

SOLANGE EULÁLIA BRANDÃO

Tolerância de espécies arbóreas nativas de Mata Atlântica ao excesso de níquel (Ni) e zinco (Zn) no solo

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

SÃO PAULO

2020

SOLANGE EULÁLIA BRANDÃO

Tolerância de espécies arbóreas nativas de Mata Atlântica ao excesso de níquel (Ni) e zinco (Zn) no solo

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

ORIENTADORA: DRA. MARISA DOMINGOS

CO-ORIENTADORA: DRA. MIRIAN CILENE SPASIANI RINALDI

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

Brandão, Solange Eulália
B817t Tolerância de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica ao excesso de níquel (Ni) e zinco (Zn) no solo / Solange Eulália Brandão -- São Paulo, 2020. 120p.; il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2020.
Bibliografia.

1. Estresses ambientais. 2. Mata Atlântica. 3. Danos oxidativos. I. Título.

CDU: 581.526.422.2

À minha família: Teresinha Brandão,
Eurípedes Brandão (*in memoriam*).

“...O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”

Voltaire

AGRADECIMENTOS

A Dra. Marisa Domingos pela orientação neste doutorado e mestrado por todo conhecimento transmitido.

A Dra. Mirian Cilene Spasiani Rinaldi, pela co-orientação neste trabalho, pela ajuda no laboratório, metodologias, ensinamentos.

Aos colegas do núcleo de Pesquisa em Ecologia, Cássia (Ananas comosus), Douglas, Diego (aquática), Diego (Técnico), Francine, Giselle, Marli, Milton, Nicolas, Omar e Regina.

Agradeço a Simone (aquática) e Krysna (aquática), pelas conversas, pelos incentivos mútuos, pelos Ácidos Nítricos e toda ajuda durante esse árduo processo, obrigada meninas.

Agradeço a Rafaela e o Luciano (CEPEMA) pela ajuda nas análises

Agradeço a Ana (Larex) pela ajuda nas análises

Agradeço em especial a Geane Martins e Matheus Casarini, obrigada por terem feito parte deste trabalho e me deixarem passar um pouco do que aprendi em toda a minha caminhada no Instituto de Botânica.

Agradeço aos funcionários da Manutenção, Seu Luis obrigada por toda a ajuda com o solo e tantas conversas e Seu Hugo, obrigada pela ajuda com as plantas e obrigado pelas conversas, chás e coquinhos.

Agradeço aos pesquisadores Armando e Shoey pela ajuda com as plantas, Domingos e Clóvis pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Instituto de Botânica, pela infraestrutura e condições necessárias para a realização deste trabalho.

À coordenação e funcionários da Pós Graduação.

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida nos 2 primeiros anos.

À FAPESP (2016/25624-3) pela bolsa concedida nos últimos anos deste doutorado.

Agradeço ao Viveiro de mudas da Companhia Energética de São Paulo (CESP/Paraibuna), pela doação das mudas para o projeto.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) e ao Centro de Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA), pela colaboração e realização das análises.

Enfim a minha Família ao meu Pai (in memorian), sei que você sempre está ao meu lado e torcendo por mim, a minha Mãe que sem ela nada seria possível Te Amo.

RESUMO

Os ecossistemas florestais vêm sendo afetados nas últimas décadas por uma diversidade de poluentes devido à expansão das atividades antrópicas. Os metais pesados adsorvidos ao material particulado estão entre os poluentes incorporados nos remanescentes de Mata Atlântica em áreas urbanas. Estes podem ser retidos sobre as copas das árvores e incorporados no solo. Uma vez disponíveis no solo estes podem ser absorvidos via raízes. O acúmulo destes elementos nas plantas pode levar ao aumento dos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio e causar danos oxidativos, cuja intensidade dependerá da capacidade das espécies nativas produzirem defesas antioxidativas. Assim, com base no conhecimento científico disponível na literatura e produzido por nossa equipe, assumimos que os metais Ni e Zn contidos no material particulado urbano, ao serem incorporados no solo de um fragmento de Mata Atlântica urbano, aumentam a fração biodisponível para a comunidade vegetal e que as espécies arbóreas não pioneiras acumulam mais níquel (Ni) e zinco (Zn) e são mais susceptíveis ao estresse oxidativo do que espécies pioneiras quando crescidas em solo contaminado. Essas hipóteses foram testadas experimentalmente utilizando Ni e Zn (marcadores de fontes urbanas de material particulado). O presente estudo foi proposto objetivando: avaliar se haverá aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn após a adição dos mesmos no solo proveniente de um fragmento urbano de Mata Atlântica localizado na cidade de São Paulo; determinar o nível de acúmulo de Ni e Zn adicionados ao solo em raízes, caules/ramos e folhas de plantas jovens de espécies arbóreas pioneiras e espécies não pioneiras nativas de Mata Atlântica paulista; determinar o nível de tolerância das espécies arbóreas ao Ni e Zn adicionados ao solo, por meio da análise de alterações nas taxas de crescimento e produção de biomassa da parte aérea e radicular, no perfil de defesas (antioxidantes: ácido ascórbico, glutatona, superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutatona redutase) e de danos celulares (pigmentos, indicadores de peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio) e ordenar as espécies escolhidas em função de sua capacidade de acúmulo de Ni e Zn nos tecidos vegetais acima do solo, de seu nível de tolerância a metais pesados e de ocorrência de danos celulares, a fim de verificar se a ordenação resultante foi determinada em função do grupo funcional a que pertence cada espécie. O experimento foi realizado com três espécies arbóreas pioneiras (Pi; *Croton floribundus*, *Inga sessilis* e *Rapanea ferrugínea*) e três não pioneiras (NPi; *Eugenia uniflora*, *Esenbeckia leiocarpa* e *Ocotea odorifera*) nativas da Mata Atlântica. Estas foram crescidas em solo coletado em fragmento urbano de Floresta por 90 dias, com adubação balanceada (controle) e em solo enriquecido de Ni, Zn e Ni+Zn, alcançando concentrações três vezes mais altas do que as propostas

pela CETESB para prevenção de riscos associados à contaminação de solos (30 e 86 mg/ Kg de solo para Ni e Zn respectivamente). Os resultados mostraram que as concentrações desses metais aumentaram significativamente nas frações biodisponíveis do solo, nos tratamentos em que houve adição destes. Os maiores teores de Ni e Zn nas plantas foram encontrados nos tratamentos com o acréscimo destes. O conteúdo absoluto (concentração*massa seca de cada órgão das plantas) de Ni e Zn nas plantas das espécies avaliadas neste estudo refletiu diretamente o nível no solo desses metais nas formas disponíveis, sendo mais alto em espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras. Índices de translocação não foram similares entre espécies pioneiras ou entre não pioneiras e houve a translocação apenas de Ni para a parte aérea, nos tratamentos com excesso desse metal. As espécies arbóreas apresentaram características bioquímicas diferentes entre si e semelhantes a exposição aos metais níquel e zinco. Os resultados ainda nos permitiram verificar o nível de tolerância das espécies ao estresse oxidativo induzido por Ni e/ou Zn, da seguinte forma: *R. ferruginea* (Pi) = *E. uniflora* (NPi) > *I. sessilis* (Pi) > *C. floribundus* (Pi) > *E. leiocarpa* (NPi) > *O. odorifera* (NPi).

