório, desde os processos mais simples até as mais complexas análises bioquímicas, sou muito grata por ter aberto os meus caminhos na ciência e por todos os ensinamentos compartilhados.

À Dra. Elena Paoletti do Research Institute on Terrestrial Ecosystems / National Research Council of Italy (IRET / CNR) de Florência na Itália, pela grande oportunidade de realizar visita técnica no exterior sob sua supervisão. Em especial à Dra. Marcela Engela que me instruiu durante toda visita, não só no laboratório, mas em todos os processos pessoais em um país diferente, sua acolhida foi essencial, serei eternamente grata pela experiência e pelos momentos vividos durante aquele período, foi um grande marco para mim.

A todos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ecologia pelo apoio e pelos bons momentos partilhados na seção.

A todos os alunos e ex-alunos da Ecologia pela ajuda, pelo companheirismo e pela amizade, em especial a Geovana, Douglas, Milton, Ricardo e Matheus que auxiliaram e muito na execução dos experimentos e nas análises laboratoriais.

À minha querida melhor amiga Regina Calixto, minha amiguinha, irmã de alma, parceira de trabalho, só nós sabemos tudo que enfrentamos nessa etapa de nossas vidas. Desenvolvemos nossos mestrados em união, desde o processo seletivo até aqui, unimos nossas forças para vencer em cada fase, com conselhos, conversas intermináveis, ensinamentos, muitos momentos de descontração e muitas, mas muitas boas risadas. Este trabalho só existiu porque estávamos

juntas, construindo e dando nosso melhor com muita alegria e garra. Sou infinitamente grata por ter você ao meu lado no dia-a-dia e pela linda amizade que cultivamos do lado de fora do laboratório.

A minha família: meus pais Analuce e Gesival, que sempre me incentivaram em minhas escolhas, sempre me deram muita sabedoria e discernimento com muito amor e com muita humildade, vocês são meu porto seguro e sempre serei grata por tudo, a pessoa que me torno hoje é graças a base que vocês representam para mim. A minha irmã Julia pela paciência que teve e sempre tem comigo em dividir o mesmo quarto, principalmente nossa escrivaninha. Amo muito vocês.

A meu parceiro Rodrigo que sempre me incentiva e me motiva a continuar lutando, enfrentar os desafios ao seu lado é muito mais sereno. Sem seus conselhos e “empurrõezinhos” não teria chegado tão plena até aqui. Sou muito grata por tudo que fez e continua fazendo por mim. Eu te amo.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a toda espiritualidade que me acompanha, que me trouxe e sempre me traz força e luz nos meus caminhos, momentos de silêncio durante este trabalho foram os que mais gritaram sabedoria.

Aho! Namastê! Gratidão!

RESUMO

Atualmente, a maior parte da Mata Atlântica existe em pequenos fragmentos, compostos por florestas secundárias em estágios sucessionais iniciais e médios. Em áreas urbanas, esses fragmentos vêm sendo afetados por uma diversidade de poluentes, como metais pesados adsorvidos ao material particulado suspenso na atmosfera. Devido alta toxicidade dos metais pesados e a persistência destes no ambiente, estes constituem uma ameaça à vegetação, os quais podem induzir alterações metabólicas características do estresse oxidativo. Os metais acumulados em níveis tóxicos para as plantas induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando a morte celular devido ao estresse oxidativo. Os mecanismos de tolerância e adaptação podem atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo a fim de manter em equilíbrio do estado redox nas plantas. A defesa antioxidante é constituída pelos sistemas enzimático e não enzimático. A toxicidade de metais, como Cu, Zn e Ni, depende da intensidade do estresse e sensibilidade das espécies. Dentro desta abordagem, o PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga) é um dos mais significativos remanescentes de Mata Atlântica em área urbana do país. Está situado na região sul do município de São Paulo e recebe inúmeros poluentes atmosféricos, como o material particulado contendo os referidos metais. Além disso, estudos indicam que o PEFI também vem sendo afetado pelo aumento crescente da temperatura do ar, causado por impactos antrópicos do uso e cobertura do solo. Porém, os níveis de tolerância de muitas espécies vegetais de fragmentos de Mata Atlântica, como o PEFI, não são bem estabelecidos quando submetidas aos poluentes aéreos e alterações climáticas. Com base em resultados de estudos realizados anteriormente por nossa equipe de pesquisa, onde foi concluído que: árvores pioneiras são mais tolerantes contra o estresse oxidativo do que as espécies não pioneiras; árvores não pioneiras apresentam maiores níveis de EROs e um metabolismo antioxidante menos eficaz, este trabalho se baseou na hipótese de que alguns grupos funcionais da comunidade vegetal presente no PEFI, como as espécies pioneiras, podem ser menos suscetíveis aos metais de origem veicular, e elevação de temperatura, enquanto espécies não pioneiras podem ser mais suscetíveis a esses estressores. Sendo assim, no presente estudo avaliou-se o perfil temporal das defesas antioxidantes e dos indicadores de danos celulares em raízes e folhas de espécies de diferentes grupos funcionais, sendo uma espécie arbórea pioneira, *Croton floribundus*, e uma espécie arbórea não pioneira, *Esenbeckia leiocarpa*, submetidas à elevação de temperatura e ao excesso dos metais Cu, Zn e Ni no solo. Os resultados obtidos indicaram que a temperatura influenciou os parâmetros altura e número de folhas de *C. floribundus*. Em *E. leiocarpa* o parâmetro altura foi maior nos tratamentos com

adição de metais, não apresentando variação em número de folhas. A espécie pioneira mostrou maior tolerância ao estresse oxidativo causado pelos fatores de temperatura e metais no solo e a não pioneira não apresentou mecanismos eficientes para detoxificação das EROs quando submetidas à elevação da temperatura, simulando as mudanças climáticas, e ao excesso de metais.

Palavras-chave: Antioxidantes, Mudanças Climáticas, Metais, Floresta Atlântica, Grupos Funcionais.

ABSTRACT

Currently, most of the Atlantic Forest exists in small fragments, composed of secondary forests in early and middle successional stages. In urban areas, these fragments have been affected by a variety of pollutants, such as heavy metals adsorbed to particulate matter suspended in the atmosphere. Due to the high toxicity of heavy metals and their persistence in the environment, they constitute a threat to vegetation, which can induce metabolic changes characteristic of oxidative stress. Metals accumulated at toxic levels to plants can induce the formation of reactive oxygen species (ROS), which can cause cell death due to oxidative stress. Tolerance and adaptation mechanisms can attenuate the damage caused by oxidative stress in order to maintain the redox state in plants in balance. The antioxidant defense consists of the enzymatic and non-enzymatic systems. The toxicity of metals, such as Cu, Zn and Ni, depends on the intensity of stress and the sensitivity of the species. Within this approach, the PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga) is one of the most significant remnants of Atlantic Forest in urban areas of the country. It is located in the southern region of the city of São Paulo and receives numerous atmospheric pollutants, such as particulate matter containing the aforementioned metals. In addition, studies indicate that PEFI has also been affected by the increasing air temperature increase, caused by anthropic impacts of land use and land cover. However, the tolerance levels of many plant species from Atlantic Forest fragments, such as the PEFI, are not well settled when subjected to air pollutants and climate change. Based on the results of previous studies carried out by our research team, where it was concluded that: pioneer trees are more tolerant against oxidative stress than non-pioneer species; non-pioneer trees have higher levels of ROS and a less effective antioxidant metabolism, this work was based on the hypothesis that some functional groups of the plant community present in PEFI, such as pioneer species, may be less susceptible to metals of vehicular origin, and elevation of temperature, while non-pioneer species may be more susceptible to these stressors. Therefore, the present study evaluated the temporal profile of antioxidant defenses and cell damage indicators in roots and leaves of species of different functional groups, being a pioneer tree species, *Croton floribundus*, and a non-pioneer tree species, *Esenbeckia leiocarpa*, subjected to temperature elevation and excess of Cu, Zn and Ni metals in the soil. The results obtained indicated that the temperature influenced the parameters height and number of leaves of *C. floribundus*. In *E. leiocarpa*, the height parameter was higher in treatments with the addition of metals, with no variation in the number of leaves. The pioneer species showed greater tolerance to oxidative stress caused by temperature factors and soil metals and the non-pioneer species

did not show an efficient mechanism for detoxification of ROS when subjected to temperature elevation, simulating climate change, and to excess metals.

Keywords: Antioxidants, Climate Change, Metals, Atlantic Forest, Functional Groups.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Câmara climatizada inserida no Instituto de Pesquisa Ambientais.....25
- Figura 2.** Curva de temperatura ao longo do dia/noite. Ambiente 1 com termoperíodo de 26° C dia/19° C noite; Ambiente 2 com termoperíodo de 32 °C dia/20 °C.....26
- Figura 3.** Espécies arbóreas distribuídas e condicionadas aos tratamentos em câmara climatizada, *Croton floribundus* (A) e *Esenbeckia leiocarpa* (B).....27
- Figura 4.** Concentração de metais (Zn e Cu) no solo da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26° C dia/19° C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)34
- Figura 5.** Teor de metais (Zn, Ni e Cu) de folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).....36
- Figura 6.** Biomassa de folhas e raízes expressa em massa seca (g) da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26° C dia/19° C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).39
- Figura 7.** Curva de crescimento em altura (cm) e número de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26° C dia/19° C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).41

Figura 8. Concentrações dos valores médios de folhas e raízes de GSH da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)43

Figura 9. Concentrações dos valores médios de folhas e raízes de GSSG da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)45

Figura 10. Razão entre GSH/GSSG dos valores médios de folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)47

Figura 11. Concentrações dos valores médios de Chl total (a+b), Chl *a* e Chl *b* e carotenóides; de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)49

Figura 12. Concentrações dos valores médios de HPDC e MDA de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)51

Figura 13. Valores médios da atividade das enzimas catalase (A), glutathione redutase (B), ascorbato peroxidase (C) e superóxido dismutase (D) de folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (A). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M

(termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)54

Figura 14. Valores médios da concentração de Peróxido de hidrogênio, Ânion superóxido e Radical hidroxila de folhas da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*. T atual (termoperíodo de 26° C dia/19° C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais)56

Figura 15. Ciclo ascorbato-glutationa e efeito do estresse oxidativo por metais em raízes, caule e folhas. Imagem com modificações (Feng, S. et al., 2021)61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações (mg/kg de solo) de nutrientes, Zn, Ni e Cu aplicadas no solo das mudas das espécies pioneira e não pioneira.....	26
Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de fertilidade em solo da espécie arbórea pioneira <i>C. floribundus</i> e da espécie arbórea não pioneira <i>E. leiocarpa</i> antes (0 dia) e após (28 dias) de serem submetidas aos diferentes tratamentos.....	32
Tabela 3. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento/metais (M) e tempo) para concentração de Zn e Cu no solo das espécies pioneira (<i>C. floribundus</i>) e não pioneira (<i>E. leiocarpa</i>)	34
Tabela 3.1. Valores médios das concentrações de Zn e Cu no solo da espécie arbórea pioneira <i>C. floribundus</i> e da espécie arbórea não pioneira <i>E. leiocarpa</i>	34
Tabela 4. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento/metais (M) e tempo) para o teor de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes das espécies pioneira (<i>C. floribundus</i>) e não pioneira (<i>E. leiocarpa</i>).....	37
Tabela 4.1. Valores médios do teor total de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira <i>C. floribundus</i> e da espécie arbórea não pioneira <i>E. leiocarpa</i>	37
Tabela 5. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo) e interação entre eles para o crescimento em biomassa de folhas e raízes das espécies pioneira (<i>C. floribundus</i>) e não pioneira (<i>E. leiocarpa</i>)	39
Tabela 5.1. Valores médios da biomassa de folhas e raízes expressa em massa seca (g) da espécie arbórea pioneira <i>C. floribundus</i> e da espécie arbórea não pioneira <i>E. leiocarpa</i>	40
Tabela 6. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo) para crescimento em altura (cm) e número de folhas das espécies pioneira (<i>C. floribundus</i>) e não pioneira (<i>E. leiocarpa</i>)	41

Tabela 6.1. Valores médios do crescimento em altura (cm) e número de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*42

Tabela 7. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Glutathione reduzida (GSH) para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*)43

Tabela 7.1. Valores médios de GSH em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....44

Tabela 8. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Glutathione oxidada (GSSG) para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*)45

Tabela 8.1. Valores médios de GSSG em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....46

Tabela 9. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações da razão GSH/GSSG para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).....47

Tabela 9.1. Valores médios da razão GSH/GSSG em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....48

Tabela 10. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Chl total (a+b), Chl a e Chl b e carotenóides para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).....50

Tabela 10.1. Valores médios das concentrações de Chl total (a+b), Chl a e Chl b e carotenóides em folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....50

Tabela 11. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de HPDC e MDA para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).....52

Tabela 11.1. Valores médios das concentrações de HPDC e MDA em folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....52

Tabela 12. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as atividades das enzimas catalase (CAT), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*)55

Tabela 12.1. Valores médios das atividades das enzimas catalase (CAT - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), glutathione redutase (GR - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), ascorbato peroxidase (APX - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e superóxido dismutase (SOD - Unid SOD mg^{-1} proteína) de folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....55

Tabela 13. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Peróxido de hidrogênio, Ânion superóxido e Radical hidroxila para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).....57

Tabela 13.1. Valores médios das concentrações de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e Radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) em folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Escolhas das espécies e plantio	24
3.2. Delineamento Experimental.....	24
3.3. Procedimentos analíticos.....	28
3.3.1. Defesas antioxidantes e indicadores de danos celulares.....	28
3.3.2. Concentração de Cu, Zn e Ni	30
3.3.3. Análise de fertilidade do solo	30
3.3.4. Tratamento dos dados.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Parâmetros da fertilidade do solo	31
4.2. Concentração de Zn e Cu disponíveis no solo em <i>C. floribundus</i> e <i>E. leiocarpa</i>	33
4.3. Teor de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes de <i>C. floribundus</i> e <i>E. leiocarpa</i>	34
4.4. Biomassa e crescimento (altura/número de folhas) em <i>C. floribundus</i> e <i>E. leiocarpa</i>	38
4.5. Respostas de antioxidante não enzimático, pigmentos e indicadores de danos celulares em <i>C. floribundus</i> e <i>E. leiocarpa</i>	42
4.6. Respostas de antioxidantes enzimáticos e espécies reativas de oxigênio em <i>E. leiocarpa</i>	52
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica cobria originalmente mais de 1,3 milhão km², ocupando cerca de 15% do território brasileiro e parte do nordeste argentino e sudeste paraguaio. As características geográficas e a grande amplitude altitudinal favoreceram a alta diversidade e endemismo. Atualmente, a maior parte desse bioma existe em pequenos fragmentos (Ranta et al., 1998) e compostos por florestas secundárias em estágios sucessionais iniciais e médios (Viana et al., 1997; Metzger, 2008; Metzger et al., 2009). Porém, as florestas tropicais, como a Mata Atlântica, são essenciais para a proteção da biodiversidade, manutenção das reservas de carbono e regulação climática (Magnago et al., 2014; Lewis et al., 2015; Solar et al., 2015). A fragmentação destas pode causar alterações no microclima, como aumento da velocidade do vento, elevação da temperatura pela abertura do dossel (maior incidência de raios solares) e menor umidade (Laurance et al., 2002; Magnago et al., 2015).

Essa fragmentação de florestas pode também afetar suas propriedades, como estrutura e composição, e consequentemente a função ecossistêmica, podendo ocorrer o aumento da mortalidade de árvores e a subsequente proliferação de espécies pioneiras na vegetação afetada (Rolo et al., 2018; Laurance et al., 2016). A extinção de espécies pode também contribuir com alterações no clima, pois o sequestro e a manutenção de grandes reservatórios estáveis de carbono da atmosfera, como de outros elementos químicos que constituem os gases geradores do efeito estufa, dependem do funcionamento dos ecossistemas (Bonan, 2008). Assim, algumas espécies vegetais podem se beneficiar das condições abióticas alteradas e da morte de grandes árvores, resultando na abertura do dossel (Magnago et al., 2016).

Vale destacar que grande parte do território brasileiro se encaixa em condições previstas de clima mais seco e mais quente (IPCC, 2014). Porém, nas últimas décadas as plantas estão experienciando variações ambientais atípicas significativas, que resultam no aquecimento global do planeta e em perturbações dos ciclos hidrológicos. É previsto que tais mudanças ambientais agravarão, e sua frequência de ocorrência provavelmente aumentará nas próximas décadas (Soares et al., 2019).

Deve-se destacar que a principal causa das mudanças climáticas são as emissões antropogênicas de gases de efeito estufa na atmosfera, que vêm aumentando desde a era pré-industrial, em grande parte devido ao crescimento econômico e populacional (Myers et al., 2017). A mudança climática é um estresse multifatorial (Gray e Brady, 2016) e as emissões de gases efeito estufa acompanhado de outros fatores antropogênicos têm sido a principal causa do aquecimento global observado nas últimas décadas. Portanto, são necessárias reduções significativas nas

emissões desses gases (Fanzo et al., 2018; IPCC, 2014; Myers et al., 2017). No geral, o aumento de 1,0°C no aquecimento global foi observado desde a era pré-industrial e, se as taxas atuais forem mantidas, projeta-se que atinja 1,5°C até 2050 (IPCC, 2018).

As mudanças climáticas e a intensificação do uso da terra são os dois fatores mais comuns de mudança global da perda de biodiversidade (Yin et al., 2020). A qualidade do solo diminui com as mudanças climáticas principalmente porque as comunidades microbianas do solo são severamente afetadas, assim como a matéria orgânica do solo e a disponibilidade de nutrientes (Ai et al., 2018; Chen et al., 2016; Lobo et al., 2018), sendo que a disponibilidade de metais em solo pode estar aumentando com os efeitos das mudanças climáticas (Nechita et al., 2021). Assim, o estado permanente de equilíbrio nas concentrações de nutrientes é o regulador decisivo para determinar a capacidade das plantas em resistir aos efeitos das mudanças climáticas (Nakandalage e Seneweera, 2018). Porém, florestas fragmentadas em áreas urbanas vêm sendo afetadas também por uma diversidade de poluentes (Ferreira et al., 2017; Rai, 2016).

Os poluentes em áreas urbanas estão relacionados, entre outros aspectos, ao grande fluxo de veículos leves e pesados e à ressuspensão de poeiras, representando uma fonte contínua de material particulado atmosférico e contaminantes presentes nessas partículas (Miranda et al., 2018; Kalaiarasan et al., 2018).

Os metais pesados adsorvidos ao material particulado suspenso na atmosfera estão entre os poluentes passíveis de serem incorporados em florestas urbanas fragmentadas. Estes podem ser retidos sobre as copas das árvores em ecossistemas florestais, por meio da deposição seca e úmida, incorporados diretamente ao solo via deposição ou indiretamente por meio da queda/decomposição da serapilheira (De Nicola et al., 2008). Além disso, as partículas atmosféricas podem causar efeito sobre o clima, pois as constituídas de carbono grafítico (carbon block) absorvem a radiação solar e aquecem a atmosfera (Rai, 2016).

É válido destacar que os metais ocorrem naturalmente nos ecossistemas terrestres, por serem constituintes de rochas e minerais que dão origem aos solos, podendo até ser fontes naturais de poluição, no caso de ressuspensão de solo (Calvo et al., 2013; Derakhshan Nejad et al., 2018). Entre as atividades antrópicas, as emissões veiculares são as principais fontes urbanas de metais pesados, como queima de combustíveis fósseis, corrosão de peças não exaustivas dos veículos como pneu, embreagem, lonas de freio e emissões das peças de escape dos componentes do motor, além de baterias e radiadores (Adamiec, 2017; Jimenez et al., 2018; Sultan et al., 2022). Comumente, os solos em áreas urbanas ou nas proximidades são mais poluídos com altos níveis de metais pesados como Zn, Cd, Cu, Pb e Ni. Por exemplo, a combustão de combustíveis fósseis líquidos é responsável pela emissão de Cd e Ni, enquanto o desgaste de pneus e freios são os

contribuintes mais importantes para as emissões de Zn, Cu e Pb (Zhang et al., 2012; Vhahangwele e Mugera, 2015) e outros elementos como Sr ou Sn (Apeagyei et al., 2011). Os metais pesados podem ser acumulados nas células/tecidos de organismos vivos por meio de água subterrânea contaminada, reações químicas redox, lixiviação ou processos físicos de intemperismo (Hossain et al., 2008).

Os efeitos nas características reprodutivas e fisiológicas das plantas pelo excesso de metais pesados no solo são altamente variáveis. Os níveis de tolerância variam entre as espécies, mas também entre os tipos de solo. Por exemplo, a concentração de metal, temperatura, pH e carbono orgânico do solo podem afetar a mobilidade do metal e a taxa de assimilação nas plantas (Walker et al., 2004, Zeng et al., 2010). O pH é considerado o principal fator que afeta a solubilidade de metais no solo (Gupta et al., 2018). A solubilidade dos metais diminui em pH alto e aumenta em valores de pH baixos (Sheoran et al., 2016). Isso deve-se à mudança na carga superficial e na adsorção de solutos por componentes de carga variável do solo, matéria orgânica e óxidos de Fe e Al. O pH alto aumenta a carga negativa líquida (capacidade de troca catiônica), assim, o efeito do pH na adsorção é dependente da mudança na carga superficial (Bhargava et al., 2012). É válido destacar que altas concentrações de metais são tóxicos para as plantas e podem prejudicar os seus processos bioquímicos e morfofisiológicos (Thakur et al., 2016). Deve ser considerado também que os metais não são biodegradáveis e podem persistir no meio ambiente por longos períodos (Shah e Daverey, 2020).

Assim, devido alta toxicidade dos metais pesados e a persistência destes no ambiente (Sidhu et al., 2017), estes constituem ameaça à vegetação, os quais podem induzir alterações metabólicas características do estresse oxidativo, ou seja, o desequilíbrio bioquímico entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes (Costa et al., 2017; Feng et al., 2018). Os metais em níveis tóxicos para as plantas podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radicais livres, como hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), e espécies não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo causar a morte celular devido ao estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica da membrana, danos ao DNA e RNA, inibição de enzimas e oxidação de proteínas (Ortega et al., 2017; Shahid et al., 2014). Os metais pesados estão entre as ameaças mais críticas ao solo. Porém, algumas plantas têm o potencial de acumular concentrações elevadas de metais na sua biomassa, que são conhecidas como hiper acumuladoras (Ashraf et al., 2019) e são utilizadas em estudos de fitorremediação. A fitorremediação é uma técnica que faz uso de plantas e seus microrganismos associados a fim de remediar e/ou mitigar os efeitos tóxicos de contaminantes do meio ambiente (Shah e Daverey, 2020).

As plantas desenvolveram mecanismos adaptativos e constitutivos para tolerar o excesso de metais (Shahid et al., 2014), como: redução da captação e transporte de metais; indução de transportadores específicos de metais; limitação de acúmulo em tecidos sensíveis ou sequestro em organelas mais tolerantes, como os vacúolos; processos que controlam as espécies reativas de oxigênio (EROs), como pela defesa antioxidante e produção de proteínas e síntese de moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico e ácido salicílico. Os mecanismos de tolerância e adaptação podem atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo a fim de manter em equilíbrio do estado redox nas plantas (Klimek et al., 2015).

A defesa antioxidante é constituída pelos sistemas enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos constituem a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de EROs e são formados por diversas enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione redutase (GR), entre outras. Entre os antioxidantes não enzimáticos destaca-se, por exemplo, a glutathione (GSH). Desta forma, a deposição de metais pesados adsorvidos ao material particulado suspenso na atmosfera sobre florestas urbanas pode alterar as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, os estágios iniciais de crescimento das plantas, diminuição da capacidade de absorção de nutrientes e os processos de fotossíntese (Grantz et al., 2003; Das et al., 2012; Rai, 2016). Ainda, as plantas mais tolerantes tendem a restringir a entrada excessiva desses metais (Fitz e Wenzel, 2002) ou toleram o estresse causado por eles (Martínez-Sánchez et al., 2012), sendo então favorecidas em ambientes impactados, em relação às plantas mais sensíveis.

A toxicidade de elementos como cobre (Cu), zinco (Zn) e níquel (Ni) no ecossistema, depende da intensidade do estresse e sensibilidade das espécies. O estresse induzido por metais pode levar a mudanças na estrutura de populações e comunidades, devido à eliminação de espécies sensíveis, resultando em mudanças nos processos sucessionais e fisionômicos, diminuição da biodiversidade e, conseqüentemente, na diminuição da qualidade dos serviços ambientais (Sandermann e Matyssek, 2004).

Metais essenciais, como Fe, Cu, Zn e Ni são redox-ativos como cofatores de várias enzimas (Ralf R e Mendel, 2009). Quando presentes em concentrações elevadas, as propriedades redox desses metais essenciais levam à formação de espécies reativas de oxigênio com conseqüências prejudiciais para a célula (Yang et al., 2006).

O cobre é elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e sua absorção nas plantas superiores se dá principalmente como íons bivalentes ou como quelatos. Este metal tem propriedades redox e é componente estrutural e catalítico para as moléculas de proteínas e enzimas envolvidas nos processos metabólicos. A toxicidade do cobre reside na sua capacidade

de formar radicais livres que causam estresse oxidativo. Os efeitos visíveis dessa toxicidade sobre as plantas terrestres são a clorose, a necrose, a diminuição do crescimento ou secagem das plantas (Brezoczki e Filip, 2017).

Nas plantas, o zinco está associado às atividades de várias enzimas, tem papel estrutural no metabolismo celular e está envolvido na replicação e transcrição do DNA como componente intrínseco das metaloproteínas do zinco. A deficiência de zinco está associada a uma pausa na atividade fotossintética, pois é necessário para a atividade da anidrase carbônica e a disponibilidade de substratos carbonizados é limitada pelo zinco (Soares et al., 2019; Broadley et al., 2012). Altas concentrações de Zn podem induzir diminuições no transporte de elétrons no fotossistema II, na biossíntese de pigmentos e causar danos oxidativos via geração de EROs (Chaoui et al., 1997; Cuypers et al., 2001; Tripathy e Mohanty, 1980). O acúmulo de EROs deve ser a principal resposta das plantas quando submetidas a concentrações tóxicas de Zn, uma vez que a ativação de sistemas enzimáticos antioxidantes permite sua tolerância ao Zn.

O níquel é micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento inicial das plantas, mas o excesso pode ter efeitos prejudiciais, destacando-se que esse metal normalmente está na forma disponível no solo pois raramente forma precipitados insolúveis (Hannan et al., 2021). Níveis mais altos de níquel podem levar a deficiências de outros minerais essenciais por meio da competição e/ou formação de quelatos com ligantes metálicos, resultando em germinação reduzida, amarelecimento, etc. Além disso, a toxicidade do Ni causa aumento na produção de EROs e inibe significativamente as atividades enzimáticas devido ao aumento de malondialdeído (MDA) (Baran, 2018; Rizwan et al., 2018, Hannan et al., 2021), como também perturbações metabólicas pela indução de estresse oxidativo, fotossíntese interrompida e, finalmente, provoca inibição do crescimento e redução do sistema radicular (Adrees et al., 2015; Shahzad et al., 2018).

As atividades dos sistemas antioxidantes estão intrinsecamente relacionadas às mudanças de temperatura (Bicalho et al., 2017; Staehr e Sand-Jensen, 2006). Em níveis adequados, as EROs induzem genes de defesa e resposta adaptativa. Níveis subletais, contudo, podem levar as plantas a condições de estresses bióticos e abióticos e reduzir o crescimento, provavelmente como parte de uma resposta de adaptação (Soares et al., 2007).

Dentro desta abordagem, o PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga) é um dos mais significativos remanescentes de Mata Atlântica em área urbana do país (Barros et al., 2002). Está situado na região sul do município de São Paulo, em área altamente urbanizada na cidade de São Paulo e com alto fluxo de veículos leves e pesados, e recebe inúmeros poluentes atmosféricos, como o material particulado contendo metais (Domingos et al., 2002; Fernandes

et al., 2002). Acúmulo de Cu, Mn, Ni, Pb e Zn encontrados na camada superficial do solo coletada neste remanescente florestal indica contaminação do solo por esses metais traço (Nakazato et al., 2021). O PEFI também é afetado pelas mudanças climáticas, pois estudos realizados nesse parque verificaram que nas últimas sete décadas houve aumento na temperatura do ar de 2,17 °C, diminuição de 7% na umidade relativa e um aumento de 400 mm da precipitação anual, alterações causadas por impactos antrópicos do uso do solo e cobertura (Pereira Filho et al., 2007; Funari e Pereira Filho, 2014). Mudanças na temperatura e a inserção de potenciais poluentes nos solos impõem danos às comunidades vegetais, afetando seus processos fisiológicos (Glaubitz et al., 2015) (Gomes et al., 2016). Ainda, a temperatura modula as atividades enzimáticas em células vivas, incluindo a ativação, síntese e reparo de moléculas danificadas (Sobrinho et al., 2007), neutralizando os danos induzidos pela exposição a compostos perigosos. Desta forma, as atividades dos sistemas antioxidantes estão intrinsecamente relacionadas às mudanças de temperatura (Bicalho et al., 2017; Staehr e Sand-Jensen, 2006). Porém, os níveis de tolerância de muitas espécies vegetais de fragmentos de Mata Atlântica, como o PEFI, não são bem estabelecidos quando submetidas aos poluentes aéreos e alterações climáticas. Ainda, estudos demonstram que as defesas antioxidantes são induzidas e reguladas em maior grau em espécies mais tolerantes a esses estressores, em comparação com as sensíveis. No entanto, informações sobre a dinâmica das defesas antioxidantes das plantas são valiosas para compreensão de como esses mecanismos de defesa atuam, tanto para as plantas sensíveis como para as tolerantes, a fim de reduzir os efeitos prejudiciais causados pelo excesso de metais e elevação de temperatura.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Neste estudo, submeteu-se duas espécies de diferentes grupos funcionais, sendo uma arbórea pioneira e uma arbórea não pioneira aos estressores: elevação de temperatura e deposição no solo de Cu, Ni e Zn.

Desta forma, com base na contextualização teórica apresentada anteriormente, o projeto se baseou na hipótese que alguns constituintes vegetais presentes em fragmentos florestais urbanos, como as espécies pioneiras, podem ser menos suscetíveis às emissões de poluentes atmosféricos, como os metais adsorvidos ao material particulado atmosférico, e elevação de temperatura, enquanto espécies não pioneiras podem ser mais suscetíveis a esses estressores.

Os objetivos propostos para este estudo são:

2.1. Objetivo Geral

Avaliar estratégias de desintoxicação e os níveis de tolerância de plantas de diferentes grupos funcionais.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar:

- a) se a disponibilidade de Cu, Zn e Ni em solo aumenta com a elevação de temperatura;
- b) o perfil temporal das defesas antioxidantes e dos indicadores de danos celulares em raízes e folhas da arbórea pioneira e da arbórea não pioneira submetidas à elevação de temperatura e ao excesso de Cu, Zn e Ni;
- c) se a elevação de temperatura e o excesso de Cu, Zn e Ni em solo alteram o desenvolvimento de uma arbórea pioneira e uma arbórea não pioneira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Escolhas das espécies e plantio

Foram selecionadas duas espécies arbóreas nativas, presentes em abundância no Parque Estadual das Fontes (PEFI), sendo uma pioneira (*Croton floribundus*) e a outra não pioneira (*Esenbeckia leiocarpa*) por meio da obtenção e cultivo de mudas das espécies.

As espécies arbóreas foram obtidas em tubetes através de doação do viveiro de mudas da CESP/Paraíbuna. As mudas foram transferidas para vasos, contendo solo coletado no fragmento florestal do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). O fragmento foi escolhido por estar inserido na malha urbana da cidade de São Paulo e exposto à deposição de material particulado de origem veicular enriquecido de metais pesados, como Cu, Zn e Ni. Foi coletada a camada superficial de solo em vários pontos da floresta, excluindo a serapilheira depositada em sua superfície. O solo foi misturado, seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 5 cm antes do plantio das mudas.

Após o plantio, as árvores foram mantidas em viveiros, com adubação balanceada, irrigação adequada e livres de insetos e pragas, até o início dos experimentos, a serem conduzidos em uma câmara climatizada instalada no Instituto de Pesquisas Ambientais.

3.2. Delineamento Experimental

As espécies arbóreas pioneira (*C. Floribundus*) e não pioneira (*E. leiocarpa*), após plantio e período de adaptação, foram transportadas para a câmara climatizada (Figura 1), distribuídas nos dois ambientes (ambientes 1 e 2) e submetidas a 2 tratamentos, sendo:

- a. Tratamento sem excesso de metais (adubado): solo do PEFI com adição de solução nutritiva balanceada;
- b. tratamento com excesso de metais (+Zn+Ni+Cu): solo do PEFI com solução nutritiva balanceada, acrescida de maior dosagem de Zn, Ni e Cu.



Figura 1. Câmara climatizada inserida no Instituto de Pesquisa Ambientais.

As soluções nutritivas balanceadas e com maior dosagem de Ni, Zn e Cu foram aplicadas uma única vez. As doses de Ni, Zn e Cu no tratamento com adição de metais foram três vezes mais altas do que as concentrações propostas pela CETESB para prevenção de riscos associados à contaminação de solos no Estado de São Paulo (30 mg.kg⁻¹ de solo para Ni, 60 mg.kg⁻¹ de solo para Cu e 86 mg.kg⁻¹ de solo para Zn; CETESB, 2014). Como as soluções enriquecidas de Ni, Zn e Cu foram preparadas a partir dos sais de sulfato, foi necessário utilizar diferentes reagentes a fim de manter as soluções nutritivas balanceadas, como discriminados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações (mg/kg de solo) de nutrientes, Zn, Ni e Cu aplicadas no solo das mudas das espécies pioneira e não pioneira.

	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cl	Fe	Mn	Mo	Zn	Ni	Cu
Tratamento														
Adubado	200	300	100	154	100	230	0,1	220	0,3	0,5	0,001	0,05	0	0,05
+Zn +Ni +Cu	200	300	100	154	100	230	0,1	220	0,3	0,5	0,001	258	90	180

As plantas foram irrigadas com água deionizada de modo a não ultrapassar o limite de capacidade de retenção de água no solo durante a experimentação.

Cada ambiente da câmara continha duas bancadas com 3 luminárias LED PAR com potência 1.200 w em cada bancada, que recebia ar filtrado com filtros de partículas finas e grossas e gases de ozônio e óxidos de nitrogênio e com umidade e temperatura controladas.

O experimento foi conduzido em câmara climatizada financiada no âmbito do Plano de Desenvolvimento Institucional intitulado “Desafios para conservação da biodiversidade frente a mudanças climáticas, poluição e uso e ocupação do solo (proj. FAPESP 2017/50341-0)”. No ambiente 1 da câmara, as plantas foram mantidas em termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite, representando o cenário atual da região sul do município de São Paulo. No ambiente 2, as plantas foram mantidas em termoperíodo de 32 °C dia/20 °C (Figura 2), simulando a situação futura baseada na evolução da temperatura média anual ao longo de toda a série da estação meteorológica do IAG, que, apesar das flutuações interanuais, as temperaturas médias, máximas e mínimas possuem uma tendência de aumento, apontando que de 1933 a 2017, a temperatura média na estação aumentou aproximadamente 2,3 °C (IAG/USP, 2017).

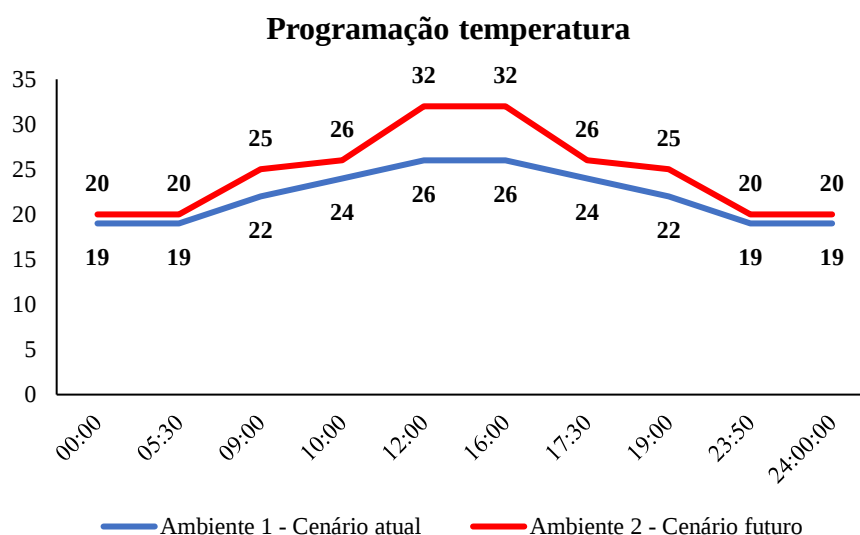


Figura 2. Curva de temperatura ao longo do dia/noite. Ambiente 1 com termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite; Ambiente 2 com termoperíodo de 32 °C dia/20 °C.

O experimento foi iniciado com 48 plantas de cada tratamento de solo, sendo 12 plantas por réplica distribuídas aleatoriamente no interior de cada câmara (Figura 3).



Figura 3. Espécies arbóreas distribuídas e condicionadas aos tratamentos em câmara climatizada, *Croton floribundus* (A) e *Esenbeckia leiocarpa* (B).

Cada experimento foi conduzido por 28 dias, sendo que foram retiradas, aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias, 3 plantas de cada réplica de tratamento de solo e de cada câmara. Folhas, raízes e caule das 3 plantas por réplica foram reunidos, obtendo 4 amostras de cada órgão por tratamento de solo e por câmara no tempo 0 e a cada 7 dias. Uma parte do material de folhas e raízes foi imediatamente triturada em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C, até o momento da análise dos antioxidantes enzimático e não enzimático e das espécies reativas de oxigênio (EROs). O restante do material foi pesado para determinação da massa fresca, armazenado em sacos de papel e seco em estufa para a determinação da massa seca. O solo usado no experimento também foi reunido a cada sete dias, obtendo quatro amostras mistas, por tratamento. Essas amostras foram secas em estufa e peneiradas, para a determinação das concentrações biodisponíveis de Ni, Cu e Zn.

Considerando *C. floribundus* e *E.leiocarpa*, foram determinados os tióis (GSH/GSSG) em folhas e raízes e carotenoides, pigmentos [(Chl a; Chl b e Chl total (a+b)], malondialdeído (MDA) e hidroperóxido dieno conjugado (HPCD) em folhas. Ainda, as amostras de *E.leiocarpa* também foram submetidas às análises das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT),

ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em folhas e raízes e as espécies reativas de oxigênio em folhas [radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)].

3.3. Procedimentos analíticos

3.3.1. Defesas antioxidantes e indicadores de danos celulares

a. Defesas antioxidantes:

- **Tióis:** os conteúdos de glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH + GSSG) foram obtidos em extratos preparados a partir de 1,0 g de material vegetal homogeneizadas em ácido sulfosalicílico 0,1%. Após centrifugação foram realizadas duas reações e leituras em espectrofotômetro a 412 nm. Para a primeira reação, para obtenção da GSH, ao extrato foi adicionado a mistura de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 com 0,5 mM de EDTA, e ácido 5,5- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 3 mM. Após 5 minutos foi realizada a leitura. Na segunda reação, para a obtenção de GSH total, na mesma mistura, foram adicionados glutathiona redutase e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) 0,4 mM. Após 20 minutos, foi realizada a leitura (Israr et al., 2006). O conteúdo de GSSG foi calculado pela subtração entre GSH total e GSH reduzida. Também foram calculadas as razões GSH/GSSG, com a finalidade de determinar a capacidade de oxi-redução da glutathiona.
- **Carotenoides:** os métodos de extração e análise foram os mesmos descritos a seguir para pigmentos.
- **Enzimas:** as amostras vegetais foram preparadas sendo homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 4% (p/v) de PVPP resultado no extrato para os ensaios das atividades das enzimas glutathiona redutase, catalase e ascorbato peroxidase (Azevedo et al., 1998). A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada como descrito por Smith et al., (1998), com alterações. O extrato vegetal foi inserido numa mistura de reação contendo tampão fosfato 100 mM pH 7,5, DTNB 1 mM, NADPH 0,1 mM e glutathiona oxidada (GSSG) 1 mM, a 30 °C. A atividade da enzima foi obtida da adição de NADPH, que permite a redução da GSSG pela enzima GR contida no extrato vegetal, logo após foi medida em espectrofotômetro a 412 nm. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada como descrito por Kraus et al., (1995) em espectrofotômetro com algumas modificações

conforme Azevedo et al., (1998). À temperatura de 25°C, o extrato vegetal foi adicionado em uma mistura de reação de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo H₂O₂ 30%. A reação é iniciada pela adição do extrato vegetal. A atividade foi determinada seguindo-se a decomposição de H₂O₂ através das alterações na absorbância a 240nm. A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), com modificações. A mistura de reação consistiu de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 5 mM e H₂O₂ 2 mM. A reação é iniciada com a adição do extrato vegetal à mistura. A atividade foi medida em espectrofotômetro a 290 nm, por meio da decomposição do H₂O₂. As atividades enzimáticas foram expressas por unidade de proteína. A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método proposto por Bradford (1976) utilizando o Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent, com albumina de soro bovino como padrão. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 595 nm.

b. Indicadores de danos celulares

- Pigmentos: foram obtidos a partir do método de Pignata et al., (2002) em etanol à 96% com leitura em espectrofotômetro a 649 nm para clorofila a, 666 nm para clorofila b e 470 nm para carotenoides. Os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de massa seca.
- Hidroperóxido dieno conjugado (HPDC): para determinação do conteúdo de HPDC foi utilizado 0,1 mL do extrato etílico da clorofila (descrito acima), adicionado 2,9 mL de etanol 96% e feito a leitura em espectrofotômetro a 234 nm (Levin e Pignata, 1995).
- Malondialdeído (MDA): o método utilizado foi o proposto por Heath e Packer (1968); Buege e Aust (1978), com modificações. O material vegetal foi homogeneizado em ácido tricloroacético contendo PVPP, seguido de centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético contendo ácido tiobarbitúrico, que foi mantido por 30 minutos a 95 °C em banho-maria. Ao ser retirada do banho, a amostra sofreu rápido resfriamento em gelo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.
- Radical ânion superóxido (O₂^{•-}): para esta análise, foi macerado 0,1 g do material vegetal em 3 ml de tampão fosfato de potássio 65 mM (pH 7,8) com PVPP e centrifugado em seguida. Ao sobrenadante foram adicionados 0,500 ml de tampão e 0,100 ml de cloridrato de hidroxilamina e incubado a 25 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 1 ml de ácido 3- Aminobenzenosulfônico e 1 ml de 1-

Naftilamina, após isso, mantido a 25 °C por 20 minutos e leitura em espectrofotômetro a 530 nm (Wang e Luo, 1990).

- **Peróxido de hidrogênio (H_2O_2):** o conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado através da reação com o iodeto de potássio (KI). Amostras de folhas frescas foram maceradas em 1 mL de ácido tricloroacético 0,1%, centrifugadas e ao sobrenadante, foram adicionados 200 µl de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e 800 µL de solução 1M de KI. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 390 nm (Alexieva et al., 2001).
- **Radical hidroxila ($OH^\bullet$):** para determinação do radical hidroxila, foi utilizado o método da desoxirribose, segundo o qual os radicais $OH^\bullet$ são gerados pela uma mistura de ácido ascórbico/ H_2O_2 / Fe^{3+} -EDTA. Alguns dos compostos resultantes reagem positivamente com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e com aquecimento, tornando possível o cálculo da constante de velocidade da reação (Halliwell et al., 1987).

3.3.2. Concentração de Cu, Zn e Ni

As amostras de folhas e raízes foram submetidas a digestão ácida, utilizando HNO_3 e $HClO_4$ a 210 °C em bloco digestor. Após digestão, os extratos foram avolumados, armazenados em frascos de polipropileno e encaminhados para a realização das análises de Zn, Cu e Ni em ICP-OES localizado no Instituto Agronômico de Campinas - IAC.

As amostras de solo foram encaminhadas para o Departamento de Ciência do Solo/ESALQ/USP para determinação da biodisponibilidade de Cu e Zn.