Palavras chaves: Estresses ambientais, Mata Atlântica, espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras, antioxidantes, danos oxidativos.

ABSTRACT

Forest ecosystems have been affected in recent decades by a diversity of pollutants due to the expansion of anthropic activities. Heavy metals adsorbed to particulate matter are among the pollutants incorporated in the remnants of Atlantic Forest in urban areas. These can be retained on the treetops and incorporated into the soil. Once available in the soil these can be absorbed via roots. The accumulation of these elements in plants can lead to increased cellular levels of reactive oxygen species and cause oxidative damage, the intensity of which will depend on the ability of native species to produce antioxidative defenses. Thus, based on the scientific knowledge available in the literature and produced by our team, the summation that Ni and Zn metals contained in urban particulate matter, when incorporated in to the soil of an urban Atlantic Forest fragment, increase the bioavailable fraction for the plant community and that non-pioneer tree species accumulate more nickel (Ni) and zinc (Zn) and are more susceptible to oxidative stress than pioneer species when grown in contaminated soil.. Essas hipóteses foram testadas experimentalmente utilizando Ni e Zn (marcadores de fontes urbanas de material particulado). The present study was proposed to: evaluate whether there will be an increase in the bioavailability of Ni and Zn after their addition in soil from an urban fragment of Atlantic Forest located in the city of São Paulo; determine the level of accumulation of Ni and Zn added to the soil in roots, stems/branches and leaves of young plants of pioneer tree species and non-pioneer species native to the Atlantic Forest of São Paulo; determine the level of tolerance of tree species to Ni and Zn added to the soil, by analyzing changes in the growth rates and biomass production of shoots and roots, in the profile of defenses (antioxidants: ascorbic acid, glutathione, superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase) and cellular damage (pigments, lipid peroxidation indicators and reactive oxygen species)) and order the species chosen as a function of their ability to build up Ni and Zn in plant tissues above ground, their level of tolerance to heavy metals and the occurrence of cellular damage, in order to verify that the resulting ordering has been determined according to the functional group to which each species belongs. The experiment was carried out with three pioneer tree species (Pi; *Croton floribundus*, *Inga sessilis* and *Rapanea ferruginea*) and three non-pioneers (NPi; *Eugenia uniflora*, *Esenbeckia leiocarpa* and *Ocotea odorifera*) native to the Atlantic Forest. These were grown in soil collected in urban fragment of Forest for 90 days, with balanced fertilization (control) and in enriched soil of Ni, Zn and Ni+Zn, reaching concentrations three times higher than those proposed by CETESB to prevent risks associated with soil contamination (30 and 86 mg/ Kg of soil for Ni and Zn respectively). The results showed that the concentrations of these metals increased significantly in the bioavailable fractions of the soil, in the treatments in which there was addition of these. The highest levels of Ni and Zn in the

plants were found in the treatments with the addition of these. The absolute content (concentration*dry mass of each plant organ) of Ni and Zn in the plants of the species evaluated in this study directly reflected the soil level of these metals in the available forms, being higher in pioneer species than in non-pioneer species. Translocation indices were not similar among pioneer or non-pioneer species and Ni was translocated only to shoots in treatments with excess of this metal. The tree species presented different biochemical characteristics and similar to exposure to nickel and zinc metals. The results also allowed us to verify the level of tolerance of the species to oxidative stress induced by Ni and/or Zn, as follows: *R. ferruginea* (Pi) = *E. uniflora* (NPi) > *I. sessilis* (Pi) > *C. floribundus* (Pi) > *E. leiocarpa* (NPi) > *O. odorifera* (NPi).

Key words: Environmental stresses, Atlantic Forest, pioneer and non-pioneer tree species, antioxidants, oxidative damage.

SUMÁRIO

I. CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	2
I.1 Retenção e disponibilidade dos metais pesados no sistema planta-solo	3
I.2 Absorção, transporte e toxicidade do níquel	5
I.3. Absorção, transporte e toxicidade de zinco	7
I.4 Danos e mecanismos de tolerância das plantas aos metais pesados	8
I.4.1. Espécies reativas de Oxigênio (EROs)	8
I.4.2 Defesas antioxidantes	11
I.4.2.1 Antioxidantes não enzimáticos	11
I.4.2.2 Antioxidantes enzimáticos	12
II. JUSTIFICATIVAS	14
III. HIPÓTESES, OBJETIVOS, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COMPOSIÇÃO DA TESE	17
III.1. Síntese do delineamento experimental	18
III.2. Composição da Tese	25
V. BIBLIOGRAFIA	27
CAPÍTULO 02 Níquel e Zinco biodisponíveis em solo poluído, altera o crescimento de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica	38
Resumo	38
IV.1. INTRODUÇÃO	39
IV.2. MATERIAL E MÉTODOS	41
IV.2.1. Delineamento experimental	41
IV.2.2 Análises químicas e físicas em amostras de solo	43
IV.2.3 Análises químicas em amostras vegetais	44
IV.2.4. Medidas de Crescimento e biomassa	45
IV.3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
IV.4. RESULTADOS	46
IV.5. DISCUSSÃO	61
IV.6. CONCLUSÕES	66
IV.7. BIBLIOGRAFIA	67
CAPÍTULO 3 Capacidade Antioxidante e a formação de Espécies reativas de oxigênio em espécies arbóreas da Mata atlântica em solo contaminado com Ni e Zn.	71
Resumo	72
V.1. INTRODUÇÃO	73

V.2. MATERIAL E MÉTODOS	77
V.2.1. Delineamento experimental.....	77
V.2.2 Análises Bioquímicas	78
V.2.2.1 Antioxidantes não enzimáticos	78
V.2.2.2 Antioxidantes Enzimáticos	79
V.2.2.3 Indicadores de Danos Celulares	80
V.2.2.4 Espécies reativas de oxigênio.....	81
V.2.2.5 Pigmentos	82
V.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	83
V.4. RESULTADOS	84
V.5. DISCUSSÃO	99
V.6. CONCLUSÕES	102
V.7. BIBLIOGRAFIA	103
VI.CONCLUSÕES GERAIS	110
ANEXO A	112

I. CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

I. INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas florestais, nas últimas décadas, vêm sendo fragmentados e afetados por uma diversidade de poluentes devido à expansão das cidades, das atividades agrícolas e industriais (Bussotti 2008; Tausz *et al.* 2007; Paoletti *et al.* 2010). A intensificação das atividades industriais, agrícolas e da urbanização tem aumentado a poluição dos solos por metais pesados (Kabata-Pendias 2011; Alloway 2013; Jinmei & Xueping 2014; Birani *et al.* 2015).