3.3.3. Análise de fertilidade do solo

O solo usado no início do experimento (0 dia) e após 28 dias foram reunidos, obtendo quatro amostras mistas para 0 dia e para 28 dias, por tratamento. As amostras foram secas em ar ambiente, peneiradas, armazenadas em frascos de polipropileno, e encaminhados para o Departamento de Ciência do Solo/ESALQ/USP para avaliação da fertilidade do solo (pH-CaCl₂, MO, P, K, Ca, Mg, H⁺Al, SB, CTC, Al, S, Na, PST, V, Na, Si, B, Fe e Mn).

3.3.4. Tratamento dos dados

Foram utilizadas as análises de variância com três fatores (temperatura, adição de metais e tempo). Sendo utilizados testes de comparações entre as médias relativas dos fatores temperatura e adição de metais.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros da fertilidade do solo

A análise de variância com três fatores (ANOVA) foi realizada para determinar o efeito da temperatura, tempo, adição de metais e as interações desses três fatores nas variáveis verificadas neste estudo.

Assim, a ANOVA com três fatores (temperatura, tempo e tratamento/metais) na avaliação de fertilidade do solo antes (0 dia) e no final do experimento (28 dias) com as espécies arbóreas indicou que os parâmetros de pH (CaCl₂), matéria orgânica (M.O.), acidez potencial (H+Al) e os macronutrientes fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K) aumentaram aos 28 dias no solo da espécie *C. floribundus*. O fator temperatura foi expressivo para o pH do solo dos tratamentos de temperatura alta desta espécie ao final do experimento. As concentrações de cálcio (Ca), magnésio (Mg), soma de bases trocáveis (SB) e da capacidade de troca catiônica (CTC) e a porcentagem dos pontos de troca de cátions ocupados por bases (V%) no solo desta espécie declinaram ao longo do tempo (Tabela 2).

Na espécie *E. leiocarpa*, pH (CaCl₂) do solo foi elevado aos 28 dias e obteve diferença entre os tratamentos com e sem adição de metais. P e K apresentaram maiores concentrações aos 28 dias, em comparação ao 0 dia, e menores valores de Ca, Mg, SB, CTC e V%. Diferenças entre os tratamentos Tatural e Tatural+M e também Talta e Talta+M foram observadas aos 28 dias para o pH (CaCl₂), S e V% (Tabela 2).

As concentrações do alumínio (Al) e micronutrientes essenciais (ferro-Fe, boro-B e manganês-Mn) disponíveis no solo são apresentadas na Tabela 2. Al e Fe não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo para ambas as espécies. As concentrações de B aumentaram aos 28 dias no solo da espécie *C. floribundus* e houve diferenças no tratamento com adição de metais no solo da espécie *E. leiocarpa*. Manganês também apresentou aumento ao longo do tempo para ambas as espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de fertilidade em solo da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* antes (0 dia) e após (28 dias) de serem submetidas aos diferentes tratamentos.

<i>C. floribundus</i>									<i>E. leiocarpa</i>							
Tatual		Tatual+M		Talta		Talta+M			Tatual		Tatual+M		Talta		Talta+M	
	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias	O dia	28 dias
pH	5,2b	5,3a	5,2b	5,3a	5,2b	5,5a*	5,2b	5,5a*	5,2b	5,8aA	5,2b	5,4aB	5,2b	5,7aA	5,2b	5,4aB
MO	27b	28a	27b	30a	27b	30a	27b	30a	27	26	27	27	27	27	27	25
P	8b	17a	8b	17a	8b	17a	8b	23a	8b	14a	8b	17a	8b	16a	8b	14a
V	85a	69b	85a	75b	85a	73b	85a	75b	85a	75bA	85a	69bB	85a	74bA	85a	72bB
Al ³⁺	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H+Al	27b	30a	27b	31a	27b	32a	27b	31a	27	26	27	32	27	28	27	30
K	3,6b	6,1a	3,6b	5,9a	3,6b	4,5a	3,6b	5,8a	3,6b	5,9a	3,6b	5,6a	3,6b	5,2a	3,6b	6,9a
Ca	127a	55b	127a	75b	127a	72b	127a	77b	127a	65b	127a	57b	127a	64b	127a	62b
Mg	23a	9b	23a	10b	23a	9b	23a	9b	23a	8b	23a	8b	23a	8b	23a	9b
SB	153a	70 b	153a	91b	153a	86b	153a	92b	153a	79b	153a	71b	153a	77b	153a	77b
CTC	180a	100b	180a	122b	180a	118b	180a	123b	180a	105b	180a	103b	180a	105b	180a	107b
S	35b	63a	35b	72a	35b	70a	35b	68a	35ab	11abB	35b	60aA	35ab	28abB	35b	65aA
B	0,3b	0,6aB	0,3b	0,7aA	0,3b	0,6aB	0,3b	0,8aA	0,3ab	0,5abB	0,3b	0,6aA	0,3ab	0,5abB	0,3b	0,9baA
Fe	34,1	34,7	34,1	35,3	34,1	36,1	34,1	35,8	34,1	33,6	34,1	27,8	34,1	36,5	34,1	33,9
Mn	7,8b	41,0a	7,8b	46,9a	7,8b	46,6a	7,8b	46,9a	7,8b	23,4a	7,8b	20,8a	7,8b	22,8a	7,8b	25,3a

Unidades: MO (g.kg⁻³); P (mg kg⁻³); V (%); Al³⁺, H+Al, Na, K, Ca, Mg, SB e CTC (mmol_c kg⁻³); S, B, Fe e Mn (mg kg⁻³).

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, espécie e tempo.

4.2. Concentração de Zn e Cu disponíveis no solo em *C. floribundus* e *E. leiocarpa*

Análise com três fatores (ANOVA) foi realizada para determinar o efeito da temperatura, tempo, adição de metais e as interações desses fatores na disponibilidade de Zn e Cu no solo de *C. floribundus* e *E. leiocarpa*.

A ANOVA fatorial mostrou que os fatores de tratamento/metais e tempo foram expressivos na variação das concentrações de Zn no solo da espécie pioneira (*C. floribundus*), assim como influência entre eles. Para Cu, os três fatores foram significativos (Tabela 3). A disponibilidade de Zn no solo da espécie pioneira se manteve no tratamento de temperatura alta (Talta) durante os 28 dias. Essa disponibilidade aumentou dos 7 para os 28 dias nos tratamentos com adição dos metais em ambos os tratamentos de temperatura (Figura 4A; Tabela 3.1). A concentração de Cu nesta espécie segue o mesmo perfil que para o Zn, exceto aos 21 dias em temperatura alta com adição de metais (Talta+M), como é possível identificar na figura 4B (Tabela 3.1). Na espécie não pioneira (*E. leiocarpa*) os tratamentos com adição dos metais inicialmente tiveram maior disponibilidade de Zn e Cu, declinando aos 28 dias (Figura 4B, Tabela 3.1) despontando que os fatores de tratamento/metais e tempo foram significativos (Tabela 3).

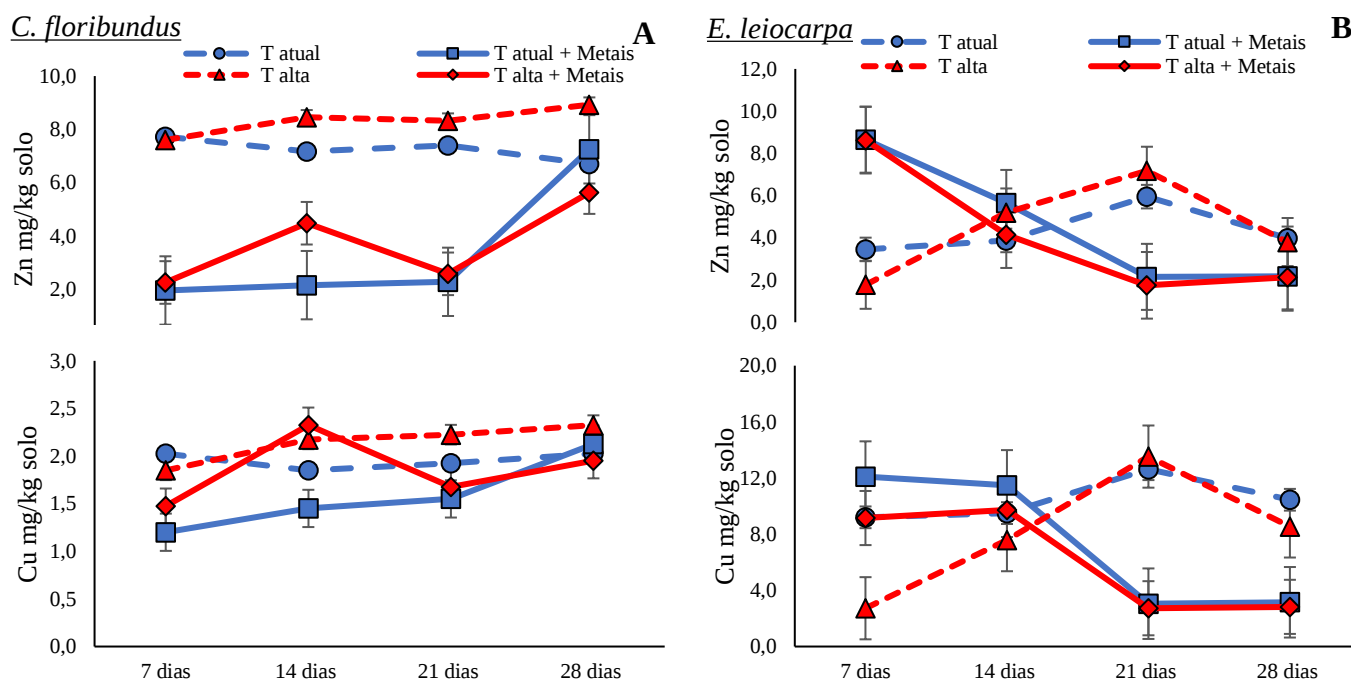


Figura 4. Concentração de metais (Zn e Cu) no solo da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 3. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores [temperatura, tratamento/metais (M) e tempo] para concentração de Zn e Cu no solo das espécies pioneira (*C. floribundus*) e não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
	Zn	Cu	Zn	Cu
Fatores				
1 Temperatura	0,139	0,041	0,062	0,859
2 Tratamento/M	<0,001	0,004	0,013	0,992
3 Tempo	0,006	0,032	0,123	0,234
Interação entre fatores				
1 x 2	0,424	0,693	0,602	0,710
1 x 3	0,572	0,268	0,322	0,968
2 x 3	0,008	0,334	<0,001	0,001
1 x 2 x 3	0,263	0,302	0,842	0,824

Tabela 3.1. Valores médios das concentrações de Zn (mg/kg de solo) e Cu (mg/kg de solo) no solo da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
[Zn]								
7	7,73A	1,95Bb	7,60A	2,25Bb	3,45Bb	8,65Aa	1,78Bb	8,63Aa
14	7,18A	2,15Bb	8,45A	4,48Bb	3,88ab	5,65a	5,20ab	4,15a
21	7,40A	2,28Bb	8,33A	2,58Bb	5,95Aa	2,15Bb	7,18Aa	1,75Bb
28	6,70	7,25a	8,93	5,63a	3,98Aab	2,18Bb	3,80Aab	2,13Bb
[Cu]								
7	2,03Ab*	1,20Bb	1,85Ab	1,48Bb*	9,20B	12,10Aa	2,73B	9,15Aa
14	1,85Aab	1,45Bab	2,18Bab*	2,33Aab*	9,50	11,48ab	7,58	9,73ab
21	1,93Aab	1,55Bab	2,23Aab*	1,68Bab*	12,63A	3,05Bb	13,53A	2,73Bb
28	2,03Ba	2,13Aa*	2,33Aa*	1,95Ba	10,45	3,15b	8,55	2,83b

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, espécie e tempo.

4.3. Teor de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes de *C. floribundus* e *E. leiocarpa*

Foi determinado o conteúdo de cada metal avaliado nas folhas e raízes por meio da seguinte equação: biomassa seca de cada órgão (g) x concentração (μ g-1) de cada metal para o órgão correspondente. Os resultados de concentração dos metais obtidos para cada espécie foram submetidos à análise estatística ANOVA com três fatores (temperatura, adição de metais no solo e tempo), sendo utilizados testes de comparações entre as médias relativas dos fatores temperatura e adição de metais (significância $p < 0.05$).

A ANOVA fatorial apontou influência significativa da adição dos metais em folhas e raízes de ambas as espécies. *C. floribundus* acumulou mais Zn e Ni nos tratamentos de Tatal+M e Talta+M em todos os períodos. Cu em folhas mostrou diferenças significativas em Tatal+M. *E. leiocarpa* obteve maiores concentrações em Tatal+M e Talta+M de Ni em folhas e Cu em raízes. Significância da temperatura foi observada nas raízes de *C. floribundus* sob adição de Zn, Ni e Cu, especificamente em Talta. Esta mesma espécie também obteve influência do tempo (ao longo dos dias) nas concentrações de Ni e Cu em folhas e Zn em raízes (Tabela 4; Tabela 4.1; Figura 5A).

E. leiocarpa apresentou interação entre os fatores de metais e tempo em raízes sob adição de Ni e Cu em folhas e Ni em raízes (Tabela 4). As concentrações de Ni em folhas desta espécie foram significativamente maiores nos tratamentos com o metal dos 14 para os 28 dias. Bem como Cu em raízes em todo o período. Efeito de temperatura com Ni foi apontado nas folhas de *E. leiocarpa* aos 7 dias e com Zn em todos os períodos em Talta, mostrando assim interação entre esses fatores. Cu em folhas foi o único metal que mostrou efeito sob a decorrência do tempo nesta espécie, apontando maior acúmulo aos 14 e 28 dias em Talta+M (Tabela 4; Tabela 4.1; Figura 5B).

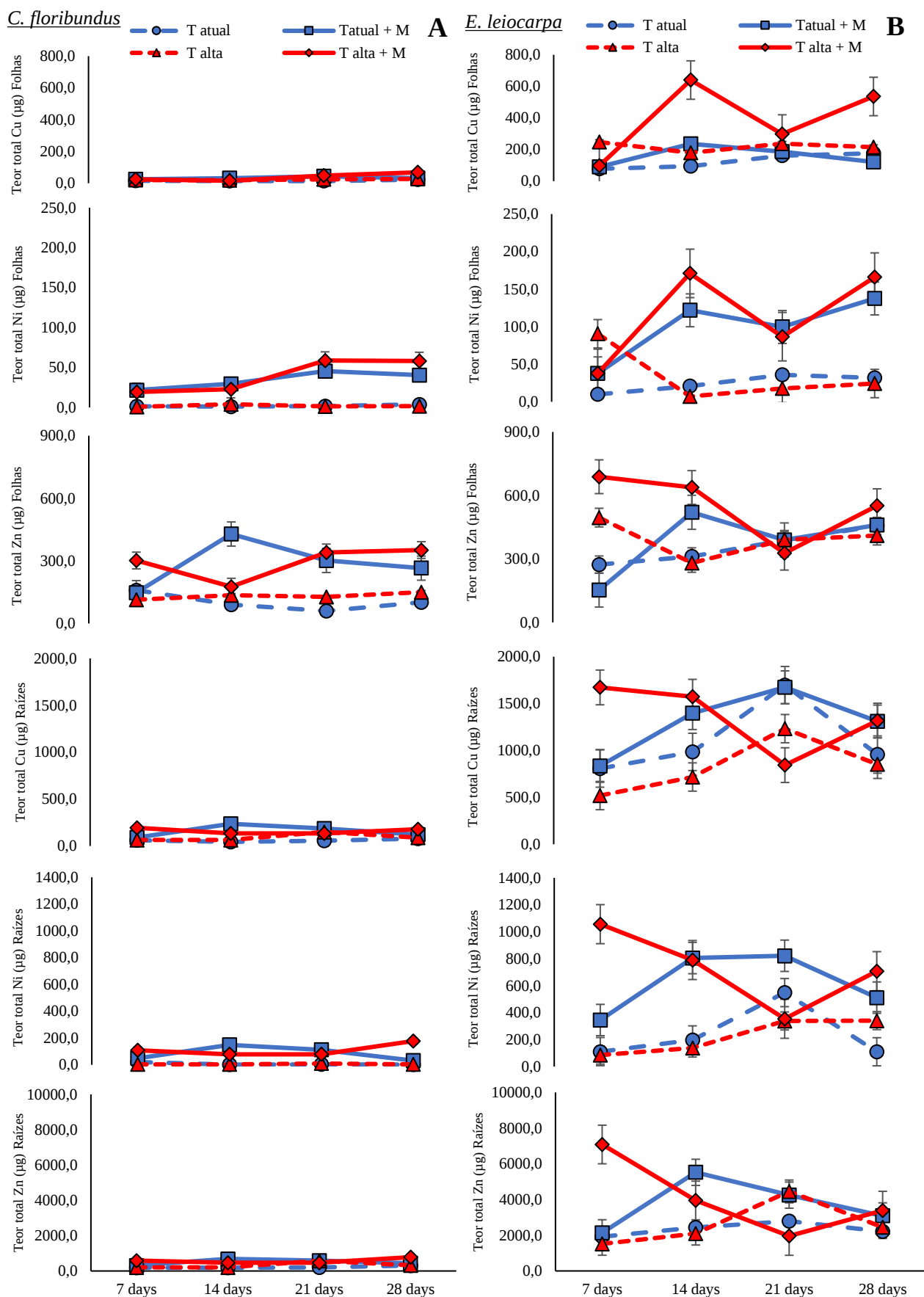


Figura 5. Teor de metais (Zn, Ni e Cu) de folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de

26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 4. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento/metais (M) e tempo) para o teor de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes das espécies pioneira (*C. floribundus*) e não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>			<i>E. leiocarpa</i>		
Concentração metais	Zn	Ni	Cu	Zn	Ni	Cu
Fatores folhas						
1 Temperatura	0,110	0,844	0,603	0,046	0,200	<0,001
2 Tratamento/M	<0,001	<0,001	<0,001	0,021	<0,001	<0,001
3 Tempo	0,221	<0,001	<0,001	0,161	0,580	0,034
Interação entre fatores						
1 x 2	0,048	0,329	<0,001	0,115	0,196	0,847
1 x 3	0,957	0,737	0,277	0,131	0,029	0,013
2 x 3	0,040	0,015	0,222	0,035	0,030	0,039
1 x 2 x 3	0,149	0,193	0,165	0,583	0,838	0,235
Fatores raízes						
1 Temperatura	0,003	0,016	0,002	0,595	0,789	0,213
2 Tratamento/M	<0,001	<0,001	<0,001	0,010	<0,001	0,002
3 Tempo	0,031	0,659	0,165	0,804	0,121	0,233
Interação entre fatores						
1 x 2	0,306	0,188	0,351	0,966	0,392	0,292
1 x 3	0,118	0,499	0,090	0,564	0,032	0,247
2 x 3	0,494	0,438	0,300	0,249	0,032	0,105
1 x 2 x 3	0,213	0,415	0,328	0,108	0,564	0,406

Tabela 4.1. Valores médios do teor de Zn, Ni e Cu em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Zn, Ni e Cu (µg)								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Folhas								
Zn								
7	159,6B	147,8A	113,9B*	301,9A	273,2b	152,9b	495,2*	688,4*
14	90,2B	428,9A	135,7B*	176,6A	311,9Bab	520,4Aa	280,9B*	637,6A*
21	60,0B	302,3A	127,6B*	340,4A	388,4ab	389,7a	390,4*	327,1*
28	101,4B	265,3A	150,2B*	352,1A	456,0a	460,2a	410,1*	551,4*
Ni								
7	1,2Bb	21,7Ab	0,7Bb	19,2Ab	9,8	37,8	90,6*	37,8*
14	1,0Bab	29,7Aab	3,9Bab	22,7Aab	20,8B	121,8A	7,1B	171,0A
21	1,5Ba	45,4Aa	1,4Ba	58,7Aa	35,8B	99,6A	17,7B	86,7A
28	3,8Ba	40,3Aa	1,7Ba	58,2Aa	31,8B	137,6A	24,3B	166,0A

Cu								
7	16,0Bb	25,0Ab	20,1b*	24,2b	78,4Bb	90,2Ab	247,5B*	97,4Ab*
14	13,6Bb	32,4Ab	19,0b*	15,9b	95,3Ba	236,2Aa	180,0B	640,2Aa
21	13,4Ba	43,7Aa	24,7a*	48,0a	162,2a	187,1a	236,8	298,6ab
28	22,8Ba	32,0Aa	27,4a*	68,4a	176,3Ba	120,7Aa	215,1B	536,2Aa
Raízes								
Zn								
7	188,4B	312,6A	205,8B*	587,8A*	1917,8B	2136,8A	1516,6B	7082,8A
14	185,1B	687,0A	205,8B*	467,8A*	2431,8B	5522,8A	2090,6B	3945,9A
21	204,3B	585,5A	579,9B*	467,8A*	2789,2B	4246,3A	4453,6	1957,8
28	306,8B	436,9A	328,7B*	782,7A*	2208,8B	3082,0A	2454,1B	3377,4A
Ni								
7	21,1B	48,7A	3,8B*	108,1A*	110,8Bb	345,1A	85,0B	1056,4A
14	2,2B	148,6A	3,8B*	78,3A*	197,6Bab	805,0A	137,2B	790,3A
21	3,3B	112,1A	9,6B*	78,3A*	548,5a*	821,9*	338,3	354,3
28	1,7B	31,5A	3,4B*	177,5A*	109,7Bab	511,4A	340,6B	707,5A
Cu								
7	61,3B	90,2A	64,4B*	193,7A*	807,6B	835,5A	519,3B	1672,7A
14	43,8B	236,2A	64,4B*	134,1A*	985,2B	1398,1A	717,3B	1573,8A
21	55,1B	187,1A	149,7B*	134,1A*	1697,2B	1674,6A	1233,2B	844,0A
28	79,0B	120,7A	87,8B*	178,3A*	956,7B	1309,9A	852,5B	1319,1A

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, espécie e tempo.