Há várias definições para o termo metal pesado. Neste trabalho, foi adotada a de Amaral Sobrinho *et al.* (2009), que consideraram metal pesado como um grupo de metais e metalóides associados com poluição e toxidez, incluindo neste termo alguns elementos que, em baixa concentração, são essenciais aos organismos vivos. Dentre os metais pesados essenciais aos organismos vivos e provenientes de atividades antrópicas, podemos destacar Ni e Zn.

Segundo Kabata-Pendias e Pendias (1999), Ni no solo está associado a carbonatos, fosfatos e silicatos, sendo que a matéria orgânica possui a capacidade de absorver esse metal e torná-lo imóvel. A sua concentração no solo varia em função da rocha de origem e da intensidade de intervenção antrópica. Entre as atividades antrópicas emissoras de Ni, destacam-se a produção de ligas, a indústria de galvanoplastia, fabricação de baterias (baterias de Ni-Cd) e catalizadores e também está contido em produtos de petróleo e pigmentos (Kasprzak *et al.* 2003).

O zinco é liberado para o solo por intemperismo e encontra-se principalmente nas seguintes formas: (i) solúvel (Zn^{2+}); ii) adsorvido sob forma permutável em colóides argilosos, húmicos e hidróxidos de alumínio e ferro; iii) complexos insolúveis e minerais (Montalvo *et al.* 2016; Babula *et al.* 2008). Outras fontes naturais podem ser incluídas, como processos atmosféricos (incêndios florestais, atividade vulcânica) e processos bióticos (decomposição, lavagem da superfície das folhas). Além disso, destacam-se também as atividades antropogênicas como fontes emissoras desse metal. O Zn tem sido preponderantemente utilizado na galvanização de produtos de ferro,

proporcionando uma cobertura resistente à corrosão, e também em baterias, fertilizantes, aros e rodas de veículos, tintas, plásticos, borrachas, em alguns cosméticos, como pós e bases faciais, e produtos farmacêuticos como, por exemplo, em complexos vitamínicos (Moore & Ramamoorthy 1984; Lester, 1987; Kabata-Pendias 2011; Calvo *et al.* 2013).

Em áreas urbanas, ambos os metais podem ser encontrados na queima de combustíveis fósseis, emitidos pela frota veicular, sendo uma fonte particularmente importante de poluição ambiental por material particulado enriquecido de metais pesados (Kabata-Pendias 2011; Calvo *et al.* 2013), atingindo remanescentes florestais, por exemplo.

Ressalta-se que os metais pesados de origem antrópica devem apresentar formas químicas mais móveis e biodisponíveis em solo que os de origem natural. Desta forma é importante compreender a disponibilidade destes em solo de regiões impactadas por atividades antrópicas e como essa maior disponibilidade de metais pode alterar mecanismos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Assim, os temas “retenção e disponibilidade dos metais pesados no sistema planta-solo”, e “danos e mecanismos de tolerância das plantas aos metais pesados” serão mais detalhados nos próximos itens, considerando um ecossistema impactado por metais de origem antrópica.

I.1 Retenção e disponibilidade dos metais pesados no sistema planta-solo

A contaminação do solo por metais pesados é uma preocupação mundial devido à alta toxicidade, persistência em longo prazo e a incorporação subsequente dos metais na cadeia trófica, o que pode levar a efeitos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana (Venegas *et al.* 2015). De uma maneira geral, a movimentação dos metais pesados no ecossistema é condicionada pelos atributos químicos e físicos do solo e pela natureza química dos metais, que interferem nas reações de adsorção/dessorção, precipitação/dissolução, complexação, quelação e oxi-redução (Oliveira; Mattiazzo 2001). Dentre os atributos do solo, que podem interferir na mobilidade dos metais,

destacam-se o pH, o teor de matéria orgânica, tipologia e textura do solo, e ação dos exsudatos liberados pelas raízes, que facilita a biodisponibilidade (Rieuwerts *et al.* 2006).

Estudos mostram que ocorre uma diminuição da disponibilidade dos metais à medida que o pH aumenta, favorecendo a formação de cargas negativas no meio e, desta forma, ocorre um aumento da sorção de metais (que são catiônicos) em coloides, incluindo matéria orgânica, óxidos de Al e Fe e partículas de minerais argilosos) (Wang *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016). Geralmente, a fração biodisponível desses elementos no solo é mais alta em solos ácidos, como parece ser caso dos solos da Mata Atlântica no sudeste brasileiro (Lopes *et al.* 2015). Entretanto, Rieuwerts (2007) alertou, em seu artigo de revisão, que os modelos preditivos da mobilidade e biodisponibilidade de metais pesados em solo foram propostos para as regiões de clima temperado e podem não ser aplicáveis nos trópicos, devido a diferenças na química do solo. Esse alerta reforça a necessidade de mais estudos sobre o tema nos trópicos, inclusive no Brasil.

No solo, os metais podem ser absorvidos pelas plantas (pelas raízes e superfícies foliares) ou lixiviados, contaminando as águas subterrâneas (Pierangeli *et al.* 2005). As árvores desempenham papel preponderante na circulação de metais pesados nos ecossistemas florestais, por funcionarem como anteparos ao material particulado atmosférico enriquecidos de metais (Sánchez-López *et al.* 2015; Song *et al.* 2015; Rai 2016) e por sua capacidade de absorvê-los naturalmente do solo (Naidu *et al.* 2001; Sarma *et al.* 2011). O acúmulo de metais no sistema planta-solo do ecossistema florestal ocorre por processos como a bioacumulação e a biomagnificação, que transformam concentrações consideradas normais destes em concentrações tóxicas para diferentes espécies vegetais, podendo promover efeitos em longo prazo, mesmo depois de interrompida, por exemplo, a deposição atmosférica de material particulado que os contêm (Nagajyoti *et al.* 2010, Tavares & Carvalho 1992). Elementos como manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), molibdênio (Mo) e boro (B) desempenham papel nutricional importante no sistema solo-planta, sendo que a baixa biodisponibilidade desses elementos pode causar deficiências nutricionais às plantas. Por outro lado,

outros constituintes naturais do solo, como arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), Cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), níquel (Ni), chumbo (Pb), antimônio (Sb), selênio (Se), vanádio (V) e zinco (Zn), também são emitidos por fontes antrópicas sendo acumulados nos ecossistemas em maiores proporções do que esperado, colocando em risco toda a biota, devido ao seu potencial tóxico apontado por diferentes autores (Birani *et al.* 2015). Os metais pesados em altas concentrações nas folhas causam prejuízos aos processos celulares e fisiológicos das plantas (Shahid *et al.* 2014). Porém, em uma quantidade natural, as plantas são capazes de evitar seu impacto negativo (Juknys *et al.* 2012). Ainda o acúmulo de metais pesados nos tecidos foliares das árvores podem confirmar sua biodisponibilidade no solo (França *et al.* 2007).

I.2 Absorção, transporte e toxicidade do níquel

O níquel em concentrações adequadas, que podem variar conforme a espécie, é um micronutriente essencial e desempenha papel importante no crescimento e desenvolvimento de plantas (Seregin Kozhevnikova 2006). Participa de processos metabólicos como ativador das enzimas urease, hidrogenase, monóxido de carbono desidrogenase, peptídeo deformilase, acetil-S-coenzima, metilcoenzima e superóxido dismutase contendo Ni (NiSOD) (Ermler *et al.* 1998; Mulrooney & Hausinger 2003).

Prevê-se que o Ni seja absorvido pelas plantas inicialmente pelas células das raízes na forma de cátions hidratados livres, seguido pela formação de complexos de Ni-aminoácidos no interior do apoplasto e do simplasma das raízes. Além dos aminoácidos, muitos ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como citrato e malato, também estão envolvidos na absorção de Ni pelas raízes por meio da formação de complexos de Ni-ácido orgânico, auxiliando no processo de absorção desse metal, como também os transportadores de Zn presentes na membrana plasmática (células epidérmicas das raízes) (Deng *et al.* 2014). Após entrar nas plantas pelas raízes, o níquel, novamente na forma de cátions hidratados livres, é transportado ao xilema principalmente via simplástica (Dalir &

Khoshgoftarmanesh 2015) e distribuído para a parte aérea. Este elemento essencial também é fornecido para as partes meristemáticas das plantas por retranslocação das folhas velhas para as mais jovens, e aos botões, frutos e sementes, por meio do floema (Page *et al.* 2006). Este transporte é regulado por proteínas que se ligam especificamente ao Ni (Colpas *et al.* 2000). Ligantes metálicos, como nicotianamina (NA), histidina (His) e ácidos orgânicos (ácido cítrico e íons malato), podem atuar como intracelulares quelantes, que se ligam ao Ni no citosol ou nas células subcelulares para transporte, translocação e acumulação dentro de plantas (Kramer *et al.* 1996; Douchkov *et al.* 2005). Parte do Ni absorvido pelas plantas pode ser retido pelas raízes. Isso pode ser devido ao seqüestro nos locais de troca catiônica das paredes das células do parênquima do xilema e imobilização nos vacúolos de raízes (Seregin *et al.* 2006). Além disso, uma alta porcentagem de Ni nas raízes pode estar presente nos feixes vasculares, enquanto no córtex é verificado em menor porcentagem. Essa distribuição sugere uma alta mobilidade de Ni no xilema e floema (Riesen *et al.* 2005). O Ni tem sido distribuído preferencialmente nas células epidérmicas das hastes e folhas dos hiperacumuladores, provavelmente nos vacúolos e não na parede celular (Küpper *et al.* 2001). Contudo, Kramer *et al.* (2000) relataram que 67 a 73% de Ni nas folhas de *Thlaspi goesingense* está associado à parede celular.

Há evidências que a toxicidade causada pelo excesso de níquel nas plantas está associada com estresse oxidativo (Gonnelli *et al.* 2001; Boominathan *et al.* 2002; Gajewska *et al.* 2006), apesar de não ser um metal redox-ativo e não gerar diretamente as espécies reativas de oxigênio (EROs). Entretanto, interfere indiretamente na atividade de enzimas antioxidantes (Gajewska *et al.* 2005; Hao *et al.* 2006), por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), peroxidase (POD), guaiacol peroxidase (GOPX) e ascorbate peroxidase (APX).

I.3. Absorção, transporte e toxicidade de zinco

O zinco tem um efeito positivo nas células vegetais, pois ativam muitas enzimas, como RNA polimerase, superóxido dismutase, álcool desidrogenase e carbônico anidrase, e participam da proteossíntese e metabolismo de carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (Palmer *et al.*, 2009). Também controla a proliferação e diferenciação de células (Palmer *et al.*, 2009). Além dessas funções, o zinco também tem um papel importante no desenvolvimento de cloroplastos e em algumas de suas funções, como o processo de reparo do fotossistema II por ‘reciclagem’ da proteína D1 danificada por a radiação luminosa ou atividade da SPP peptidase (Hansch *et al.*, 2009).

O zinco é absorvido da solução do solo pelas raízes, principalmente na forma de íons Zn^{2+} ou complexos de ácido orgânico (Palmgren *et al.* 2008) e translocado para a parte aérea das plantas por meio do xilema. Esses fluxos simplásticos de Zn da raiz até o xilema é realizada por transportadores de proteínas de metais pesados (Zinc Regulatory Transporter – Iron Transportador Regulador como Proteína) identificados em estudos realizados com espécies comerciais com arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*) e agrião (*Arabidopsis thaliana*) (White *et al.* 2002; Milner *et al.* 2013; Bashir *et al.* 2013). Porém, o excesso de zinco pode causar toxidez e prejudicar o desenvolvimento das plantas.

O princípio da toxicidade excedente de íons de zinco nas plantas é baseado no fato de que esses íons nas células competem por locais destinados a outros íons biologicamente ativos (Krämer *et al.* 2010). Alguns dos sintomas típicos desse excedente são cloroses de folhas jovens (provavelmente a consequência menor absorção de Fe^{2+} e Fe^{3+}), redução da biomassa vegetal e inibição de crescimento da raiz (Ren *et al.* 1993). O zinco é um cofator de anidrase carbônica que aumenta o conteúdo de CO_2 no cloroplasto e, portanto, também aumenta a capacidade de carboxilação da enzima Rubisco (Salama *et al.* 2006) e o seu excesso pode também reduzir a taxa fotossintética e diminuir a atividade de enzimas envolvidas na fixação de carbono.

I.4 Danos e mecanismos de tolerância das plantas aos metais pesados

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 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 o estado redox das plantas. Porém, há diferenças marcantes entre as espécies vegetais na habilidade de absorver, acumular e tolerar metais pesados (Santos *et al.* 2006).

Algumas espécies vegetais conseguem sobreviver em ambientes com alto teor de elementos tóxicos, restringindo (excludentes) ou tolerando (tolerantes) entrada excessiva destes. As tolerantes podem imobilizar e/ou compartimentalizar estes elementos em suas células (Agrawal *et al.* 2011; Leyval *et al.*, 1997; Kramer, 2010) e até mesmo melhorando seu sistema de defesa antioxidante a fim de neutralizar os efeitos do estresse oxidativo (Kramer, 2010; Rascio & Navarro-Izzo 2011).

A seguir serão apresentadas algumas informações sobre as EROs e as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em organismos vegetais, focos principais desta pesquisa, para o entendimento dos danos causados pelo excesso de metais, como também os mecanismos de tolerância para restringir esses danos.