4.4. Biomassa e crescimento (altura/número de folhas) em *C. floribundus* e *E. leiocarpa*

Análise com três fatores (ANOVA) foi realizada para determinar o efeito da temperatura, tempo, adição de metais e as interações desses três fatores no desenvolvimento de *C. floribundus* e *E. leiocarpa*.

a) Crescimento em biomassa de folhas e raízes

O crescimento em biomassa do *C. floribundus* indicou com a ANOVA que os fatores tempo, interação entre os fatores tratamento/metais e tempo e interação entre os três fatores influenciaram no desenvolvimento de folhas desta espécie, onde aos 21 dias houve diferenças significativas em todos os tratamentos. Para raízes o fator tempo influenciou a biomassa, assim como a interação entre todos os fatores (Figura 6A, Tabela 5, Tabela 5.1). Os fatores temperatura e tempo influenciaram a biomassa de folhas para a espécie *E. leiocarpa*, houve diferenças significativas entre os tratamentos de temperatura alta (Talta) e temperatura atual (Tatual) e entre temperatura alta com excesso de metais (Talta+M) e temperatura atual com excesso de metais (Tatual+M) em todo o período. Interação entre tratamento e tempo foi

apontado para raízes, onde aos 21 dias houve redução da biomassa nos tratamentos com adição dos metais em comparação aos tratamentos sem excesso de metais (Figura 6B, Tabelas 5 e 5.1).

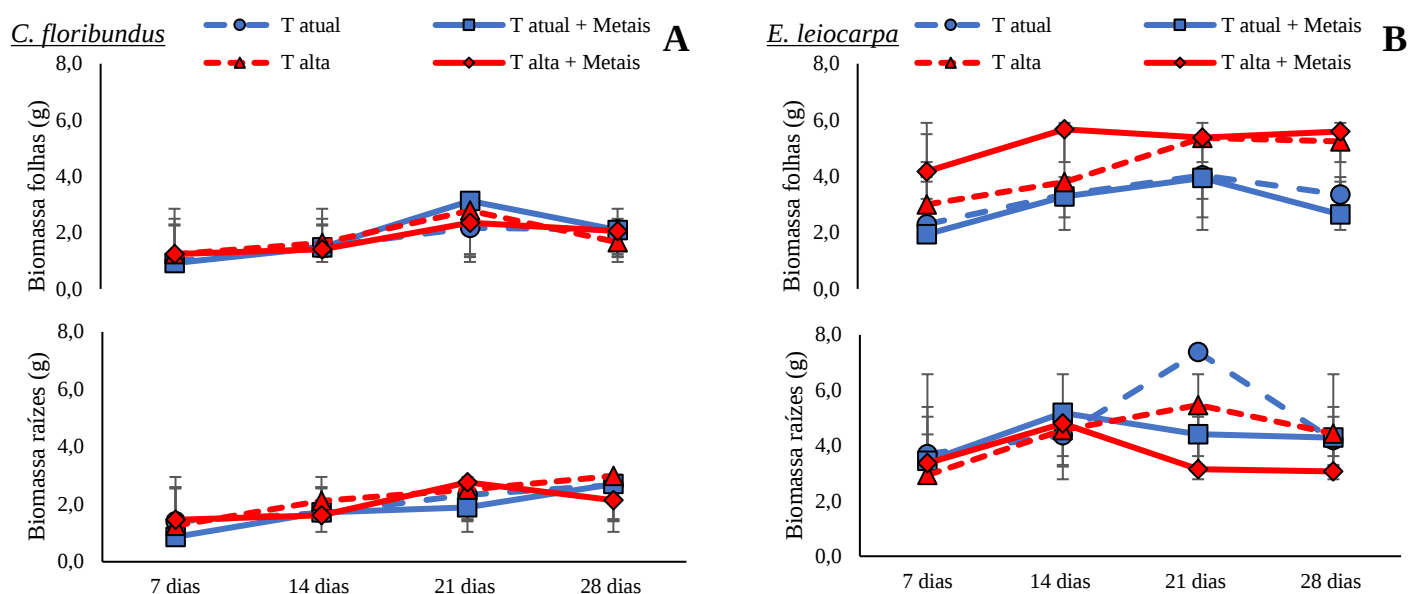


Figura 6. Biomassa de folhas e raízes expressa em massa seca (g) da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 5. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo) e interação entre eles para o crescimento em biomassa de folhas e raízes das espécies pioneira (*C. floribundus*) e não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
Crescimento em biomassa	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Fatores				
1 Temperatura	0,906	0,082	0,004	0,346
2 Tratamento	0,076	0,051	0,272	0,057
3 Tempo	<0,001	<0,001	<0,001	0,006
Interação entre fatores				
1 x 2	0,741	0,670	0,813	0,528
1 x 3	0,021	0,425	0,513	0,097
2 x 3	0,033	0,838	0,841	0,010
1 x 2 x 3	0,026	0,023	0,320	0,049

Tabela 5.1. Valores médios da biomassa (g) de folhas e raízes expressa em massa seca (g) da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Folhas								
7	0,98d	0,92d	1,23d	1,24d	2,30b	1,94b	3,00b*	4,17b*
14	1,50c	1,48c	1,63c	1,41c	3,35a	3,28a	3,79a*	5,67a*
21	2,17aB	3,12aA	2,78aA	2,35aB	4,03a	3,94a	5,37a*	5,38a*
28	2,11b	2,09b	1,66b	2,06b	3,36a	2,64a	5,24a*	5,59a*
Raízes								
7	1,41c	0,86c	1,25c	1,46c	3,69b*	3,44b*	2,94b	3,37b
14	1,69b	1,72b	2,12b	1,62b	4,37a	5,18a	4,56a	4,79a
21	2,33a	1,89a	2,51a	2,76a	7,38aA	4,41aB	5,47aA	3,14aB
28	2,67a	2,71a	2,99a	2,14a	4,19ab	4,29ab	4,44ab	3,07ab

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

b) Crescimento em altura e número de folhas

O crescimento em altura do *C. floribundus* foi influenciado pelos fatores temperatura e tratamento/M, onde no tratamento com temperatura alta (Talta) apresentou maior crescimento em altura que no tratamento com temperatura atual (Tatual) (Figura 7A, Tabelas 6 e 6.1). Em número de folhas, a variação ocorreu com os fatores tempo e temperatura, mostrando que ao fim do experimento (28 dias) houve um aumento em todos tratamentos em comparação aos 7 e 14 dias (Figura 7, Tabelas 6 e 6.1). Na espécie *E. leiocarpa* houve variação em altura entre os tratamentos com adição de metais.

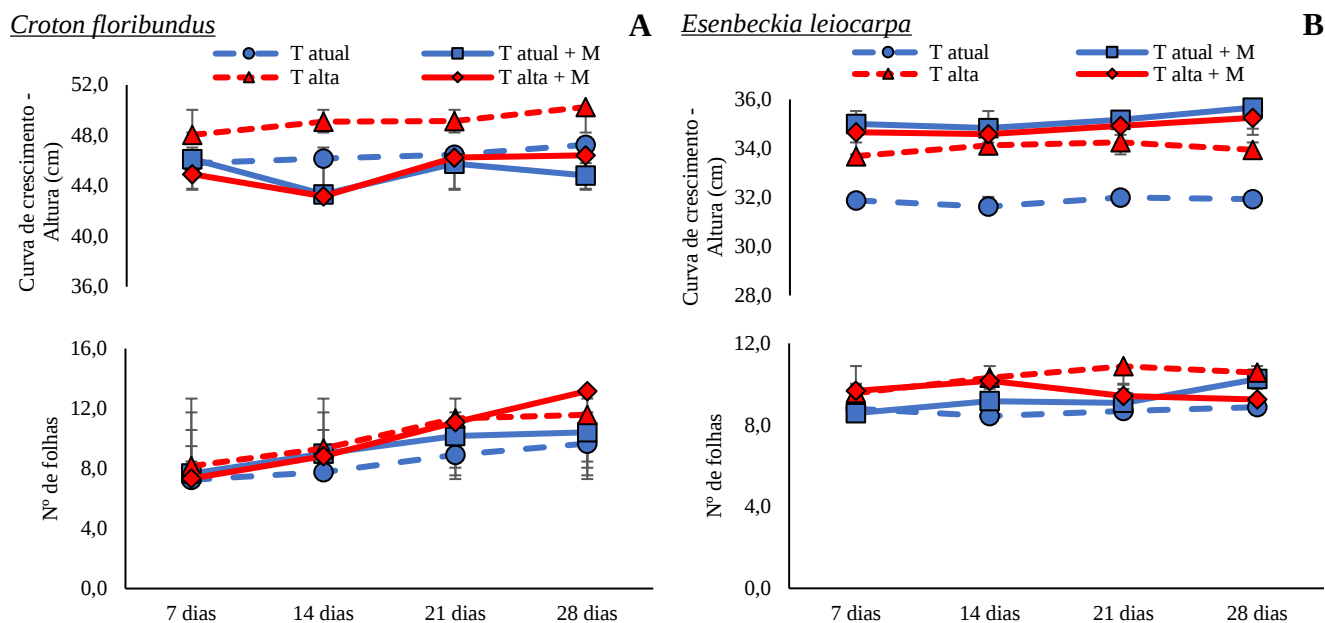


Figura 7. Curva de crescimento em altura (cm) e número de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 6. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo) para crescimento em altura (cm) e número de folhas das espécies pioneira (*C. floribundus*) e não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
Crescimento	Altura	Nº folhas	Altura	Nº folhas
Fatores				
1 Temperatura	0,045	0,007	0,929	0,159
2 Tratamento	<0,001	0,350	0,022	0,922
3 Tempo	0,416	<0,001	0,507	0,948
Interação entre fatores				
1 x 2	0,074	0,285	0,882	0,363
1 x 3	0,959	0,426	0,657	0,947
2 x 3	0,632	0,711	0,661	0,980
1 x 2 x 3	0,891	0,719	0,642	0,881

Tabela 6.1. Valores médios do crescimento em altura (cm) e número de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Crescimento em altura (cm) e N° de folhas								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Altura (cm)								
7	45,8B	46,1A*	48,0A*	44,9B	31,9B	35,0A	33,7B	34,7A
14	46,2A	43,3B*	49,1A*	43,2B	31,6B	34,8A	34,1B	34,6A
21	46,5A	45,8B	49,1A*	46,3B*	32,0B	35,2A	34,3B	34,9A
28	47,3A	44,8B	50,3A*	46,4B*	31,9B	35,7A	33,9B	35,3A
N° folhas								
7	7,3b	7,7b*	8,2b*	7,3b	8,8	8,6	9,6	9,7
14	7,8b	9,0b*	9,3b*	8,8b	8,4	9,2	10,3	10,2
21	8,9a	10,2a	11,3a*	11,1a*	8,7	9,1	10,9	9,4
28	9,7a	10,4a	11,6a*	13,2a*	8,9	10,3	10,6	9,3

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

4.5. Respostas de antioxidante não enzimático, pigmentos e indicadores de danos celulares em *C. floribundus* e *E. leiocarpa*.

a) Glutationa reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e razão GSH:GSSG

A ANOVA fatorial (temperatura, tratamento/metais e tempo) mostrou que as concentrações de GSH em *C. floribundus* foram influenciadas pelo fator tempo em folhas e raízes, pelo fator temperatura em folhas e pela interação entre os fatores temperatura e tempo em raízes (Tabela 7). É importante destacar que o conteúdo de GSH em folhas e raízes diminuiu dos 7 para os 28 dias em todos os tratamentos (Figura 8A, Tabela 7.1).

Considerando a espécie *E. leiocarpa*, GSH foi influenciada pelos fatores tempo e temperatura em raízes e fator temperatura em folhas. Talta e Talta+M em raízes apresentaram as maiores concentrações em todos os períodos em comparação a Tatual e Tatual+M, respectivamente (Tabelas 7 e 7.1). Ainda, GSH em raízes aumentou dos 7 para os 28 dias em todos os tratamentos (Tabela 7.1).

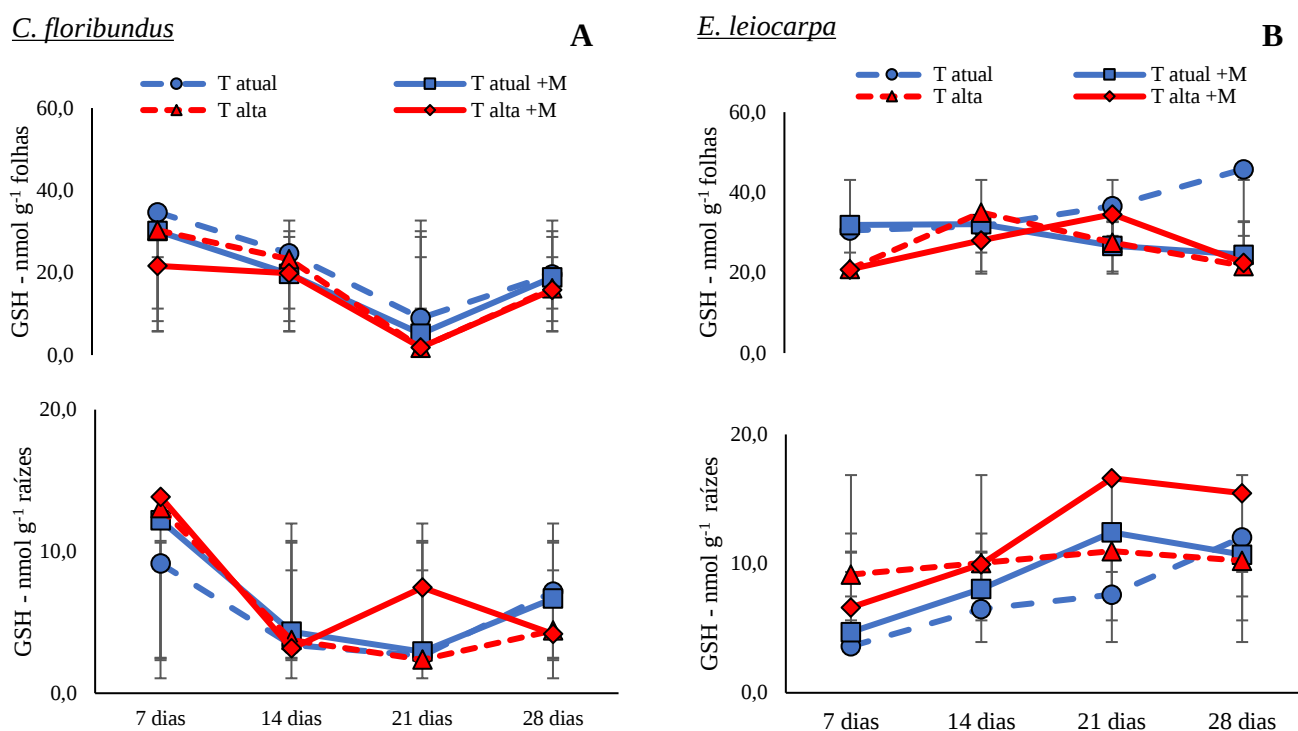


Figura 8. Concentrações de GSH de folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 7. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial GSH (Glutathiona reduzida)	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Fatores				
1 Temperatura	0,037	0,929	0,011	0,004
2 Tratamento	0,074	0,161	0,127	0,071
3 Tempo	<0,001	<0,001	0,276	<0,001
Interação entre fatores				
1 x 2	0,908	0,572	0,106	0,792
1 x 3	0,689	0,003	0,116	0,817
2 x 3	0,656	0,354	0,375	0,179
1 x 2 x 3	0,886	0,517	0,079	0,288

Tabela 7.1. Valores médios de GSH em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

GSH nmol g ⁻¹								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Folhas								
7	34,7a*	30,1a*	30,3a	21,7a	30,6*	31,9*	20,9	20,9
14	24,7b*	19,7b	23,3b	19,9b*	31,6	32,1*	35,0*	28,1
21	9,0c*	5,2c*	1,8c	1,9c	36,6*	26,7	27,5	34,6*
28	19,6b*	18,9b*	16,2b	15,8b	45,8*	24,5*	21,7	22,5
Raízes								
7	9,1a	12,2a	13,1a	13,8a	3,6b	4,7b	9,2b*	6,6b*
14	3,4b	4,3b	3,7b	3,2b	6,5ab	8,1ab	10,1ab*	9,9ab*
21	2,6b	2,9b	2,4b	7,4b	7,6a	12,4a	11,0a*	16,6a*
28	7,2c	6,7c	4,4b	4,2c	12,0a	10,7a	10,2a*	15,4a*

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

As concentrações de glutathiona oxidada (GSSG) em *C. floribundus* foram influenciadas pelo fator tempo e interações entre todos os fatores em folhas e raízes (Tabela 8). Nas folhas houve aumento significativo de glutathiona oxidada aos 14 dias em todos os tratamentos. Nas raízes ocorreu declínio significativo de GSSG aos 28 dias em todos os tratamentos. Também nas raízes, houve diferença significativa aos 21 dias em Tatual em comparação ao Tatual+M (Tabela 8.1; Figura 9).

Para *E. leiocarpa*, as concentrações de GSSG foram influenciadas pelo fator tempo e interação entre os fatores tempo e tratamento/M em raízes e pela interação dos fatores temperatura e tempo em folhas (Tabela 8). Nas folhas, aos 21 dias foram encontradas as maiores concentrações de GSSG nos tratamentos Tatual e Talta. Nas raízes houve diferenças estatísticas entre Talta e Talta+M e entre Tatual+M e Talta+M, onde no tratamento Talta+M foi encontrado maior conteúdo de GSSG ao longo do tempo (Tabela 8.1; Figura 9).

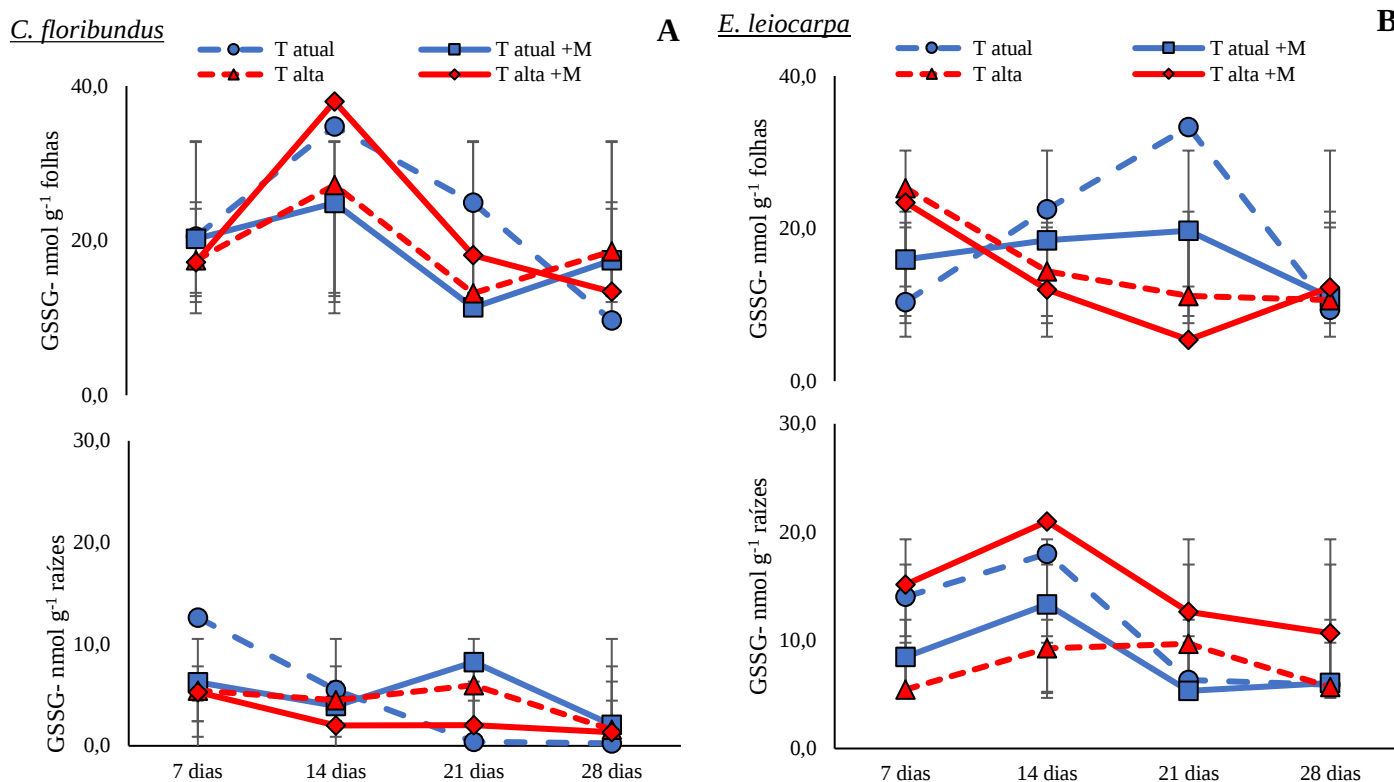


Figura 9. Concentrações dos valores médios de folhas e raízes de GSSG da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 8. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Glutathiona oxidada (GSSG) para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
GSSG	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Fatores				
1 Temperatura	0,807	0,125	0,169	0,389
2 Tratamento	0,961	0,384	0,316	0,193
3 Tempo	<0,001	<0,001	0,091	0,008
Interação entre fatores				
1 x 2	0,222	0,023	0,907	0,005
1 x 3	0,494	0,339	<0,001	0,556
2 x 3	0,631	0,200	0,270	0,963
1 x 2 x 3	0,009	<0,001	0,715	0,442

Tabela 8.1. Concentração de GSSG em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

GSSG nmol g ⁻¹								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Folhas								
7	20,5b	20,2b	17,4b	17,2b	10,4b	15,9b	25,3ab*	23,4ab*
14	34,8a	24,9a	27,2a	38,0a	22,6ab	18,5ab	14,4ab	12,0ab
21	24,9b	11,4b	13,2b	18,1b	33,3a*	19,7a*	11,2b	5,4b
28	9,7b	17,5b	18,6b	13,4b	9,4b	11,0b	10,6b	12,3b
Raízes								
7	12,6a	6,3a	5,4a	5,3a	14,0ab*	8,5ab	5,4Bab	15,1Aab*
14	5,5b	3,9b	4,5b	2,0b	18,0a*	13,3a	9,2Ba	21,0Aa*
21	0,4Bb	8,2Ab*	6,0b*	2,1b	6,3b	5,3b	9,7Bb*	12,6Ab*
28	0,2c	2,1c	1,6c	1,3c	5,9b*	6,0b	5,7Bb	10,7Ab*