I.4.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui radicais livres e espécies que não possuem elétrons desemparelhados, sendo subprodutos de reações redox (Kovalchuk 2010). As EROs são formadas com a redução do O₂, formando o oxigênio singlete ou por sucessivas adições de elétrons ao O₂ molecular, reduzindo-o a radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroperoxila (HO₂[•]) ou

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (D'Autréaux & Toledano, 2007; Bhattacharjee, 2010).

O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é instável e moderadamente reativo em meio aquoso, forma-se a partir da redução do O_2 por um único elétron, reduções univalentes subsequentes convertem o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e H_2O . A dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 é muito rápida e pode ocorrer tanto de forma espontânea como catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Bhattacharjee 2010). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ainda doar elétrons ao Fe^{3+} formando Fe^{2+} que, por sua vez, reduz o H_2O_2 e forma $\text{OH}\cdot$ e OH^- . O conjunto de reações através das quais o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 e o Fe^{2+} rapidamente geram $\text{OH}\cdot$ é conhecido como “reação de Haber-Weiss”, enquanto a reação final, a oxidação do H_2O_2 pelo Fe^{2+} , é denominada reação de Fenton (Gil & Tuteja 2010).

O H_2O_2 é uma EROs moderadamente reativa e cujo pequeno tamanho permite-lhe atravessar membranas celulares e migrar em compartimentos diferentes. Dessa forma, difunde os danos e também atua como um mensageiro da condição de estresse. Apesar do H_2O_2 não ser um radical livre, tem uma ação deletéria por participar da reação formadora de $\text{OH}\cdot$, o oxidante mais reativo na família das EROs. Além disso, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol (Gadjev *et al.* 2008; Karuppanapandian *et al* 2011).

O radical $\text{OH}\cdot$ é considerado a mais oxidante dentre as EROs e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, podendo potencialmente reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (Aguiar & Ferraz, 2007; Mylona & Polidoros, 2010). Em sistemas biológicos, pode ocasionar modificações nas bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA; desnaturar proteínas pela oxidação de grupos sulfidríla ($-\text{SH}$) e pontes dissulfeto ($-\text{SS}$), além de causar danos a moléculas de carboidratos e retirar átomos de hidrogênio de grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (Blokina *et al.* 2003; Barreiros, 2006).

Em plantas, as EROs podem ser formadas durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto ou na mitocôndria (Apel & Hirt 2004, Arora *et al.* 2002, Bray *et al.* 2000). A atividade metabólica altamente oxidante e o intenso fluxo de elétrons em organelas como cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos, são importantes fontes de EROs em células vegetais (Gill & Tuteja 2010).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma consequência comum da maioria dos estressores bióticos e abióticos às plantas, incluindo o acúmulo foliar de metais tóxicos, que podem causar a oxidação inespecífica de proteínas e membranas lipídicas ou podem causar danos ao DNA, resultando em desordens no metabolismo, como inibição da fotossíntese e respiração, cloroses, diminuição do crescimento e eventual morte do indivíduo (Gratão *et al.* 2005; Guala *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2007; Meers *et al.* 2005).

As EROs possuem uma meia-vida extremamente curta e os causadores de danos oxidativos em macromoléculas celulares são os produtos finais estáveis dessas espécies (Bhaduri & Fulekar, 2012). As reações promovidas pelas EROs causam alterações em processos bioquímicos e fisiológicos, além de alterações ultra estruturais e estruturais (Cheng *et al.* 2007, Fuhrer & Booker 2003, Morgan *et al.* 2006, Oksanen *et al.* 2013, Ueda *et al.* 2013), mostrando danos não somente em nível da célula vegetal, mas também em níveis mais altos da organização biológica, como em tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades. Podem surgir lesões, como cloroses e necroses nas folhas, como consequência da desorganização celular; fechamento estomático e redução da absorção de água, com consequências ao crescimento, podendo, em casos extremos, levar à morte de indivíduos (Calatayud *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2007, Feng & Kobayashi 2009, Fuhrer 2009).

A intensidade dos danos nos diferentes níveis de organização, assim, dependerá do quão eficiente a espécie vegetal é para mobilizar as defesas antioxidantes, mantendo o equilíbrio pró-

oxidante/antioxidante (Blokina *et al.* 2003, Foyer & Shigeoka 2011, Gratão *et al.* 2005, Irit i& Faoro 2008, Nali *et al.* 2005).

I.4.2 Defesas antioxidantes

A defesa antioxidante é constituída, entre outros, por diferentes compostos enzimáticos e não enzimáticos integrantes do ciclo ascorbato-glutationa (Leyval *et al.* 1997; Wang *et al.* 2009; Kramer 2010; Agrawal *et al.* 2011). 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 destacam-se, por exemplo, os compostos glutathione e ácido ascórbico (Baier *et al.* 2005, Bray *et al.* 2000, Tausz *et al.* 2003, Favaretto *et al.* 2011). Mais detalhes sobre esses compostos são apresentados a seguir.

I.4.2.1 Antioxidantes não enzimáticos

O ácido ascórbico (AA), também referido como ascorbato, é um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos e pode inativar várias EROs. Esse antioxidante pode ser encontrado na forma reduzida (AsA), semi oxidada (MDHA) e oxidada (DHA). Juntamente com a glutathione (GSH), o AA participa do Ciclo do Ascorbato-Glutathione, no qual o H_2O_2 é decomposto pela enzima ascorbato peroxidase (APX) mediante a oxidação do AsA. A recuperação do AsA ocorre por meio da oxidação da GSH que torna a ser reduzida pela glutathione redutase (GR) (Dinakar *et al.* 2012).

A glutathione reduzida (GSH) tem um importante papel na proteção das plantas contra danos oxidativos. Este tripeptídeo multifuncional é abundante nos tecidos das plantas, existe em todos os componentes celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, vacúolos e citoplasma (Noctor & Foyer, 1998). Em conjunto com sua forma oxidada (GSSG), a GSH está envolvida na regulação do metabolismo celular, em condições de estresse e não estresse. GSH é o principal tampão redox no ambiente intracelular reduzido. Em condições normais, a proporção de GSH para GSSG é de cerca

de 20:1 e esta proporção pode diminuir em situação de estresse, como resultado da eliminação de EROs sob condições que comprometem a redução de GSSG para GSH (Szarka *et al.* 2012).

Entre os antioxidantes não enzimáticos ainda podemos citar os carotenoides, que atuam como antenas auxiliares, ou seja, absorvem luz em regiões do espectro visível onde a clorofila não absorve eficientemente e transferem com eficiência essa energia absorvida para outros pigmentos. Este mecanismo de foto proteção envolve a supressão dos estados tripleto da clorofila, evitando a formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) via sensibilização, ou seja, transferência de energia tripleto da clorofila para o carotenoide; se houver formação de oxigênio singleto por outros processos, o mesmo pode ser diretamente suprimido pelo carotenoide (Maeda & Dellapenna 2007).

I.4.2.2 Antioxidantes enzimáticos

As superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas que ocorrem em três isoformas diferentes nos vegetais, de acordo com o metal presente no sítio ativo, sendo a manganês SOD (MnSOD) localizada nas mitocôndrias, cobre/zinco SOD (Cu/ZnSOD) localizada nos cloroplastos, peroxissomas e citossol e ferro SOD (FeSOD) localizada nos cloroplastos (Culotta 2001, Alscher *et al.* 2002).

As SOD, consideradas a primeira linha de defesa em nível celular, protegem as células contra o $\text{O}_2^{\bullet-}$, que é dismutado a H_2O_2 e O_2 (Favaretto *et al.* 2011). Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (Mittler, 2002; Bhattacharjee, 2010). Uma vez que dismutam o $\text{O}_2^{\bullet-}$, agem indiretamente na redução do risco de formação do OH^\bullet a partir do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Dubey, 2011; Dinakar *et al.* 2012). Essas isoenzimas são ativadas por vários estresses abióticos, como estresse hídrico, oscilações de temperatura, hipóxia e concentrações tóxicas de metais pesados (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007; Kauppanapandian *et al.* 2011).

A catalase (CAT) é uma enzima com um grupo heme que catalisa a reação que reduz H_2O_2 , produzido em peroxissomos durante β -oxidação e na foto-respiração, em H_2O e O_2 . A catalase assim como a superóxido dismutase, possui três isoformas denominadas catalases classe I, classe II e classe III, sendo localizadas em tecidos fotossintetizantes, tecidos vasculares e tecidos reprodutivos, respectivamente e seus genes são expressos e regulados de forma independente (Willekens *et al.*, 1995; Mittler, 2002; Blokina *et al.*, 2003; Karuppanapandian *et al.* 2011).

A APX é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas. Suas isoformas podem ser encontradas em citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos (estroma e ligadas às membranas dos tilacoides) e parede celular (Dabrowska *et al.* 2007). A APX exige o ácido ascórbico como redutor e tem alta afinidade com o H_2O_2 , permitindo a eliminação do H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (Locato *et al.* 2010).

A glutathione redutase (GR) catalisa a redução glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH), utilizando NADPH. Esta enzima é importante para manter a concentração de GSH e um aumento na atividade da GR melhora o desempenho da planta em condições desfavoráveis (Karuppanapandian *et al.* 2011).

Porém, quando falamos em danos e mecanismos de tolerância aos metais pesados, devemos salientar que as plantas também são boas alternativas para a recuperação de solos degradados pelo excesso de metais pesados (Salt *et al.* 1995), desde que apresentem alta capacidade de tolerância a esse tipo de estresse. As plantas podem servir também como indicadoras da contaminação de solos, visto que respondem rapidamente aos efeitos tóxicos de poluentes (Rossini-Oliva & Mingorance 2004; Aničić *et al.* 2011; Guzmán-Morales *et al.* 2011; Sawidis *et al.* 2011; Tomašević *et al.* 2011). A sobrevivência de plântulas, o crescimento da raiz e da parte aérea e a produção de biomassa estão entre os parâmetros adicionais medidos para avaliação da tolerância de plantas (Walker *et al.*, 2001).

II. JUSTIFICATIVAS

No presente estudo, partimos do pressuposto de que as árvores nativas de remanescentes de Mata Atlântica do Estado de São Paulo são vulneráveis aos impactos por metais pesados, devido à extensa ocupação do solo por populações humanas. Este deve ser o caso do fragmento de Mata localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), que está inserido na malha urbana da cidade de São Paulo (figura 1) e tem sido afetado por poluentes atmosféricos de origem veicular (Domingos *et al.* 2002). Jesus (2008), por meio de datação em sedimentos lacustres, mostrou que o histórico de impactos antrópicos no PEFI pode ser dividido em três fases distintas: Fase I:(~1894-1975): caracterizada por baixas concentrações contaminantes, Fase II:(~1975-1990): aumento abrupto das concentrações de metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) traçadores de veículos automotores, marcando o aumento da poluição atmosférica e Fase III:(~1990-2005): Pico das concentrações de HPAs traçadores do uso de carvão mineral associado às atividades de uma siderúrgica vizinha, bem como queda das concentrações destes traçadores coincidindo com mudanças no processo industrial da empresa. Ainda nesta fase, notaram-se aumentos expressivos dos teores e fluxos dos HPAs traçadores de veículos automotores, corroborando o cenário de aumento vertiginoso da frota de veículos na última década. Apesar desses riscos potenciais à Mata Atlântica, pouco se conhece sobre a capacidade das árvores nativas, desse importante bioma brasileiro, de tolerar os níveis atuais de poluição por metais pesados e de perpetuar no ecossistema em caso da incorporação de metais, no sistema solo-planta não cessar ao longo do tempo. Tanto o risco mencionado quanto o desconhecimento do potencial de tolerâncias das árvores nativas da Mata Atlântica também nos estimularam a desenvolver a pesquisa proposta.



Figura 01. Parque Estadual das Fontes de Ipiranga (PEFI), fragmento de Mata Atlântica localizado na malha urbana do Estado de São Paulo. Fonte: Imagens de satélite Google Earth.

No entanto, o estabelecimento do nível de tolerância a metais pesados incorporados no solo de florestas tropicais e subtropicais, com base nas respostas indicadoras de tolerância de poucas espécies arbóreas nativas, pode ser limitado pela alta biodiversidade geralmente observada nas florestas tropicais, como é o caso da Mata Atlântica. Como alternativa para superar tal limitação, pode-se direcionar a escolha de espécies a aquelas que possuam funções ecológicas distintas no ecossistema, como por exemplo, as que pertençam a estágios sucessionais distintos, e testá-las quanto à capacidade de acumular e tolerar o estresse causado por metais pesados. Esta abordagem funcional é baseada na premissa de que grupos funcionais distintos são caracterizados por respostas fisiológicas, moleculares e genéticas distintas em relação à capacidade de acumulação de metais (*sensu* Krämer 2010). Assim, além de aumentar a significância dos resultados para o bioma em questão, a abordagem funcional permite ordenar as espécies escolhidas em função de sua capacidade de acúmulo em raízes, caules/ramos e folhas e de seu nível de tolerância a metais pesados. Pode-se, inclusive, comparar

respostas indicadoras de tolerância de espécies com maior potencial acumulador e tolerância às de espécies com menor potencial nesses quesitos.