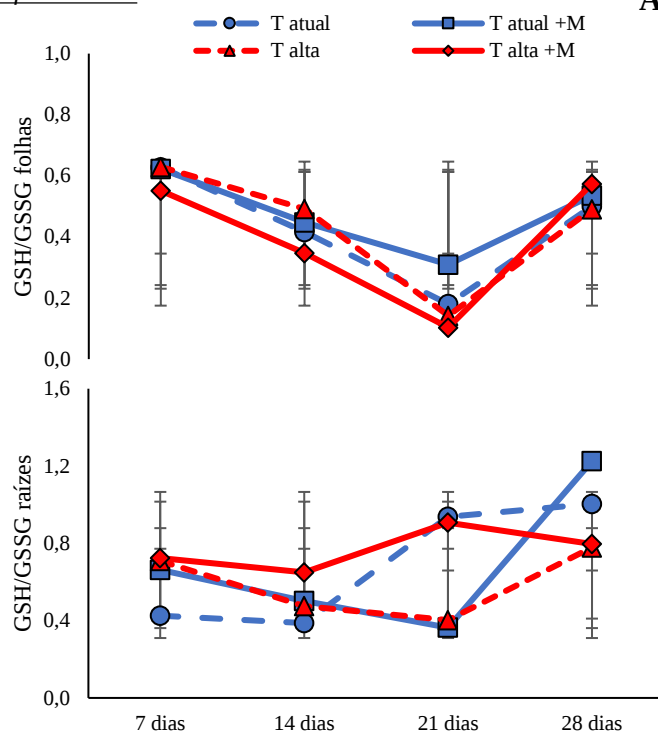
Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

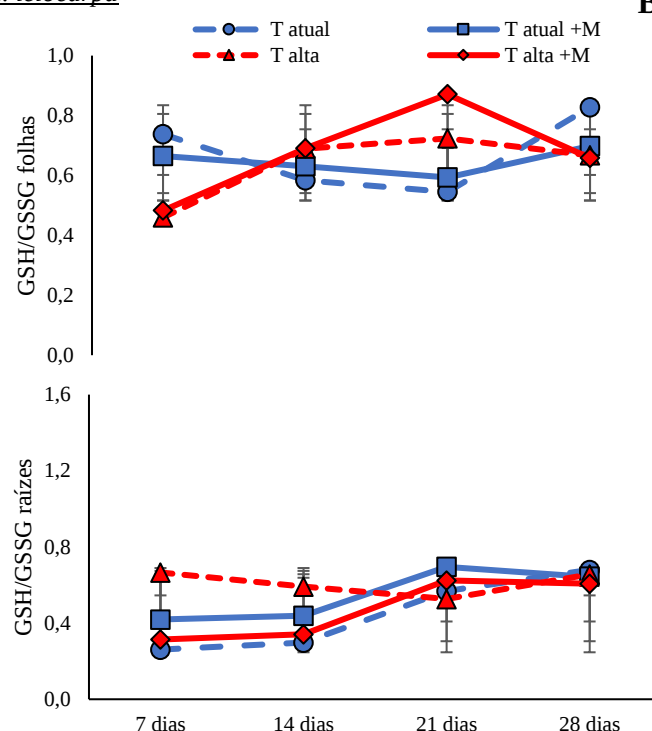
*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

A ANOVA fatorial mostrou que a razão GSH/GSSG em raízes e folhas de *C. floribundus* foram influenciadas positivamente pelo tempo decorrido e também mostrou nas raízes a interação entre os fatores temperatura e tempo e os fatores temperatura e tratamento/M. Nas folhas da espécie a única interação significativa para essa razão foi entre os fatores temperatura e tempo (Tabela 9).

A razão GSH/GSSG determina a capacidade de oxi-redução da glutathione e, desta forma, quanto mais próxima de 1 maior é sua capacidade redox. Folhas de *E. leiocarpa* tiveram o potencial redox em maior êxito em Talta em comparação ao Tatual e em Talta+M em comparação ao Tatual+M, aos 21 dias. Nas raízes, a razão GSH/GSSG foi maior aos 28 dias que no 0 dia em Tatual+M e Talta+M, onde Tatual+M foi maior que Tatual e Talta+M foi maior que Talta em todo o período (Tabela 9.1). Nas folhas, *C. floribundus* teve seu maior e menor potencial redox aos 7 e 21 dias respectivamente, em todos os tratamentos. A figura 9 ilustra o potencial redox para as espécies.

C. floribundus

A

E. leiocarpa

B

Figura 10. Razão entre GSH/GSSG dos valores médios de folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 9. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações da razão GSH/GSSG para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Razão GSH/GSSG				
Fatores				
1 Temperatura	0,861	0,504	0,915	0,101
2 Tratamento	0,446	0,647	0,872	0,743
3 Tempo	<0,001	0,016	0,199	0,002
Interação entre fatores				
1 x 2	0,078	0,047	0,438	0,001
1 x 3	0,202	0,530	0,003	0,557
2 x 3	0,189	0,536	0,560	0,034
1 x 2 x 3	0,953	0,015	0,897	0,263

Tabela 9.1. Razão GSH/GSSG em folhas e raízes da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

GSH/GSSG								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
Folhas								
7	0,63a	0,62a	0,63a	0,55a	0,74*	0,66*	0,46b	0,48b
14	0,42b	0,45b	0,49b	0,35b	0,58	0,63	0,69ab	0,69ab
21	0,18c	0,31c	0,14c	0,10c	0,54	0,59	0,72a*	0,87a*
28	0,50b	0,54b	0,49b	0,57b	0,83	0,70	0,67ab	0,66ab
Raízes								
7	0,43ab	0,66ab	0,71ab	0,72ab	0,26Bab	0,42Ab	0,67Aab*	0,31Bb
14	0,39b	0,50b	0,47b	0,65b	0,30Bab	0,44Ab	0,59Aab*	0,34Bb
21	0,94abA*	0,36abB	0,40abB	0,91abA*	0,57Bb	0,70Aa	0,53Bb*	0,62Aa
28	1,00a	1,22a	0,78a	0,80a	0,68Ba	0,64Aa	0,66Aa*	0,61Ba

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

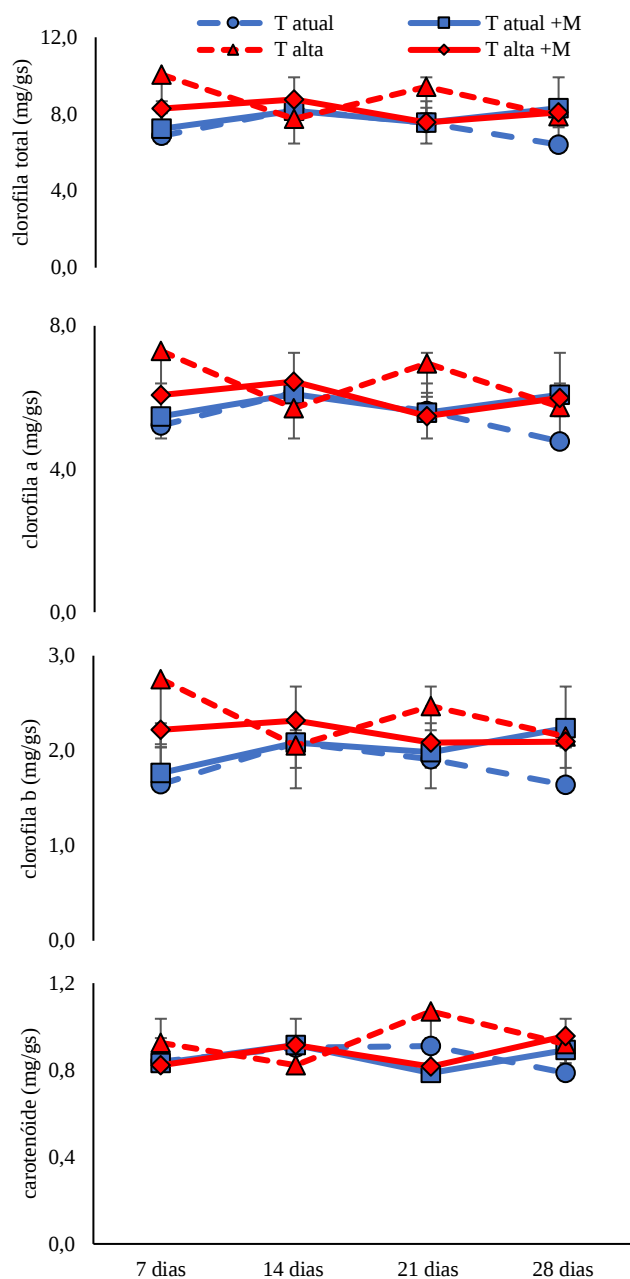
b) Pigmentos foliares [Chl total (a+b), Chl (a) e Chl (b) e carotenóides]

A concentração de clorofila *b* em *C. floribundus* foi influenciada pelo fator temperatura (Tabela 10), sendo no Talta+M maior que no Tatual+M aos 7, 14 e 21 dias e no Talta maior que no Tatual aos 7, 21 e 28 dias (Tabela 10.1; Figura 11).

Considerando os pigmentos em *E. leiocarpa*, Chl total (a+b), Chl *a* e Chl *b* foram influenciadas pelo fator tempo e houve interação entre os fatores tratamento e tempo para Chl total (a+b), Chl *a* e carotenóides (Tabela 10). As maiores concentrações de Chl total (a+b), Chl *a* e carotenóides foram encontradas aos 7 dias nos tratamentos com adição de metais (Tatual+M e Talta+M), enquanto para a Chl *b* houve diminuição aos 28 dias em comparação aos 7 dias em todos os tratamentos (Tabela 10.1; Figura 11).

C. floribundus

A

*E. leiocarpa*

B

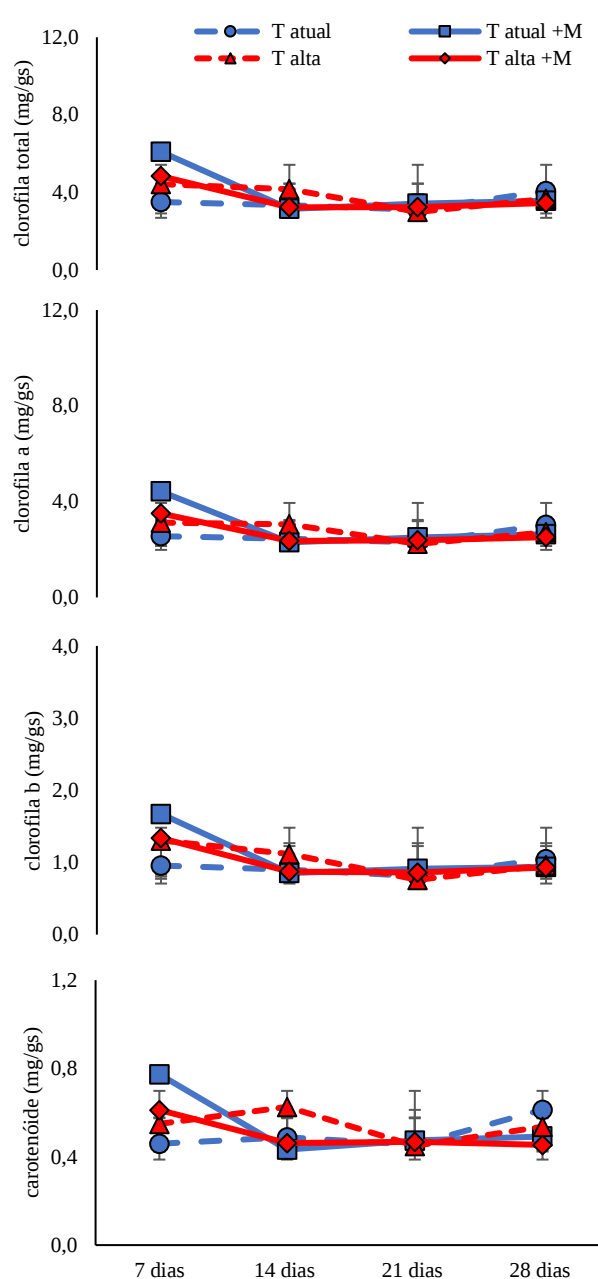


Figura 11. Concentrações dos valores médios de *Chl* total (a+b), *Chl* a e *Chl* b e carotenóides; de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 10. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Chl total (a+b), Chl a e Chl b e carotenóides para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Chl total (a+b)	Chl a	Chl b	Carotenóides	Chl total (a+b)	Chl a	Chl b	Carotenóides
Fatores								
1 Temperatura	0,050	0,094	0,007	0,402	0,905	0,846	0,936	0,924
2 Tratamento	0,966	0,931	0,936	0,596	0,415	0,437	0,383	0,980
3 Tempo	0,852	0,807	0,941	0,955	<0,001	0,002	<0,001	0,090
Interação entre fatores								
1 x 2	0,218	0,256	0,138	0,637	0,198	0,216	0,177	0,296
1 x 3	0,466	0,563	0,232	0,801	0,762	0,730	0,830	0,573
2 x 3	0,394	0,366	0,467	0,343	0,031	0,025	0,072	0,027
1 x 2 x 3	0,597	0,618	0,519	0,917	0,361	0,418	0,267	0,538

Tabela 10.1. Valores médios das concentrações de Chl total (a+b), Chl a e Chl b e carotenóides em folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Chl total (a+b), Chl a e Chl b e carotenóides (mg/g)								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
<i>Chl total (a+b)</i>								
7	6,86	7,24	10,05	8,29	3,51B	6,09Aa	4,43B	4,84Aa
14	8,22	8,18	7,75	8,76	3,35	3,15b	4,16	3,23b
21	7,53	7,55	9,42	7,57	3,11	3,42b	2,99	3,24b
28	6,41	8,31	7,88	8,08	4,07	3,57b	3,68	3,45b
<i>Chl a</i>								
7	5,21	5,47	7,30	6,07	2,55B	4,42Aa	3,12B	3,50Aa
14	6,13	6,09	5,70	6,44	2,45	2,30b	3,04	2,36b
21	5,62	5,57	6,95	5,48	2,30	2,51b	2,24	2,38b
28	4,77	6,07	5,73	5,99	3,02	2,63b	2,72	2,52b
<i>Chl b</i>								
7	1,65	1,77	2,75*	2,22*	0,96a	1,67a	1,30a	1,34a
14	2,08*	2,08	2,05	2,32*	0,90b	0,85b	1,12b	0,87b
21	1,91	1,98	2,47*	2,09*	0,81b	0,91b	0,76b	0,86b
28	1,64	2,24*	2,15*	2,09	1,05b	0,94b	0,96b	0,93b
<i>Carot.</i>								
7	0,84	0,83	0,93	0,82	0,46B	0,77Aa	0,55B	0,61Aa
14	0,90	0,92	0,82	0,92	0,49	0,43b	0,63	0,46b
21	0,91	0,79	1,07	0,82	0,45	0,47b	0,45	0,47b
28	0,79	0,89	0,92	0,96	0,61	0,49b	0,54	0,45b

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

c) Indicadores de Danos Celulares (HPDC + MDA)

As concentrações de hidroperóxido dieno-conjugados (HPDC) e Malondialdeído (MDA) na espécie *C. floribundus* foram influenciadas pelo fator tempo (Tabela 10). Nessa espécie, os conteúdos de HPDC e MDA foram maiores aos 7 dias em todos os tratamentos (Figura 12, Tabela 11.1).

Para conteúdo de HPDC em *E. leiocarpa* houve interação entre os fatores de temperatura e tempo. Nesta mesma espécie os fatores temperatura e tratamento mostraram influenciar as concentrações de MDA (Figura 12; Tabela 11), indicando que no tratamento T alta+M apresentou maiores concentrações desse marcador de danos que no T alta aos 14, 21 e 28 dias, enquanto no T atual+M foi maior que no T atual aos 7, 14 e 21 dias (Tabela 11.1).

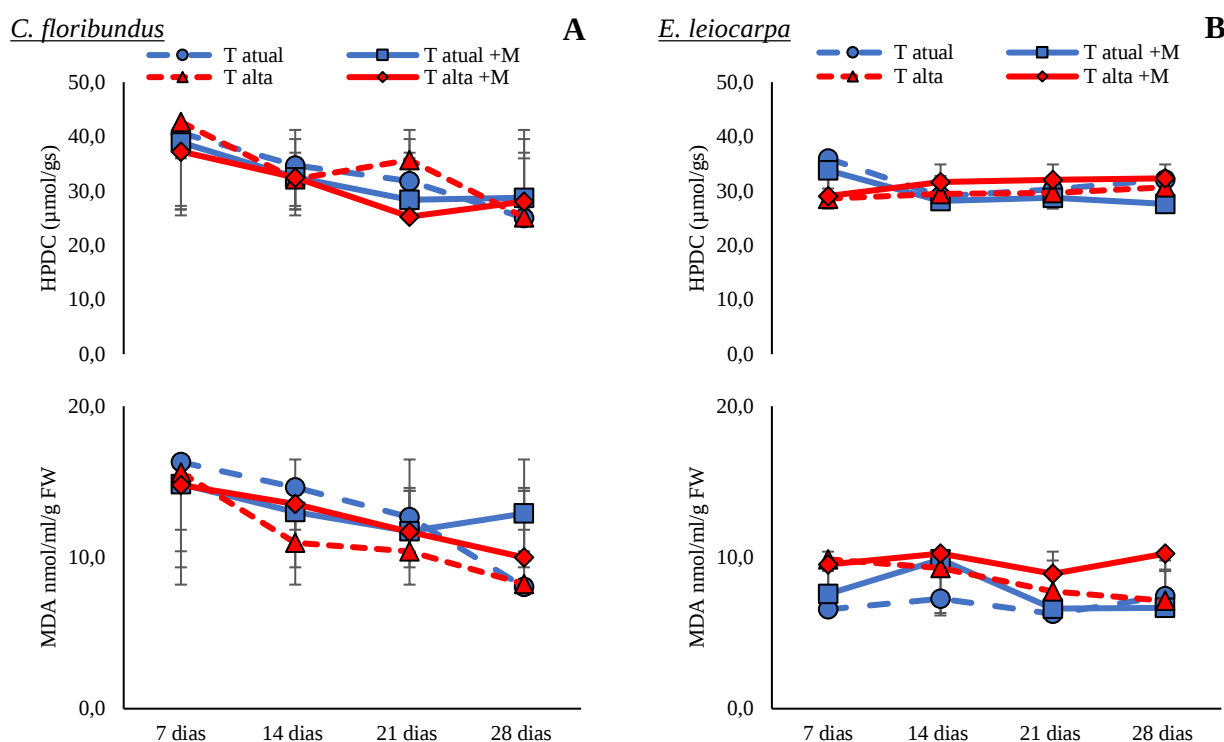


Figura 12. Concentrações dos valores médios de HPDC e MDA de folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* (A) e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (B). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 11. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de HPDC e MDA para espécie pioneira (*C. floribundus*) e para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

HPDC/MDA	<i>C. floribundus</i>		<i>E. leiocarpa</i>	
ANOVA fatorial	HPDC	MDA	HPDC	MDA
Fatores				
1 Temperatura	0,962	0,258	0,910	<0,001
2 Tratamento	0,316	0,473	0,870	0,041
3 Tempo	<0,001	0,002	0,606	0,072
Interação entre fatores				
1 x 2	0,709	0,613	0,082	0,661
1 x 3	0,896	0,975	0,036	0,764
2 x 3	0,173	0,436	0,845	0,749
1 x 2 x 3	0,867	0,599	0,891	0,170

Tabela 11.1. Valores médios das concentrações de HPDC e MDA em folhas da espécie arbórea pioneira *C. floribundus* e da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

HPDC (μmol/gs) e MDA nmol/ml/g FW								
Tempo (dias)	<i>C. floribundus</i>				<i>E. leiocarpa</i>			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
HPDC								
7	40,7a	38,9a	42,7a	37,3a	36,0a*	33,8a*	28,6	29,1
14	34,7c	32,5c	32,1c	32,4c	29,0b	28,2b	29,5	31,7
21	31,8bc	28,4bc	35,7bc	25,3bc	30,3ab	28,8ab	29,6	32,0
28	25,1b	28,8b	25,2b	28,0b	32,1ab	27,6ab	30,7	32,3
MDA								
7	16,3a	14,8a	15,6a	14,8a	6,6B	7,6A	9,9A*	9,5B*
14	14,6ab	13,0ab	11,0ab	13,5ab	7,3B	9,9A	9,3B*	10,3A*
21	12,7b	11,7b	10,4b	11,7b	6,3B	6,6A	7,8B*	8,9A*
28	8,0b	12,9b	8,2b	10,0b	7,4A*	6,7B	7,1B	10,2A*

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

4.6 Respostas de antioxidantes enzimáticos e espécies reativas de oxigênio em *E. leiocarpa*.

a) Antioxidantes enzimáticos (catalase, glutathione redutase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase) em folhas e raízes

A atividade da catalase (CAT) na *E. leiocarpa* foi influenciada pelos fatores tempo em folhas e raízes e tratamento/M nas raízes. Houve interação entre temperatura e tempo e entre tratamento/M e tempo nas raízes desta espécie (Figura 13A; Tabela 12). A atividade da enzima nas folhas foi maior aos 7 dias em todos os tratamentos em comparação aos 21 e 28 dias. Nas raízes, aos 7 dias foi verificado que houve maior atividade de CAT nos Tatual e Tatual+M em

comparação a Talta e Talta+M, respectivamente (Tabela 12.1). Nos tratamentos com excesso de Zn, Cu e Ni foram observados decréscimo de catalase aos 7 e 14 dias, se comparado com seus respectivos tratamentos sem excesso desses metais (Tabela 12.1).

A atividade da glutathione redutase (GR) nas folhas teve influência dos fatores temperatura e tempo (Tabela 12), onde aos 7 dias houve maior atividade desta enzima e aos 21 ocorre uma redução, e nas raízes esta redução foi vista aos 14 dias (Figura 13B, Tabela 12.1).