Resultados obtidos em estudos recentes realizados com espécies nativas da Mata Atlântica apontam para a alta viabilidade da abordagem funcional para a análise de tolerância a estressores ambientais originados de fontes antrópicas. Brandão *et al.* (2017), por exemplo, ao descrever o potencial de tolerância antioxidativa de árvores adultas de nove espécies pioneiras e nove não pioneiras representativas de remanescentes de Mata Atlântica em São Paulo, concluiu que as espécies pioneiras, independentemente do local onde foram coletadas, possuíam características bioquímicas similares e tenderam a ser mais tolerantes ao estresse oxidativo do que espécies não pioneiras. Estas últimas, por sua vez, também se assemelharam no que diz respeito às características bioquímicas. Segundo Favaretto *et al.* (2011), as espécies pioneiras e tolerantes a alta radiação solar tem sido caracterizada por taxas mais altas de fotossíntese e de acúmulo de biomassa do que as espécies secundárias tardias. Dafré-Martinelli *et al.* (2020) observaram que uma espécie pioneira (*Croton floribundus*) e outra secundária inicial (*Piptadenia gonoacantha*), ocorrentes em fragmentos de Mata Atlântica Semidecidual na região metropolitana de Campinas, acumularam significativamente mais metais pesados em suas folhas do que uma secundária tardia (*Astronium graveolens*) incluída em seu estudo. Por outro lado, em estudo recente desenvolvido por Nakazato *et al.* (2020), observou-se ainda que as espécies não pioneiras, em fragmentos florestais de Mata Atlântica apresentaram concentrações dos metais geralmente mais altas nessas espécies do que as espécies pioneiras. Os autores, inclusive, sugeriram que as espécies não pioneiras possam vir a ser bioindicadoras adequadas de metais nesses fragmentos.

III. HIPÓTESES, OBJETIVOS, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COMPOSIÇÃO DA TESE

Com base no referencial teórico apresentado anteriormente, assumimos duas hipóteses gerais:

- 1) Ni e Zn, ao serem incorporados no solo de um fragmento florestal urbano por deposição seca ou úmida ou pela decomposição da serapilheira acumulada, aumentam a fração biodisponível destes para a comunidade vegetal e resultam no aumento das taxas de translocação destes para a parte aérea das árvores e causam alterações no crescimento;
- 2) As espécies arbóreas não pioneiras acumulam mais Ni e Zn do que espécies pioneiras (baseado no estudo de Nakazato *et al.* 2020) quando crescidas em solo contaminado e são mais susceptíveis ao estresse oxidativo (baseado no estudo de Brandão *et al.* 2017 e Esposito *et al.* 2018) induzido pelos mesmos, apresentando menores níveis de defesa antioxidante e mais danos celulares.

Essas hipóteses serão testadas experimentalmente utilizando Ni e Zn, que são marcadores típicos de fontes urbanas de poluição em São Paulo.

Os objetivos propostos para este estudo são:

- 1) Avaliar se haverá aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn após a adição dos mesmos no solo proveniente de um fragmento urbano de Mata Atlântica localizado na cidade de São Paulo;
- 2) Determinar o nível de acúmulo de Ni e Zn adicionados ao solo em raízes, caules/ramos e folhas de plantas jovens de espécies arbóreas pioneiras e espécies não pioneiras nativas de Mata Atlântica paulista;
- 3) Determinar o nível de tolerância das espécies arbóreas ao Ni e Zn adicionados ao solo, por meio da análise de alterações nas taxas de crescimento e produção de biomassa da parte aérea e radicular, no perfil de defesas (antioxidantes: ácido ascórbico, tióis, superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase) e de danos celulares (pigmentos, indicadores de peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio);

- 4) Ordenar as espécies escolhidas em função de sua capacidade de acúmulo de Ni e Zn nos tecidos vegetais acima do solo, de seu nível de tolerância a metais pesados e de ocorrência de danos celulares, a fim de verificar se a ordenação resultante foi determinada em função do grupo funcional ou taxonômico a que pertence cada espécie.

III.1. Síntese do delineamento experimental

Foram realizadas duas etapas experimentais em casa de vegetação com ar filtrado e temperatura regulada por condicionamento do ar, instalada no Instituto de Botânica. Os experimentos foram realizados em esquema fatorial, com blocos inteiramente casualizados, com cinco réplicas por tratamento e N = 05 plantas por réplica de tratamento.

A primeira etapa foi proposta para avaliar a biodisponibilidade de Zn e Ni no solo para plantas de uma espécie pioneira e uma espécie não pioneira e verificar se a adição de um quelante sintético (+EDTA) aumentaria o nível de biodisponibilidade desses metais para as plantas. A segunda etapa foi realizada com tratamentos estabelecidos com base nos resultados obtidos na primeira etapa, utilizando plantas de três espécies arbóreas pioneiras e três a espécies arbóreas não pioneiras.

Em ambas as etapas, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,7 L, contendo solo superficial (camada de 0 a 20 cm de profundidade, após a retirada de toda a camada de serapilheira) coletado no fragmento urbano de Mata Atlântica no PEFI. O solo coletado foi seco ao ar, homogeneizado, destorroado e passado em peneira de 10 mm de malha para retirada de pedras e raízes. Após uma semana de plantio, todas as mudas receberam 100 ml de solução nutritiva contendo macronutrientes e micronutrientes, conforme sintetizado para o tratamento controle (*T_c*) da tabela 1.

Os vasos assim preparados foram mantidos por cerca de 30 dias na casa de vegetação para que as plantas se adaptassem às novas condições de plantio e retomassem o crescimento.

As doses de Ni e Zn nas soluções utilizadas nos tratamentos foram, ao final da aplicação, 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 de solo para Ni e 86 mg.kg de solo para Zn; CETESB, 2016). Como as soluções enriquecidas de Zn e Ni foram preparadas a partir dos sais sulfato de zinco e sulfato de níquel, tomou-se o cuidado de manter as soluções nutritivas balanceadas utilizando diferentes reagentes, discriminados na tabela 1, o que permitiu variar apenas as doses dos metais de interesse. As dosagens finais sugeridas para os elementos nos diferentes tratamentos discriminados na tabela 2 foram alcançadas por meio de três aplicações das soluções contendo, cada uma, 1/3 dessa dosagem final.

Durante todo o período de adaptação e de experimentos, as plantas foram irrigadas com água deionizada, tomando o cuidado de não ultrapassar o limite de capacidade de retenção de água no solo.

Tabela 1. Reagentes utilizados no preparo das soluções com adição de Zn e Ni e soluções nutrientes.

Nutrientes	Sal (fonte de nutriente)
N S	$(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$
Ca P	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)2\text{H}_2\text{O}$
Mg Cl	MgCl_2
K Cl	KCl
Mn S	$\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$
Zn S	$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$
Cu S	$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$
B	H_3BO_3
Mo	H_2MoO_4
Fe	Fe-EDTA
Uréia	N

Tabela 2. Doses em solução aquosa de macro e micronutrientes (incluindo Zn) e Ni aplicadas no solo utilizado no cultivo das plantas incluídas nos diferentes tratamentos em ambas as etapas (mg/L = mg/dm³ de solo).

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn	Ni	Cl	Na
T_C^*	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	0,05	0	220	0
T_{Ni}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	0,05	90	220	0
T_{Zn}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	258	0	220	0
T_{ZnNi}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	258	90	220	0

* Solo florestal com adubação balanceada de macronutrientes e micronutrientes de acordo com Gonçalves *et al.*, (2000) e Cometti *et al.*, (2006), respectivamente.