A atividade do ascorbato peroxidase (APX) teve influência do fator tempo em folhas e raízes. Em raízes houve interação entre os fatores temperatura e tempo (Tabela 12). A atividade desta enzima em folhas diminui ao longo do tempo em todos os tratamentos, nas raízes foi apontado efeito da temperatura aos 28 dias entre os tratamentos sem e com excesso de metais (Figura 13C, Tabela 12.1).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de *E. leiocarpa* apontou significativamente a influência do fator tempo, mostrando diferentes níveis de sua atividade ao longo do tempo (Tabela 12). Maior atividade da enzima em folhas foi aos 7 dias (Figura 13D, Tabela 12.1).

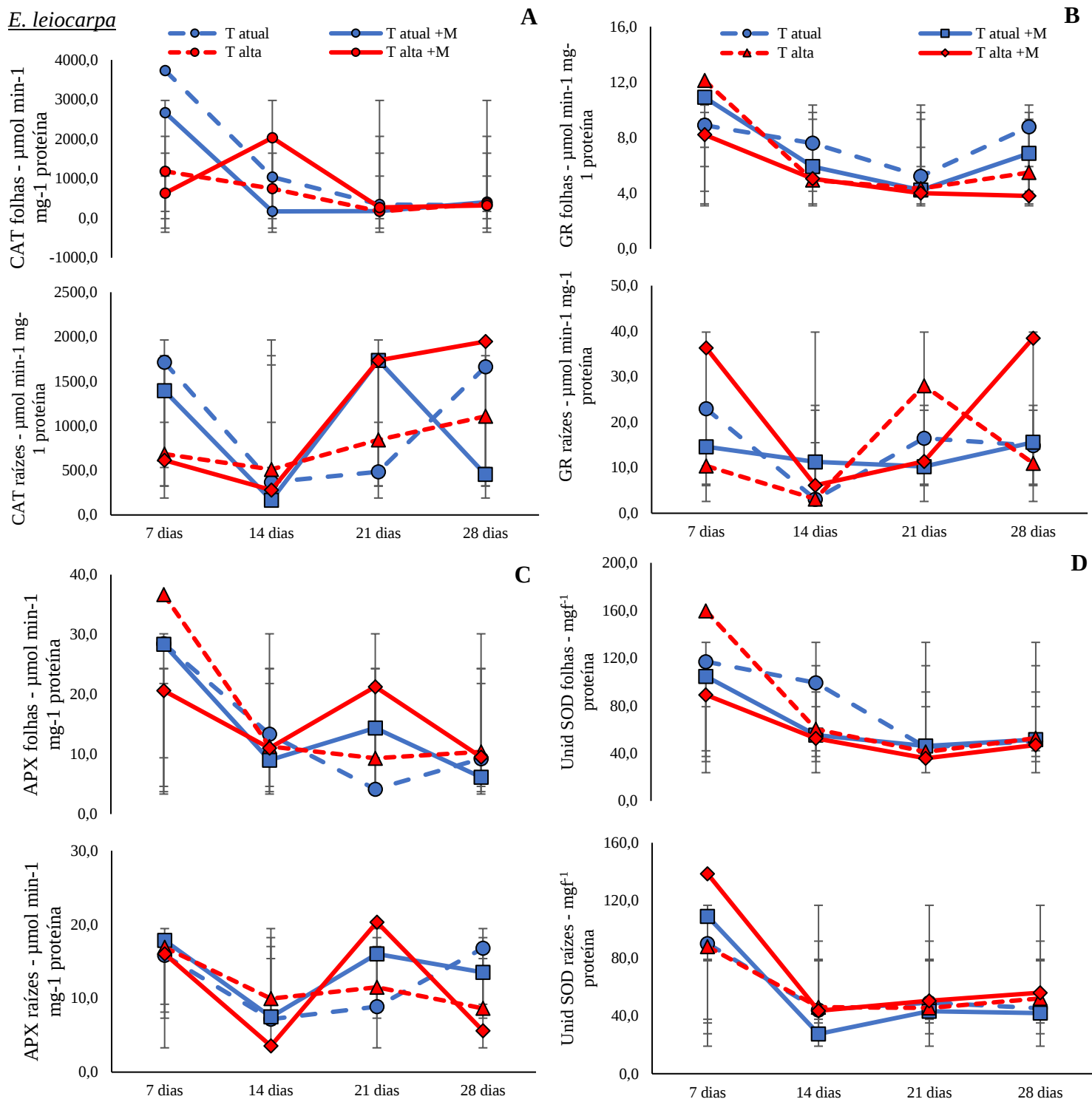
E. leiocarpa

Figura 13. Valores médios da atividade das enzimas catalase (A), glutatona redutase (B), ascorbato peroxidase (C) e superóxido dismutase (D) de folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa* (A). T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 12. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as atividades das enzimas catalase (CAT), glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

<i>E. leiocarpa</i> ANOVA fatorial	CAT		GR		APX		SOD	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Fatores								
1 Temperatura	0,594	0,668	0,049	0,535	0,164	0,071	0,399	0,921
2 Tratamento	0,672	0,042	0,823	0,244	0,484	0,246	0,428	0,526
3 Tempo	0,001	0,003	0,002	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,270
Interação entre fatores								
1 x 2	0,328	0,267	0,891	0,774	0,932	0,304	0,423	0,325
1 x 3	0,387	0,026	0,658	0,506	0,203	0,019	0,424	0,645
2 x 3	0,789	0,001	0,650	0,144	0,141	0,066	0,276	0,960
1 x 2 x 3	0,133	0,853	0,935	0,070	0,204	0,207	0,283	0,937

Tabela 12.1. Valores médios das atividades das enzimas catalase (CAT - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), glutatona redutase (GR - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína), ascorbato peroxidase (APX - $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína) e superóxido dismutase (SOD - Unid SOD mg^{-1} proteína) de folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

Tempo (dias)	Folhas				Raízes			
	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
CAT								
7	3731,9a	2667,2a	1184,2a	635,8a	1713,7Aa*	1394,1Ba*	683,4A	613,7B
14	1042,5ab	171,5ab	744,7ab	2032,8ab	368,5Ab	165,8Bb	510,9A	279,9B
21	349,7b	178,3b	171,4b	272,1b	484,6Bab	1734,3Aab	843,3B	1734,3A
28	325,8b	408,7b	369,2b	321,8b	1662,6Aa	452,7Ba	1107,3B	1946,7A
GR								
7	8,9a	10,9a*	12,1a*	8,2a	23,0a	14,6a	10,4a	36,3a
14	7,6ab*	5,9ab*	4,9ab	5,1ab	3,1b	11,3b	3,1b	6,1b
21	5,2b*	4,2b*	4,3b	4,0b	16,5a	10,3a	28,0a	11,4a
28	8,8ab*	6,9ab*	5,5ab	3,8ab	14,9a	15,6a	11,0a	38,5a
APX								
7	28,4a	28,4a	36,7a	20,6a	15,8a	17,8a*	16,9ab*	16,0ab
14	13,3b	9,0b	11,3b	11,0b	7,2c	7,5c	10,0b	3,6b
21	4,2b	14,4b	9,3b	21,3b	8,9bc	16,0bc	11,5a	20,3a
28	9,3b	6,2b	10,4b	9,5b	16,8ab*	13,5ab*	8,6ab	5,6ab
SOD								
7	117,0a	104,7a	159,7a	89,1a	90,2	109,0	88,0	138,5
14	99,2c	55,2c	60,3c	52,5c	44,2	27,6	46,1	43,6
21	45,1b	46,2b	41,1b	35,8b	49,3	43,3	45,6	50,5
28	50,2bc	51,6bc	52,7bc	47,0bc	45,2	42,0	52,2	56,2

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

b) Espécies reativas de oxigênio

O fator tempo mostrou ser significativo para o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas da *E. leiocarpa* (Tabela 12). Na Tabela 13.1 e Figura 14 foi possível identificar maiores concentrações de H_2O_2 ao final do experimento em comparação aos 14 dias em todos os tratamentos.

As concentrações do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nas folhas da *E. leiocarpa* variaram significativamente sob a influência dos fatores tratamento e tempo. Quando observada as interações dos fatores nesta espécie, a ANOVA fatorial demonstrou que há influência com os conteúdos do radical entre tratamento/M e tempo (Tabela 13), mostrando maiores concentrações aos 28 dias em todos os tratamentos (Figura 14, Tabela 13.1). O efeito de tratamento nas concentrações de $O_2^{\bullet-}$ é evidente aos 21 dias, com maiores concentrações nos tratamentos com excesso de metais (Figura 14, Tabela 13.1).

Para as concentrações do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) houve influência significativa dos fatores temperatura e tratamento, com interação também entre os fatores (Tabela 13). Entre os tratamentos de temperatura, destaca-se o T atual que apresentou maiores concentrações de $OH^{\bullet}$ aos 14, 21 e 28 dias em comparação ao T atual+M.

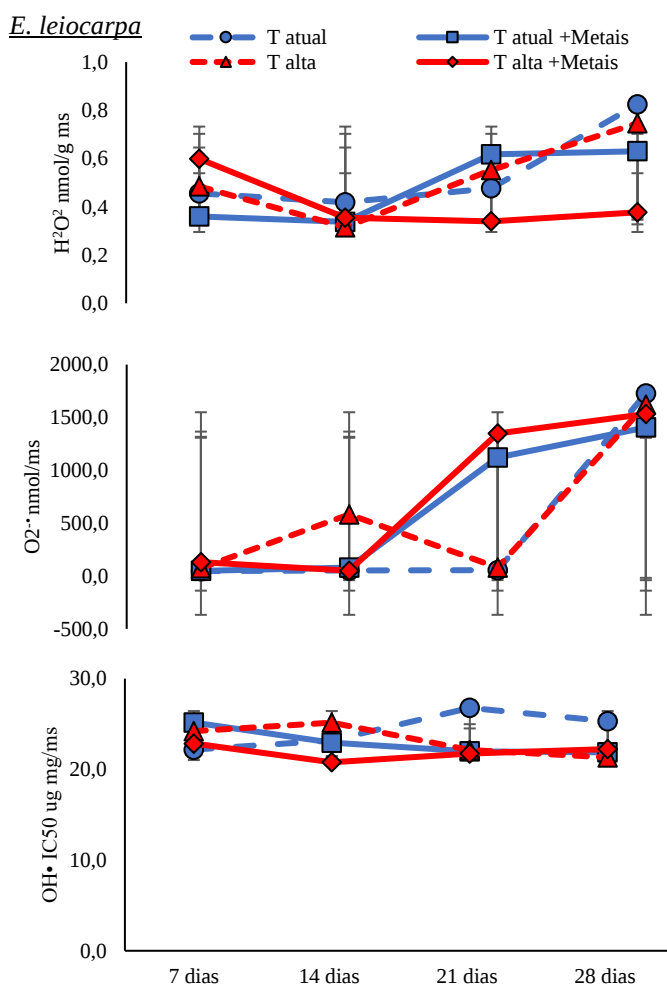


Figura 14. Valores médios da concentração de Peróxido de hidrogênio, Ânion superóxido e Radical hidroxila de folhas da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*. T atual (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite); T atual + M (termoperíodo de 26 °C dia/19 °C noite + adição de metais); T alta (termoperíodo de 32 °C dia/20 °C); T alta + M (termoperíodo de 30 °C dia/23 °C + adição de metais).

Tabela 13. Níveis de significância (p) da análise de variância com três fatores (temperatura, tratamento e tempo), bem como a interação entre eles para as concentrações de Peróxido de hidrogênio, Ânion superóxido e Radical hidroxila para espécie não pioneira (*E. leiocarpa*).

ANOVA fatorial	<i>E. leiocarpa</i>		
	Peróxido de hidrogênio	Ânion superóxido	Radical hidroxila
Fatores			
1 Temperatura	0,477	0,063	0,051
2 Tratamento	0,188	0,002	0,021
3 Tempo	0,018	<0,001	0,646
Interação entre fatores			
1 x 2	0,688	0,700	0,941
1 x 3	0,360	0,557	0,005
2 x 3	0,323	<0,001	0,179
1 x 2 x 3	0,349	0,074	0,072

Tabela 13.1. Valores médios das concentrações de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Ânion superóxido (O₂^{-•}) e Radical hidroxila (OH[•]) em folhas e raízes da espécie arbórea não pioneira *E. leiocarpa*.

H ₂ O ₂ nmol/g ms; O ₂ ^{-•} nmol/ms; OH [•] IC50 ug mg/ms				
<i>E. leiocarpa</i>				
Tempo (dias)	Tatual	Tatual+M	Talta	Talta+M
H ₂ O ₂				
7	0,46ab	0,36ab	0,48ab	0,60ab
14	0,42b	0,34b	0,32b	0,35b
21	0,48ab	0,62ab	0,55ab	0,34ab
28	0,82a	0,63a	0,75a	0,38a
O ₂ ^{-•}				
7	46,5b	48,8c	75,0b	132,6c
14	52,5b	78,4c	581,6b	50,3c
21	56,4Bb	1122,4Ab	79,9Bb	1348,3Ab
28	1726,7a	1405,1ab	1621,1a	1532,9ab
OH [•]				
7	22,2Bb	25,2Ab	24,2A	22,9B
14	23,2Aab	22,9Bab	25,2A	20,8B
21	26,8Aab*	22,0Bab*	22,1A	21,7B
28	25,3Aa*	21,9Ba	21,3B	22,2A*

Letras minúsculas indicam variações significativas em cada órgão e espécie ao longo do tempo.

Letras maiúsculas indicam o efeito do excesso de metais em cada órgão, espécie e tempo de amostragem.

*Indica o efeito de temperatura em cada tratamento de adubação, órgão, espécie e tempo.

5. DISCUSSÃO

Estudos têm evidenciado que mudanças climáticas severas podem alterar o acúmulo de nutrientes no solo (Bunce, 2015; Dietterich et al., 2015; Jin et al., 2015; Kumagai et al., 2015; Myers et al., 2014), como os que relacionam essa perturbação sob temperatura elevada (Bellaloui et al., 2016; Chaturvedi et al., 2017; Fernando et al., 2014) e também com o aumento da disponibilidade de metais (Silveira et al., 2003). Antoniadis & Alloway (2001) compararam a disponibilidade de Cd, Ni e Zn em solo de *Lolium perenne* L. em duas condições, a 15°C e a 25°C, e os extratos de solo e amostras de plantas do tratamento a 25°C tiveram maiores concentrações de Cd, Ni e Zn do que as do tratamento a 15°C. Os autores concluíram que isso pode ser atribuído à matéria orgânica, que se decompõe mais rapidamente a 25°C. Ainda, Needham e colaboradores (2020) observaram correlações altamente significativas nas concentrações de zinco em solo com a temperatura em um estudo sobre a resposta da nutrição da fruta-pão ao clima e solo da Oceania. Porém, no presente estudo houve um aumento da matéria orgânica e da disponibilidade de Cu e Zn no fim do experimento em solo de todos os tratamentos da espécie arbórea pioneira (*C. floribundus*). Por outro lado, a disponibilidade de Cu e Zn em *E. leiocarpa* diminuiu ao longo do tempo nos tratamentos com adição de metais em ambos tratamentos de temperatura e essa disponibilidade pode ter sido afetada por muitos fatores, como a quantidade de matéria orgânica, temperatura, capacidade de troca catiônica, outros metais presentes, pelo pH do solo e pela própria espécie (Gupta et al. 2018). A diferença entre *C. floribundus* e *E. leiocarpa* na disponibilidade de Zn e Cu em solo pode estar relacionada a interações específicas de cada espécie com o solo, ou seja, algumas espécies podem exercer efeitos específicos na comunidade microbiana da rizosfera e obter diferenças nas quantidades e composições de exsudatos radiculares (Zhang et al., 2013), resultando no aumento da atividade enzimática do solo via interações interespecíficas de raízes e, como consequência, o aumento de metais disponíveis no solo (Feng et al., 2021). Assim, raízes das plantas juntamente com os microrganismos do solo podem secretar grandes quantidades de ácidos, como ácido málico, ácido oxálico, ácido tartárico e ácido succínico (Das et al., 2017) e podendo aumentar a disponibilidade de metais no solo e alterar o pH do solo da rizosfera (Hinsinger et al., 2003). No entanto, neste estudo, os valores de pH de solo aumentaram, mas com valores abaixo do verificado por Zeng e colaboradores (2019) que em um estudo de remediação também observaram o aumento da disponibilidade de metais em solo e associaram a não acidificação desse solo à sua capacidade de tamponamento. Cornu e autores (2016) mostraram que a alta temperatura do solo promove a transferência da concentração de Cd e Zn do solo para a planta.

A temperatura influenciou diretamente o acúmulo dos metais nas raízes de *C. floribundus*. Em outro estudo, Zn mostrou correlações altamente significativas com temperatura. Needham e autores (2020) levantaram que se o impacto de temperatura em que o Zn está inserido aumentar o estresse ou desequilibrar as taxas de respiração fotossintética, eles podem contribuir para alterar as concentrações de Zn nas plantas. A aplicação de temperaturas altas causa uma série de mudanças morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas (Crafts-Brandner et al. 2002; Larkindale et al., 2002; Kotak et al., 2007; Hossain et al., 2013). Teores de outros metais como Cu e Ni também mostram correlações positivas relacionadas com temperatura (Nechita et al., 2021), é importante ressaltar que reações químicas são dependentes da temperatura (Adler e Klipp, 2020). Portanto, as propriedades do solo e temperatura são fatores cruciais, cujo as interações entre tais efeitos não podem ser negligenciados (Suszek-Łopatka et al., 2021).

A disponibilidade de metais em concentrações tóxicas no solo afeta diretamente o desenvolvimento e crescimento das plantas. Estudos com várias espécies arbóreas da Mata Atlântica cultivadas em solo contaminado constataram que os impactos nos parâmetros biométricos e de biomassa dependem da espécie, concentração e tempo de exposição ao excesso de metais (Siqueira et al., 2021). A massa foliar e radicular da espécie *C. floribundus* aumentou nos tratamentos apontando interação não só entre os tratamentos (sem e com excesso de metais) e tempo como também com a temperatura, e o mesmo foi visto na espécie *E. leiocarpa*. A temperatura mostrou influenciar parâmetros altura e número de folhas de *C. floribundus*, mostrando aumento nos tratamentos com temperatura elevada. Porém, o parâmetro altura em *E. leiocarpa* foi maior nos tratamentos com adição de metais, não apresentando variação em número de folhas. Siqueira e colaboradores (2021) observaram aumento inicial da massa foliar em *S. terebinthifolia* e de altura em *E. uniflora*, o que pode ser explicado pelos efeitos benéficos de baixas concentrações de Cu no crescimento e desenvolvimento das plantas (Yruela, 2009). Em contrapartida, nosso grupo de pesquisa em estudo anterior (Brandão et al., 2022) constatou uma redução no crescimento de espécies nativas da Mata Atlântica sob adição de Zn no solo, indicando que o Zn biodisponível afetou mais severamente o crescimento de árvores jovens. Hammerschmitt e colaboradores (2020) também observaram uma diminuição da produção de matéria seca das plantas quando submetidas a altos teores de Cu e Zn no solo. Assim, o aumento de biomassa foliar observado nas espécies pode ser caracterizado pela densidade foliar da não pioneira e pela biomassa por área foliar da pioneira. Fernandes (2019) estudou características morfo-anatômicas foliares funcionais e respostas estruturais de diferentes arbóreas pioneiras e não pioneiras em remanescentes Floresta Atlântica expostos a distúrbios ambientais, constatando que as espécies adultas pioneiras apresentaram condições de resiliência e de

perpetuação nos remanescentes perturbados e possuem folhas com alta biomassa por área foliar. Observaram também que espécies de árvores não pioneiras apresentaram um baixo potencial de tolerância com maior espessura do parênquima esponjoso, e concluíram que as alterações anatômicas que ocorrem nas folhas apresentam papel fundamental na adaptação da planta sob as condições atribuídas pelo ambiente.

As plantas geralmente são sensíveis ao excesso de metais pesados podendo induzir diferentes sintomas em níveis fisiológicos, como danificar as enzimas antioxidantes e os sistemas de membrana, mas também podem ativar seus mecanismos de defesa (Figura 14; Feng et al., 2021). Assim, os níveis de GSH em folhas e raízes de *C. floribundus* e *E. leiocarpa* diminuíram ao longo do tempo e variaram sob os efeitos de temperatura, apontando menores concentrações nos tratamentos de temperatura alta em folhas de *C. floribundus* e em folhas e raízes de *E. leiocarpa*. Foi verificado interação entre os 3 fatores na razão GSH:GSSG em raízes de *C. floribundus*, enquanto essa razão para as raízes foi maior no tratamento com temperatura alta em *E. leiocarpa*, com interação entre temperatura e tratamento/M. Efeito temperatura nas concentrações de glutathione reduzida (GSH) das espécies de plantas utilizadas neste estudo indicaram que mudanças na temperatura devido às mudanças climáticas podem alterar a capacidade de defesa dessas plantas e causar o desequilíbrio bioquímico entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes. A longo prazo, esse efeito pode ser intensificado com níveis de tóxicos de metais. Lwalaba e colaboradores (2020) verificaram a redução nos níveis de glutathione e da razão GSH:GSSG em raízes de cevada submetida ao excesso de metais, porém houve aumento do conteúdo de fitoquelatinas (PC). Em situação de estresse aos metais, a produção de fitoquelatinas é a primeira estratégia utilizada pelas plantas para quelar e transportar metais para os vacúolos (Emamverdian et al., 2015). Uma vez que as fitoquelatinas (PC) usam GSH como precursor para sua síntese, pode-se sugerir que a redução no teor de GSH nas espécies *C. floribundus* e *E. leiocarpa* sob os tratamentos foi devido à polimerização de GSH para formar PC. No entanto, GSSG permaneceu menor nas raízes de *C. floribundus*, apoiando a hipótese de que os níveis de GSH podem ser restaurados sob alta toxicidade causada por metais, reciclando GSSG de volta para GSH por meio da glutathione redutase (Jozefczak et al., 2014) (Figura 14). A hipótese é apoiada pela maior razão GSH:GSSG nas raízes das espécies. Além da remoção de espécies reativas de oxigênio, o conteúdo de GSH também atua como substrato para as fitoquelatinas e está intimamente relacionado com a tolerância de metais pesados em plantas (Grill et al., 1989; Xiang et al., 2001).

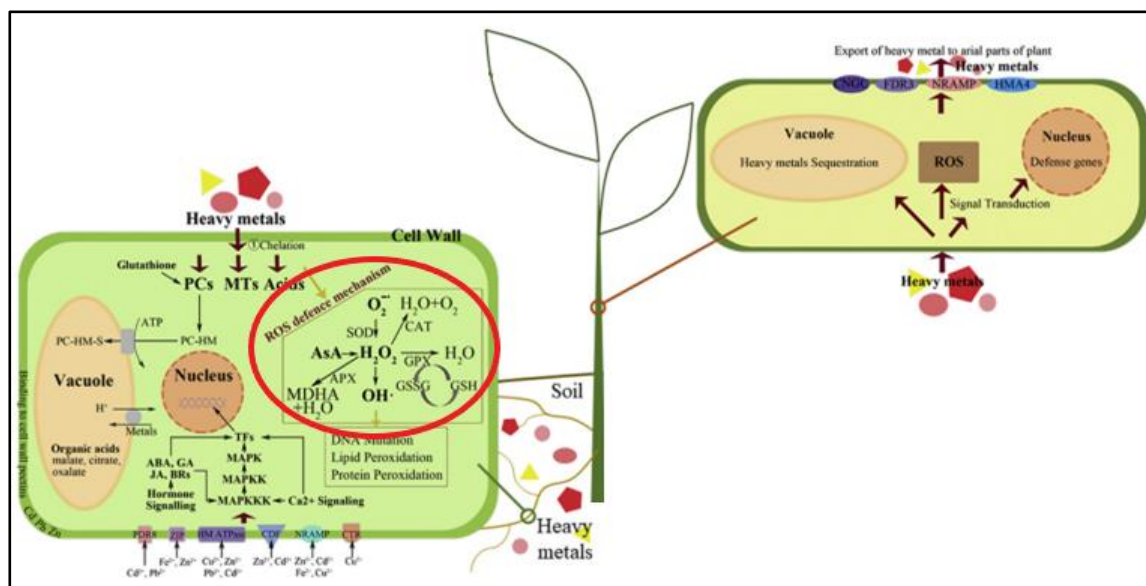


Figura 15. Ciclo ascorbato-glutationa e efeito do estresse oxidativo por metais em raízes, caule e folhas. Imagem com modificações (Feng et al., 2021).

Espécies vegetais acondicionadas em locais com altos teores de metais comumente têm redução de Chl *a*, Chl *b* e carotenóides (Cambrollé et al., 2013; Cambrollé et al., 2015; Tiecher et al., 2016). Neste estudo, os níveis de Chl *a* e carotenóides em *C. floribundus* não variaram conforme a influência dos fatores abordados. Os níveis de Chl *b*, no entanto, foram maiores nos tratamentos com temperatura alta. Na espécie *E. leiocarpa*, os teores pigmentares reduziram ao longo do experimento, indicando que esta redução pode ter sido ocasionada pela influência dos metais. É válido destacar que o efeito de Zn na transferência de elétrons na fotossíntese causa redução na síntese de clorofila ou também o aumento de sua degradação (Cambrollé et al., 2013). Além disso, o excesso de Cu pode causar degradação da estrutura e do conteúdo interno do cloroplasto (Tiecher et al. 2017). A substituição do íon Mg pelo Cu na clorofila também pode ocorrer, prejudicando a síntese de clorofila (Küpper et al., 2002). Ni pode destruir o cloroplasto e reduzir a clorofila *a* e *b*, o que leva à diminuição da fotossíntese e da taxa de transpiração (Turan, 2019). As plantas em solo poluído com Ni sofrem de clorose devido a competição desse metal com Ca e Mg na absorção pela planta e a baixa absorção de Mg afeta a produção de cloroplastos, reduzindo a fotossíntese e, finalmente, afetando o crescimento e a produtividade geral da cultura (Shahbaz et al., 2019). Corroborando com os dados obtidos na *E. leiocarpa*, um estudo de fitoestabilização de metais pesados no solo determinou que a contaminação com Ni proporcionou redução significativa em todos os parâmetros abordados (carotenoide, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total) e essa redução pode ser fomentada pela influência de temperatura (Zeeshan et al., 2020). Yan e colaboradores (2021) observaram que

o estresse causado por alta temperatura não só leva a redução do teor de pigmentos, mas também inibe a fotossíntese da alface. Tal fato foi justificado pela diminuição do conteúdo da clorofila, que está associado com danos nos cloroplastos do mesofilo. As observações ultraestruturais levantadas pelos autores também indicam que alta temperatura danifica a estrutura dos cloroplastos das plantas e altera a atividade fotossintética.

Produtos da peroxidação lipídica (MDA e HPDC) são considerados marcadores de danos oxidativos nas membranas celulares, sinalizando o desempenho fisiológico de plantas que crescem sob estresses ambientais (Lima & Abdalla, 2001; Che et al. 2020). O conteúdo de HPDC em *C. floribundus* reduziu ao longo do tempo. O HPDC em *E. leiocarpa* tendeu a diminuir ao longo do tempo e mostrou influência também sob a temperatura, apresentando maiores concentrações em temperatura alta. Há a indicação de que a menor peroxidação lipídica em nível celular está associada aos baixos níveis de HPDC (Pignata et al., 2002) e está entre as características associadas de maior tolerância das árvores pioneiras ao estresse oxidativo em comparação as não pioneiras (Brandão et al., 2017). A concentração de MDA em *C. floribundus* reduziu ao decorrer do tempo, por outro lado, *E. leiocarpa* apresentou a tendência de aumentar suas concentrações nos tratamentos com adições de metais e nos tratamentos com elevação de temperatura. Isso pode indicar uma maior tolerância da espécie pioneira ao estresse oxidativo causado pelos fatores de temperatura ambiente e metais no solo. Cui e autores (2022) observaram maior teor de MDA nas folhas de *S. chinensis* e *P. orientalis* coletadas em locais urbanos e suburbanos do que em áreas rurais. Esses resultados indicaram que o equilíbrio foi interrompido e as EROs foram produzidas em excesso, o que é consistente com outros estudos que demonstraram que o conteúdo de MDA foi maior em plantas submetidas aos metais pesados (Wang et al., 2015; Li et al., 2013). Diante dos resultados do presente estudo *E. leiocarpa* possui maior sensibilidade ao estresse ocasionado pela elevação de temperatura e adição dos metais em comparação ao *C. floribundus*. Desta forma, a continuação do ciclo de defesa antioxidante, como as atividades enzimáticas e os conteúdos das EROs serão discutidos na sequência apenas para a espécie não pioneira.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), na qual o acúmulo é prejudicial às plantas, pode ser induzida pela presença de metais em excesso. Assim, as enzimas antioxidantes são cruciais, sendo responsáveis pela eliminação de EROs (Gomes et al., 2013), como ilustrado na Figura 14. Os antioxidantes enzimáticos em *E. leiocarpa* diminuíram significativamente, especialmente sob influência dos fatores de temperatura e tempo. As enzimas CAT, GR, APX e SOD nas folhas regrediram dos 7 para os 28 dias em todos tratamentos. Nas raízes, a atividade enzimática da catalase foi maior nos tratamentos com adição de metais; GR diminuiu a

atividade aos 14 dias e a adição dos metais influenciou mais atividade da APX do que a elevação de temperatura. Resultados contrários foram vistos por Gomes e colaboradores (2018) ao abordarem os efeitos de temperatura e Zn em duas espécies de plantas nativas brasileiras, onde as plantas tratadas com excesso de Zn apresentaram maiores atividades de APX e CAT em folhas sob temperaturas mais elevadas (30°C e 35°C). Porém, Zhou e colaboradores (2021) relataram resultados similares ao presente estudo ao estudarem as diferenças ecofisiológicas entre mudas de mangue sob estresse por metais. Eles constataram que os teores de MDA aumentaram com o aumento das concentrações de metais, enquanto houve a redução nas atividades enzimáticas antioxidantes (SOD, CAT e APX). Enzimas como APX e CAT são responsáveis pela eliminação de H_2O_2 e são bastante responsivas aos estressores ambientais (Foyer e Noctor, 2011; Gomes et al., 2017). É amplamente reconhecido que os danos causados por metais pesados nas células vegetais são causados devido ao excesso de EROs produzidas na célula vegetal, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$, um radical livre), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$, um radical livre) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , não radical) (Devi e Prasad, 1998) (Zhou et al., 2021). Os conteúdos de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e $OH^{\cdot}$ em *E. leiocarpa* aumentaram suas concentrações expressivamente ao longo do estudo, sobretudo, pela influência dos fatores de temperatura e adição de metais. No estudo já citado (Cui et al., 2022), foi verificado o aumento nos níveis de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ nas espécies de plantas de locais urbanos e suburbanos, sendo observado a correlação positiva entre as concentrações de metais pesados e as EROs H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, corroborando com o aumento observado neste estudo com *E. leiocarpa*. Ainda, o aumento da temperatura levou ao aumento das concentrações de H_2O_2 em *A. polycephala* tratadas com excesso de Zn (Gomes et al., 2018). Inúmeros estudos têm mostrado que o acúmulo de metais induz estresse oxidativo estimulando a produção de EROs (Lin et al., 2012). Dentro desta abordagem, a ativação dos mecanismos de desintoxicação é de suma importância para equilibrar os efeitos tóxicos do estresse oxidativo causado por metais (Wang et al., 2009) ou por elevação de temperatura. A enzima SOD é fundamental na tolerância ao estresse de plantas, fornecendo a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de EROs, uma vez que a enzima catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 (Gill et al., 2010). Além disso, *L. sativa* submetida ao estresse de Zn apresentou acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ devido a diminuição da atividade de SOD, enquanto para *B. oleracea* submetida ao mesmo tratamento não apresentou aumento de $O_2^{\cdot-}$ e a atividade de SOD se intensificou, mas o seu teor de H_2O_2 não aumentou, como esperado, sugerindo a existência do mecanismo de detoxificação desta ERO em *B. oleracea* (Barrameda et al., 2014). Assim, sugerimos que *E.*

leiocarpa não possui um mecanismo eficiente de detoxificação das EROs quando submetidas à elevação da temperatura, simulando as mudanças climáticas, e ao excesso de metais.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a disponibilidade de Zn e Cu em solo pode estar relacionada a interações específicas de cada espécie com o solo. O efeito de temperatura influencia no acúmulo de metais nas raízes de *C. floribundus*, atenuando seus efeitos nocivos. Ainda, a temperatura influencia também os parâmetros altura e número de folhas de *C. floribundus*, mostrando aumento nos tratamentos com temperatura elevada. O parâmetro altura em *E. leiocarpa* foi maior nos tratamentos com adição de metais, não apresentando variação em número de folhas. Assim, sugerimos que o aumento de biomassa foliar observado em ambas as espécies pode ser caracterizado pela densidade foliar da espécie não pioneira e pela biomassa por área foliar da espécie pioneira.

Corroborando com a hipótese levantada, a espécie pioneira, *C. floribundus*, possui maior tolerância ao estresse oxidativo causado pelos fatores de temperatura e metais no solo (MDA e HPCD) e a não pioneira, *E. leiocarpa*, não detém de mecanismo eficiente para detoxificação das EROs quando submetidas à elevação da temperatura, simulando as mudanças climáticas, e ao excesso de metais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamiec, E.** 2017. Chemical fractionation and mobility of traffic-related elements in road environments. *Environ. Geochem. Health* 39, 1457–1468.
- Adler, S.O., Klipp, E.** 2020. Chemical reaction networks possess intrinsic, temperature dependent functionality. *Entropy* 22 (1), 117.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M.** 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22, 8148–8162.
- Ai F, Eisenhauer N, Xie Y, Zhu J, Jousset A, Du W, Yin Y, Zhang X, Ji R, Guo H.** 2018. Elevated CO₂ accelerates polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in a paddy soil grown with rice. *PLoS One* 13: e0196439.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E.** 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337–1344.
- Antoniadis, V.; Alloway, B.J.** 2001. Availability of Cd, Ni and Zn to ryegrass in sewage sludge-treated soils at different temperatures. *Water, Air and Soil Pollution*, v.132, p.201-214.
- Apeagyei, E., Bank, M. S., & Spengler, J. D.** 2011. Distribution of heavy metals in road dust along an urban-rural gradient in Massachusetts. *Atmospheric Environment*, 45(13), 2310–2323.
- Ashraf, S., Ali, Q., Zahir, Z. A., Ashraf, S., & Asghar, H. N.** 2019. Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 714–727.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ.** 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* 104: 280-92.

Babar Shahzad, Mohsin Tanveer, Abdul Rehman, Sardar Alam Cheema, Shah Fahad, Shamsur Rehman, Anket Sharma. 2018. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 132, 2018, Pages 641-651, ISSN 0981-9428.

Baran, E. J. 2018. Nickel and its role in plant physiology. *Molecular Physiology of Abiotic Stresses in Plant Productivity*, 291.

Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., & Ruiz, J. M. 2014. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Science*, 227, 110–121.

Barros, F., Mamede, M.C.H., Melo, M.M.F., Lopes, E.A., Jung-Mendaçolli, S.L., Kirizawa, M., Muniz, C.F.S., Watanabe, H.M., Chiea, S.A.C. & Melhem, T.S. 2002. A Flora Fanerogâmica do PEFI: composição, afinidades e conservação. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo*. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, pp. 93-110.

Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J. Environ. Manag.* 105, 103–120.

Bellaloui N, Hu Y, Mengistu A, Abbas HK, Kassem MA, Tigabu M. 2016. Elevated atmospheric carbon dioxide and temperature affect seed composition, mineral nutrition, and ¹⁵N and ¹³C dynamics in soybean genotypes under controlled environments. *Atlas J Plant Biol*: 56-65

Bicalho, E. M., Gomes, M. P., Rodrigues-Junior, A. G., Oliveira, T. G., Gonçalves, C. d., Fonseca, M. B. and Garcia, Q. S. 2017. Integrative effects of zinc and temperature on germination in *Dimorphandra wilsonii* rizz.: Implications of climate changes. *Environ Toxicol Chem*, 36: 2036- 2042.

Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP/ - Seção Técnica de Serviços Meteorológicos – Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da

Universidade de São Paulo –2017 – São Paulo: IAG/USP, 2017 v 20.

Bonan, G.B. 2008. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* 320: 1444-1449.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 71: 248 – 254.

Brandão, S. E. 2016. Potencial redox de árvores nativas do domínio da Mata Atlântica, em São Paulo, expostas a perturbações ambientais. Domingos, M. Dissertação de Mestrado - Instituto de Botânica, SP.: 87.

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.

Brandão, S.E., Barbosa, G.M., Siqueira, M.C. 2022. Nickel and zinc absorption and growth of Atlantic Forest trees cultivated in polluted soil. *Plant Soil* 471, 463–475.

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner's mineral nutrition of higher plants. Elsevier Ltd, London pp, pp 191–248.

Buege, J. A., & Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations*, 302–310.

Burkey KO, Neufeld HS, Souza L, Chappelka AH & Davison AW. 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution*, 143:427-434.

Bunce JA. 2015. Elevated Carbon Dioxide Effects on Reproductive Phenology and Seed Yield among Soybean Cultivars. *Crop Sci* 55:339–343.

Calvo, A.I., Alves, C., Castro, A., Pont, V., Vicente, A.M., Fraile, R. 2013. Research on aerosol sources and chemical composition: Past, current and emerging issues. *Atmos. Res.* 120-121, 1–28.

Cambrollé, J., García, J.L., Ocete, R., Figueroa, M.E., Cantos, M. 2013. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere* 93, 294–301.

Cambrollé, J., García, J.L., Figueroa, M.E., Cantos, M. 2015. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* 120, 171–178.

Caravaca, F., Alguacil, M.M., Torres, P., Roldan, A. 2005. Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 124 (3e4), 375e382.

CETESB (São Paulo), 2016. Valores Orientadores Para Solo E Água Subterrânea no Estado de São Paulo 2016. Tabela publicada no Anexo Único da DD 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial Estado de São Paulo - Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I), edição nº126 (219) do dia 24/11/2016 Páginas: 55 e 56.

Che, Y., Zhang, N., Zhu, X., Li, S., Wang, S., & Si, H. 2020. Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Scientia Horticulturae*, 261, 108949.

Chen Z, Wang B, Wang J, Pan G, Xiong Z. 2016. Contrasting effects of elevated CO₂ and warming on temperature sensitivity of soil organic matter decomposition in a Chinese paddy field. *Environ Monit Assess* 188:545.

Chaoui, A., Habib Ghorbal, M., El Ferjani, E., 1997. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 126, 21–28.

Chaturvedi AK, Bahuguna RN, Pal M, Shah D, Maurya S, Jagadish KS. 2017. Elevated CO₂ and heat stress interactions affect grain yield, quality and mineral nutrient composition in rice under field conditions. *Field Crop Res* 206:149– 157.

Cornu, J.Y., Denaix, L., Lacoste, J., Sappin-Didier, V., Nguyen, C., Schneider, A. 2016. Impact of temperature on the dynamics of organic matter and on the soil-to-plant transfer of Cd, Zn and Pb in a contaminated agricultural soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 2997–3007.

Costa, G.B., Simioni, C., Pereira, D.P., Ramlov, F., Maraschin, M., Chow, F., Horta, P., Bouzon, Z.L., Schmidt, E.C. 2017. The brown seaweed *Sargassum cymosum*: changes in metabolism and cellular organization after long-term exposure to cadmium. *Protoplasma* 254: 817–837.

Crafts-Brandner, S.J. Sensitivity of Photosynthesis in a C4 Plant, Maize, to Heat Stress. 2002. *Plant Physiol.*, 129, 1773–1780.

Cui, N., Qu, L., & Wu, G. 2022. Heavy metal accumulation characteristics and physiological response of *Sabina chinensis* and *Platycladus orientalis* to atmospheric pollution. *Journal of Environmental Sciences*, 112, 192–201.

Cuypers, Ann & Vangronsveld, Jaco & Clijsters, Herman. 2001. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39. 657-664. 10.1016/S0981-9428(01)01276-1.

Das, S., Chou, M., Jean, J., Yang, H., Kim, P.J. 2017. Arsenic-enrichment enhanced root exudates and altered rhizosphere microbial communities and activities in hyperaccumulator *Pteris vittata*. *J. Hazard Mater.*, 325, 279-287.

De Nicola, F., Maisto, G., Prati, M. V., Alfani, a., 2008. Leaf accumulation of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Quercus ilex* L. *Environ. Pollut.* 153, 376–383.

Devi, S.R., Prasad, M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (coontail), a free-floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138, 157–165.

Das, C.R., Bhaumik, R., Mondal, N.K. 2012. *J. Stress Physiol. Biochem.* 8 (3): 37–45.

Derakhshan Nejad, Z., Jung, M.C., Kim, K.H. 2018. Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology. *Environ. Geochem. Health* 40, 927–953.

Dietterich LH, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey ADB, Bloom AJ, Carlisle E, Fernando N, Fitzgerald G, Hasegawa T, Holbrook NM, Nelson RL, Norton R, Ottman MJ, Raboy V, Sakai H, Sartor KA, Schwartz J, Seneweera S, Usui Y, Yoshinaga S, Myers SS. 2015. Impacts of elevated atmospheric CO₂ on nutrient content of important food crops. *Scientific Data* 2:150036.

Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G & Forti MC. 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: DC Bicudo, Forti MC & CEM Bicudo (eds.). *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo*. Imprensa Oficial, São Paulo, pp. 221-250.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.*

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.

Fanzo J, Davis C, McLaren R, Choufani J. 2018. The effect of climate change across food systems: Implications for nutrition outcomes. *Glob Food Secur* 18:12–19.

Feng, J., Jia, W., Lv, S., Bao, X., Miao, F., Zhang, X., Wang, J., Li, J., Li, D., Zhu, C., Li, S., Li, Y. 2018. Comparative transcriptome combined with morphophysiological analyses revealed key factors for differential cadmium accumulation in two contrasting sweet sorghum genotypes. *Plant Biotechnol. J.* 16: 558–571.

Feng, Z., Ji, S., Ping, J., & Cui, D. 2021. Recent advances in metabolomics for studying heavy metal stress in plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116402.

Fernandes, A.J., Reis, L.A.M. & Carvalho, A. Caracterização do meio físico. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (org.). 2002. Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, pp. 49-62.

Fernandes, Francine Faia. 2019. Características morfo-anatômicas foliares funcionais e respostas estruturais de diferentes grupos funcionais da Floresta Atlântica a distúrbios ambientais / Francine Faia Fernandes - São Paulo, 2019. 110p.; il. F363c.

Fernando N, Panozzo J, Tausz M, Norton RM, Fitzgerald GJ, Myers S, Nicolas ME, Seneweera S. 2014. Intra-specific variation of wheat grain quality in response to elevated [CO₂] at two sowing times under rain-fed and irrigation treatments. *J Cereal Sci* 59:137–144.

Ferreira, M.L., Ribeiro, A.P., Albuquerque, C.R., Ferreira, A.P.N.L., Figueira, R.C.L., Laforteza, R. 2017. Air contaminants and litter fall decomposition in urban forest areas: The case of São Paulo - SP, Brazil. *Environmental Research* 155: 314–320.

Feng, Z., Ji, S., Ping, J., Cui, D. 2021. Recent advances in metabolomics for studying heavy metal stress in plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116402.

Fitz., Walter J; Wenzel., Walter W. 2002. Arsenic transformations in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation, *Journal of Biotechnology*, Volume 99, Issue 3. Pages 259-278.

Foyer, C.H., Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18.

Flora do Brasil. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>, Accessed date: May 2018.

Funari, F.L., Filho, A.J. 2014. Energy Balance in a Patch of the Atlantic Forest in São Paulo City, Brazil. 2014. *Journal of Water Resource and Protection*, 6: 805-812.

Gill, N. Tuteja, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem.* 48 909–930.

Golia, E.E., Dimirkou, A., Mitsios, I.K. 2007. Accumulation of Metals on Tobacco Leaves (Primings) Grown in an Agricultural Area in Relation to Soil. *Bull Environ. Contam Toxicol.* 79: 158–162.

Gomes, M.P., Duarte, D.M., Carneiro, M.M.L.C., Barreto, L.C., Carvalho, M., Soares, A.M., Guilherme, L.R.G., Garcia, Q.S. 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 1–6.

Gomes, M.P., Juneau, P. 2016. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environ. Pollut.* 218, 402–409.

Gomes, M.P., Juneau, P. 2017. Temperature and light modulation of herbicide toxicity on algal and cyanobacterial physiology. *Front. Environ. Sci.* 5, 50.

Gomes, M.P., Britoc, J.C.M., Silva, J.G., Cruz, F.V.S., Bicalho, E.M., Herken, D.M.D., Garcia, Q.S. 2018. Temperature effects on Zn-responses and Zn-reclamation capacity of two native Brazilian plant species: Implications of climate change. *Environmental and Experimental Botany* 155, 589 – 599.

Grantz, D.A., Garner, J.H.B., Johnson, D.W. 2003. *Environ.Int.*29: 213–239.

Gray SB, Brady SM. 2016. Plant developmental responses to climate change. *Dev Biol* 419:64–77.

Grill E, Löffler S, Winnacker E L, Zenk M H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6838–6842.

Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R. P., & Kumar, A. 2018. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of The Total Environment*.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I. 1987. The Deoxyribose Method: A Simple “Test-Tube” Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry* 165:2 15-2 19.

Hammerschmitt, R. K., Tiecher, T. L., Facco, D. B., Silva, L. O. S., Schwalbert, R., Drescher, G. L., Brunetto, G. 2020. Copper and zinc distribution and toxicity in “Jade” / “Genovesa” young peach tree. *Scientia Horticulturae*, 259, 108763.

Hannan, F., Huang, Q., Farooq, M.A., Ayyaz, A., Ma, J., Zhang, N., Ali, B., Deyett, E., Zhou, W., Islam, F. 2021. Organic and inorganic amendments for the remediation of nickel contaminated soil and its improvement on *Brassica napus* growth and oxidative defense. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125921.

Heath, R.L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochemistry Biophys* 125: 189-198.

Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B.T. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil*, 248 (1–2), 43-59.

Hossain, M.B., Jahiruddin, M., Panaullah, G.M., Loeppert, R.H., Islam, M.R., Duxbury, J. M. 2008. Spatial variability of arsenic concentration in soils and plants, and its relationship with iron, manganese and phosphorus. *Environ. Pollut.* 156, 739–744.

Hossain, A.; Sarker, M.; Saifuzzaman, M.; Teixeira da Silva, J.A.; Lozovskaya, M.V.; Akhter, M.M. 2013. Evaluation of growth, yield, relative performance and heat susceptibility of eight wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes grown under heat stress. *Int. J. Plant Prod.* 7, 615–636.

IPCC. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Summary for Policymakers. WG1, AR4. (<http://ipcc-wg1.ucar.edu/wg1/wg1-report.html>).

IPCC. 2014. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part B: Regional aspects. In: Barros, V.R., Field, C.B., Dokken, D.J., Mastrandrea, M.D., Mach, K.J., Bilir, T.E.,

Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B.E.S., Kissel, Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (Eds.), Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge/New York, NY.

IPCC. 2018: Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.

Israr M, Sahi S, Datta R & Sarkar D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sebania drummondii*. *Chemosphere* 65: 591-598.

Janoš, P., Vávrová, J., Herzogová, L., Pilařová, V. 2010. Effects of inorganic and organic amendments on the mobility (leachability) of heavy metals in contaminated soil: A sequential extraction study. *Geoderma* 159: 335–341.

Jimenez, M.D., de Torre, R., Mola, I., Casado, M.A., Balaguer, 2018. Local plant responses to global problems: *dactylis glomerata* responses to different traffic pollutants on roadsides. *J. Environ. Manag.* 212, 440–449.

Jin J, Tang C, Sale P. 2015. The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: a review. *Ann Bot-London* 116:987–999.

Jozefczak, M., Keunen, E., Schat, H., Blik, M., Hernández, L.E., Carleer, R., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. 2014. Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. *Plant Physiol. Biochem.* 83, 1–9.

Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C., Prášil, O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J. Phycol.* 38, 429–441.

Kalaiarasan, G., Balakrishnan, R.M., Sethunath, N.A., Manoharan, S. 2018. Source apportionment studies on particulate matter (PM₁₀ and PM_{2.5}) in ambient air of urban Mangalore, India. *Journal of Environmental Management*, 217: 815-824.

Klimek, B., Tarasek, A., Hajduk, J. 2015. Trace element concentrations in lichens collected in the Beskid mountains, the outer Western Carpathians, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94: 532–536.

Kotak, S.; Larkindale, J.; Lee, U.; von Koskull-Döring, P.; Vierling, E.; Scharf, K.-D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 310–316.

Kraus TE, Evans RC, Fletcher RA, Paul SKP. 1995. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Canadian J Bot* 73:797-806.

Kumagai E, Aoki N, Masuya Y, Shimono H. 2015. Phenotypic Plasticity Conditions the Response of Soybean Seed Yield to Elevated Atmospheric CO₂ Concentration. *Plant Physiol* 169:2021–2029.

Larkindale, J.; Knight, M.R. 2002. Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in *Arabidopsis* Involves Calcium, Abscissic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiol.* 128, 682–695.

Laurance, W.F., Pérez-Salicrup, D., Delamonica, P., Fearnside, P.M., D'Angelo, S., Jerozolinski, A., Pohl, L., Lovejoy T.E. 2001. *Ecology* 82(1): 105-116.

Laurance, W.F., Lovejoy, T.E., Vasconcelos, H.L., Bruna, E.M., Didham, R.K., Stouffer, P.C. 2002. Ecosystem decay of Amazonian Forest fragments: a 22-year investigation. *Conservation Biology*, 16: 605–618.

Laurance WF, Camargo JLC, Fearnside PM, Lovejoy TE, Williamson GB, Mesquita RCG, Meyer CFJ, Bobrowiec PED, Laurance SGW. 2016. An Amazonian Forest and Its Fragments as a Laboratory of Global Change. In: Nagy L, Forsberg B, Artaxo P (eds)

Interactions between Biosphere, Atmosphere and Human Land Use in the Amazon Basin, Ecological. Springer, Berlin, pp 407–440.

Levin, A.G. & Pignata, M.L. 1995. *Ramalina ecklonii* as bioindicator of atmospheric pollution in Argentina. Canadian Journal of Botany 73:1196–1202.

Lewis, S.L., Edwards, D.P. & Galbraith, D. 2015. Increasing human dominance of tropical forests. Science, 349: 827– 832.

Li, Y., Zhang, S., Jiang, W., Liu, D.H. 2013. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. Environ. Sci. Pollut. Res. 20 (2), 1117–1123.

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Braz. J. Pharm. Sci. 37, 293–303.

Lin, M. Y. F Aarts, 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants, Cell. Mol. Life Sci. 69 3187–3206.

Lobo CB, Tomás MSJ, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME. 2018. Development of low-cost formulations of plant growth promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. Microbiol Res 219:12–25.

López A, Montañó 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. Tech. Int. 11(3):199-204.

Lwalaba, J. L. W., Louis, L. T., Zvobgo, G., Richmond, M. E. A., Fu, L., Naz, S., Zhang, G. 2020. Physiological and molecular mechanisms of cobalt and copper interaction in causing phyto-toxicity to two barley genotypes differing in Co tolerance. Ecotoxicology and Environmental Safety, 187, 109866.

M.P. Gomes, F.V.S. Cruz, F. V Borges, M.B. Fonseca, Q.S. Garcia. 2016. Modulation of *Dimorphanthera wilsonii* Rizz. seed germination through H₂O₂ production in response to Zn interference of the mitochondrial electron transport chain, *Environ. Exp. Bot.* 128 51–58.

Magnago, L.F.S., Edwards, D.P., Edwards, F.A., Magrach, A., Martins, S.V. & Laurance, W.F. 2014. Functional attributes change but functional richness is unchanged after fragmentation of Brazilian Atlantic forests. *Journal of Ecology*, 102: 475–485.

Magnago, L. F. S., Rocha, M. F., Meyer, L., Martins, S. V., & Meira-Neto, J. A. A. 2015. Microclimatic conditions at forest edges have significant impacts on vegetation structure in large Atlantic Forest fragments. *Biodiversity and Conservation*, 24(9), 2305–2318.

Magnago, L. F. S., Magrach, A., Barlow, J., Schaefer, C. E. G. R., Laurance, W. F., Martins, S. V., & Edwards, D. P. 2016. Do fragment size and edge effects predict carbon stocks in trees and lianas in tropical forests? *Functional Ecology*, 31(2), 542–552.

Martínez-Sánchez, M.J., García-Lorenzo, M.L. Pérez-Sirvent, C., Bech, J. 2012. *Journal of Geochemical Exploration* 113: 23-35.

Meira Neto, J. A., Souza, A.L., Lana, J.M., Valente, G.M. 2005. *Revista Árvore* 29(1): 139-150.

Metzger, J.P., Ribeiro, M.C., Ciocheti, G., Tambosi, L.R. 2008. Uso de índices de paisagem para a definição de ações de conservação e restauração da biodiversidade do Estado de São Paulo. In: Rodrigues, R.R., Joly, C.A., Brito, M.C.W., Paese, A., Metzger, J.P., Casatti, L., Nalon, M.A., Menezes, N., Ivanauskas, N.M., Bolzani, V., Bononi, V.L.R. (Eds.), *Diretrizes para Conservação e Restauração da Biodiversidade no Estado de São Paulo*. Secretaria do Meio Ambiente e Fapesp, São Paulo, pp. 120–127.

Metzger, J.P., Martensen, A.C., Dixo, M., Bernacci, L.C., Ribeiro, M.C., Teixeira, A.M.G., Pardini, R. 2009. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic Forest region. *Biological Conservation* 142: 1166 – 1177.

Miranda, R.M., Andrade, M.F., Ribeiro, F.N.D., Francisco, K.J.M., Pérez-Martínez, P.J. 2018. Source apportionment of fine particulate matter by positive matrix factorization in the metropolitan area of São Paulo, Brazil. *Journal of Cleaner Production* 202: 253-263.

Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey ADB, Bloom AJ, Carlisle E, Dietterich LH, Fitzgerald G, Hasegawa T, Holbrook NM, Nelson RL, Ottman MJ, Raboy V, Sakai H, Sartor KA, Schwartz J, Seneweera S, Tausz M, Usui Y. 2014. Increasing CO₂ threatens human nutrition. *Nature* 510:139–142.

Myers SS, Smith MR, Guth S, Golden CD, Vaitla B, Mueller ND, Dangour AD, Huybers P. 2017. Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. *Annu Rev Public Health* 38:259–277.

Nakandalage N, Seneweera S. 2018. Chapter 12 - Micronutrients Use Efficiency of Crop-Plants Under Changing Climate. In: Hossain MA, Kamiya T, Burritt DJ, Phan Tran L-S, Fujiwara T (eds) *Plant Micronutrient Use Efficiency*. Academic Press.

Nakano Y, Asada A. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-888.

Nakazato, R. K., Lourenço, I. S., Esposito, M. P., Lima, M. E. L., M.L, F., de O. A. Campos, R., Domingos, M. 2020. Trace metals at the tree-litter-soil- interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by sources of air pollution. *Environmental Pollution*, 115797.

Nechita, C., Iordache, A.M., Lemr, K.L., Levanič, T., Pluhacek, T. 2021. Evidence of declining trees resilience under long term heavy metal stress combined with climate change heating. *Journal of Cleaner Production* 317, 128428.

Needham, A., Jha, R., & Lincoln, N. K. 2020. The response of breadfruit nutrition to local climate and soil: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 88, 103451.

Oliveira, D.G., Matos, G.M.A., Prata, A.P.N. 2015. *Biotemas*, 28 (2): 51-60.

Ortega, A., Garrido, I., Casimiro, I., Espinosa, F. 2017. Effects of antimony on redox activities and antioxidant defense systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. PLoS One 12 (9), e0183991. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183991>.

Pereira Filho, A.J., Marques dos Santos, P. and Xavier, T.M.B.S. 2007. Evolução do Tempo e do Clima na Região Metropolitana de São Paulo. IAG-USP, São Paulo, 282.

Pivello, V.R. 2018. Thinking about super-dominant populations of native species – Examples from Brazil. *Perspect Ecol Conserv.* (2017).

Pignata ML, Gudiño GL, Wannaz ED, Pla RR, González CM, Carreras HA & Orellana L. 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environ. Pollut.* 120:59-68.

Rai, K.P. 2016. Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129: 120–136.

Ralf R Mendel, Robert Hänsch. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 12, Issue 3, Pages 259-266, ISSN 1369-5266.

Ranta, P., Blom, T., Niemelä, J., Joensuu, E., Siitonen, M. 1998. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation* 7, 385–403.

Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., Quevauviller, P.H. 1999. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Monitoring*, 1: 57-61.

Rauser W E. 1995. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol*, 109: 1141–1149.

Rizwan, M., Mostofa, M. G., Ahmad, M. Z., Imtiaz, M., Mehmood, S., Adeel, M., Tu, S. 2018. Nitric oxide induces rice tolerance to excessive nickel by regulating nickel uptake, reactive oxygen species detoxification and defense-related gene expression. *Chemosphere*, 191, 23–35.

Rolo, V., Oliviera, P.I., Pfeiferb, M., Aarde R.J. 2018. Functional diversity mediates contrasting direct and indirect effects of fragmentation on below- and above-ground carbon stocks of coastal dune forests. *Forest Ecology and Management* 407: 174–183.

Sander mann, H., Matyssek, R. 2004: Scaling up from molecular to ecological processes. In: Sander mann, H. (ed) *Molecular Ecotoxicology of Plants*. *Ecol. Stud.* 170: 207–226.

Shah, V., Daverey, A. 2020. Phytoremediation: a multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environ. Technol. Innov.* 18, 10077.

Shahbaz, A.K., Adnan Ramzani, P.M., Saeed, R., Turan, V., Iqbal, M., Lewinska, K., Abbas, F., Saqib, M., Tauqeer, H.M., Iqbal, M., Fatima, M., Rahman, M. 2019. Effects of biochar and zeolite soil amendments with foliar proline spray on nickel immobilization, nutritional quality and nickel concentrations in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 182e191.

Shahzad, B., Tanveer, M., Rehman, A., Cheema, S. A., Fahad, S., Rehman, S., & Sharma, A. 2018. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. *Plant Physiology and Biochemistry*.

Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 1–44.

Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P. 2016. Factors affecting phytoextraction: a review. *Pedosphere* 26, 148–166.

Sidhu, G.P.S., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. 2017. Tolerance and hyperaccumulation of cadmium by a wild, unpalatable herb *Coronophus didymus* (L.) S. (Brassicaceae). *Exotoxicol. Environ. Saf.* 135: 2009–2015.

Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* 22(1): 94-103.

Silveira, M.L.A., Alleoni, L.R.F., Guilherme, L.R.G. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Sci. Agric.* 40, 793–806

Siqueira, M.C., Kanashiro, S., Domingos, M. 2021. Physiological and biochemical changes in tree seedlings growing in urban forest soil contaminated with copper in São Paulo, Brazil. *Plant Soil* 464, 149–163.

Soares, Alexandra e Olga Lima Tavares Machado. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V.1, n. 1, p. 9.

Soares, J.C., Santos, C.S., Carvalho, S.M.P. 2019. Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. *Plant Soil* 443, 1–26.

Sobrinho, C., & Neale, P. J. 2007. Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *Journal of Phycology*, 43(3), 426–436.

Solar, R.R., Barlow, J., Ferreira, J., Berenguer, E., Lees, A.C., Thomson, J.R. 2015. How pervasive is biotic homogenization in human-modified tropical forest landscapes? *Ecology Letters*, 18: 1108–1118.

Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. 1998. Assay of glutathione reductase in tissue homogenates, using 5,5'-DITHIOBIS (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 125:27-58.

Staehr, P. A. & Sand-Jensen, K. 2006. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology*, 51: 249-262.

Sultan, M.B., Choudhury, T.R., Alam, N-E, Doza, B., Rahmana, M. 2022. Soil, dust, and leaf-based novel multi-sample approach for urban heavy metal contamination appraisals in a megacity, Dhaka, Bangladesh. *Environmental Advances*, 7, 100154.

Suszek-Łopatka, B., Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Smreczak, B. 2021. The multifactorial assessment of the Zn impact on high and low temperature stress towards wheat seedling growth under diverse moisture conditions (optimal and wet) in three soils, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 416.

Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z.A., Siddiqui, M.F., Atnaw, S.M., Din, M.F.M. 2016. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environ. Monit. Assess.* 18.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment.

Tiecher, T.L., Tiecher, T., Ceretta, C.A., Ferreira, P.A.A., Nicoloso, F.T., Soriani, H.H., Tassinari, A., Paranhos, J.T., De Conti, L., Brunetto, G., 2016. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. *Plant Physiol. Biochem.* 106, 253–263.

Tiecher, T. L., Tiecher, T., Ceretta, C. A., Ferreira, P. A. A., Nicoloso, F. T., Soriani, H. H., 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.

Todorovi'c, Z.B., Randelovi'c, L.M., Marjanovi'c, J.Z. 2014. The assessment and distribution of heavy metals in surface sediments from the reservoir “barje” (Serbia). *Adv. Met. Technol.* 3, 85–95.

Tripathy BC, Mohanty P. 1980. Zinc-inhibited Electron Transport of Photosynthesis in Isolated Barley Chloroplasts. *Plant Physiol.* 66(6):1174-8. doi: 10.1104/pp.66.6.1174. PMID: 16661598; PMCID: PMC440811.

Turan, V. 2019. Confident performance of chitosan and pistachio shell biochar on reducing Ni bioavailability in soil and plant plus improved the soil enzymatic activities, antioxidant defense system and nutritional quality of lettuce. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 183, 109594.

U. Glaubitz, A. Erban, J. Kopka, D.K. Hinch, E. Zuther, 2015. Metabolite profiling reveals sensitivity-dependent metabolic shifts in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under high night temperature stress, *Procedia Environ. Sci.* 29, 72.

V M Brezoczki and G M Filip. 2017. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 200 012025.

Vhahangwele, M., Mugera, G.W. 2015. Journal of Environmental Chemical Engineering the potential of ball-milled South African bentonite clay for attenuation of heavy metals from acidic wastewaters: Simultaneous. *Biochem. Pharmacol.* 3, 2416–2425.

Venegas, A.; Rigol, A.; Vidal M. 2015. Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils. *Chemosphere* 119: 190-198.

Viana, V.M., Tabanez, A.A.J., Batista, J.L. 1997. Dynamic and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. In: Laurance, W., Bierregaard, R., Jr. (Eds.), *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities*. The University of Chicago Press, Chicago and London, pp. 351–365.

Walker, D.J, Clemente, R., Bernal, M.P. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere*, 57 (3), 215-224.

Wang, A.G. and Luo, G.H. 1990. Quantitative Relation between the Reaction of Hydroxylamine and Superoxide Anion Radicals in Plants. *Plant Physiology Communication*, No. 6, 55-57.

Wang, C.S.H. Zhang, P.F. Wang, J. Qian, J. Hou, W.J. Zhang, J. Lu. 2009. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle, *Chemosphere* 76 938–945.

Wang, L.M., Zhang, J., Hu, H.L., Jiang, X.M., Zhang, R.Y., He, S.H. 2015. Physiological responses of *Pennisetum* spp. to cadmium stress in three types of soils. *J. Agro-Environ. Sci.* 34 (12), 2252–2260.

Weiwei Cai, Xuesong Li, Jinho An, Seyoung Kim, Junghyo Nah, Dongxing Yang, Richard Piner, Aruna Velamakanni, Inhwa Jung, Emanuel Tutuc, Sanjay K. Banerjee, Luigi Colombo, Rodney S. Ruoff. 2009. Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils. *SCIENCE*: 1312-1314.

Xiang C B, Werner B L, Christensen E M, Oliver D J. 2001. The biological function of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol*, 126: 564–574

Yan, Z., Ma, T., Guo, S., Liu, R., & Li, M. 2021. Leaf anatomy, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of lettuce as influenced by arbuscular mycorrhizal fungi under high temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 280, 109933.

Yang M, Cobine PA, Molik S, Naranuntarat A, Lill R, Winge DR, Culotta VC. 2006. The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase. *EMBO J*, 25:1775-1783.

Yin, R., Deng, H., Wang, H., & Zhang, B. 2014. Vegetation type affects soil enzyme activities and microbial functional diversity following re-vegetation of a severely eroded red soil in subtropical China. *CATENA*, 115, 96–103.

Yin R, Kardol P, Thakur MP, Gruss I, Wu G-L, Eisenhauer N, Schädler M. 2020. Soil functional biodiversity and biological quality under threat: Intensive land use outweighs climate change. *Soil Biology and Biochemistry*, 147, 107847.

Yruela I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36:409–430.

Zeeshan, M., Ahmad, W., Hussain, F., Ahamd, W., Numan, M., Shah, M., & Ahmad, I. 2020. Phytostabalization of the heavy metals in the soil with biochar applications, the impact on chlorophyll, carotene, soil fertility and tomato crop yield. *Journal of Cleaner Production*, 120318.

Zeng,P., Guo, Z., Xiao, X., Peng, C. 2019. Effects of tree-herb co-planting on the bacterial community composition and the relationship between specific microorganisms and enzymatic activities in metal(loid)-contaminated soil. *Chemosphere*, 220, 237-248.

Zeng, F.; Ali, S.; Qiu, B. 2010. Effects of chromium stress on the subcellular distribution and chemical form of Ca, Mg, Fe, and Zn in two rice genotypes. *Journal Plant Nutrition Soil Science*, Tharandt, v.173, n.1, p.135–148.

Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F., Zhang, G. 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environ. Pollut.*, 159 (1), 84-91.

Zhang, W., Liu, X., Cheng, H., Zeng, E. Y., & Hu, Y. 2012. Heavy metal pollution in sediments of a typical mariculture zone in South China. *Marine Pollution Bulletin*, 64(4), 712–720.

Zhou, Y.-Y., Wang, Y.-S., & Inyang, A. I. 2021. Ecophysiological differences between five mangrove seedlings under heavy metal stress. *Marine Pollution Bulletin*, 172, 112900.