Após período de adaptação em ambas as etapas as plantas foram submetidas aos tratamentos descritos a seguir para cada etapa.

III .2. Primeira etapa experimental

Nesta etapa, foram utilizadas plantas jovens de duas espécies arbóreas encontradas na Mata Atlântica em São Paulo - *Solanum granulosumleprosum* Dunal (espécie pioneira) e *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (espécie não pioneira), pertencentes às famílias Solanaceae e Rutaceae, respectivamente (figura 2). As plantas das duas espécies foram submetidas aos seguintes tratamentos conforme dosagens discriminadas na tabela 2:

- 1) Tratamento controle com adubação balanceada, referido como T_C ;
- 2) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de Ni, referido como T_{Ni} ;
- 3) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de maior dosagem de Zn, referido como T_{Zn} ;
- 4) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de maiores dosagens de Ni e Zn, referido como T_{NiZn}

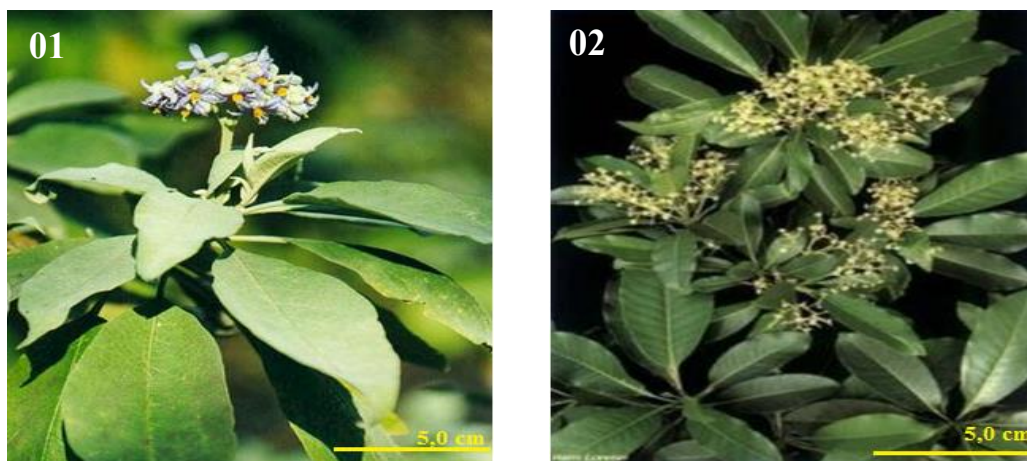


Figura 02. Fotos ilustrativas das espécies arbóreas estudadas, (01) - *Solanum granulosumleprosum* Dunal (espécie pioneira) e *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (espécie não pioneira).

Nesta etapa, propusemos a utilização de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) como quelante sintético, pois têm-se demonstrado que a adição deste aumenta a disponibilidade dos metais presentes no solo (Huang & Cunningham, 1996; Blaylock *et al.* 1997), favorecendo a elevação da concentração desses elementos na parte aérea das plantas, um efeito desejável no presente estudo para determinar o nível de tolerância das espécies arbóreas a Ni e Zn. A dose (tabela 3) de EDTA utilizada nos tratamentos adicionais foi similar à utilizada por Panwar *et al.* (2002). Além dos tratamentos referidos acima as plantas das duas espécies também foram submetidas aos tratamentos adicionais com o acréscimo de EDTA:

- 1) Tratamento controle com adubação balanceada, referido como T_C (Com EDTA);
- 2) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de Ni, referido como T_{Ni} (Com EDTA);
- 3) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de maior dosagem de Zn, referido como T_{Zn} (Com EDTA);
- 4) Tratamento com adubação balanceada, acrescida de maiores dosagens de Ni e Zn, referido como T_{NiZn} (Com EDTA).

Durante todo o período de adaptação e de experimentos, as plantas foram irrigadas com água deionizada, tomando o cuidado de não ultrapassar o limite de capacidade de retenção de água no solo.

O experimento teve a duração de 60 dias, a contar da primeira aplicação das doses estabelecidas. As dosagens finais foram alcançadas por meio de três aplicações das soluções contendo, cada uma, 1/3 dessa dosagem final. Ao final do experimento, as raízes, os caules/ramos e as folhas de cada planta foram separados, secos em estufa (60°C), para obtenção de massa seca.

Tabela 3. Doses em solução aquosa de macro e micronutrientes (incluindo Zn), Ni e EDTA aplicadas no solo utilizado no cultivo das plantas das duas espécies incluídas nos diferentes tratamentos (mg/L = mg/dm³ de solo).

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn	Ni	EDTA	Cl	Na
T_C^*	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	0,05	0	1000	220	0
T_{Ni}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	0,05	90	1000	220	0
T_{Zn}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	258	0	1000	220	0
T_{ZnNi}	200	300	100	154	100	230	0,1	0,05	0,3	0,5	0,001	258	90	1000	220	0

Após a obtenção da massa seca, as amostras de folhas, raízes e caule/ramos das plantas incluídas em cada réplica de tratamento foram reunidas de modo a obter 5 amostras compostas de cada parte da planta, por tratamento e por espécie. As amostras compostas foram moídas em moinho de ágata e submetidas à digestão ácida, utilizando HCl e HNO₃ misturados na proporção de 3:1, respectivamente, por 2 horas a 180 °C (Golia *et al.* 2007). Após digestão, os extratos foram avolumados com 50 ml de água deionizada e armazenados em frascos de polipropileno, até a determinação dos teores de Ni e Zn.

Nas amostras mistas de solo retiradas no início e final de cada tratamento, foi realizada a extração sequencial de Ni e Zn. Para tanto, foi utilizado o protocolo BCR para a extração sequencial dos metais (Janoš *et al.* 2010; Rauret *et al.* 1999), obtendo os seguintes extratos por amostra de solo: solúvel e ligados a carbonatos; ligados a óxidos de ferro e manganês; ligados a matéria orgânica e sulfetos e residual. Detalhes do método de extração serão apresentados no próximo capítulo. Os extratos foram avolumados com 50 ml de água deionizada e armazenados em frascos de polipropileno, até a determinação dos teores de Ni e Zn.

Os teores de Ni e Zn nos extratos vegetais e de solo foram analisados em um equipamento de absorção atômica da marca Perkin Elmer, no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), em colaboração com Dr. Paulo Jorge Marques Cordeiro.

Os resultados desta etapa analítica, apresentados sinteticamente no anexo A, mostraram que as concentrações foliares de Ni e Zn foram mais altas nas mudas das espécies não pioneira e pioneira expostas aos tratamentos com a adição desses elementos em comparação aos controles, com e sem aplicação de EDTA. Esses resultados contribuíram para a definição do delineamento experimental da próxima etapa e nos levaram a optar pela não utilização do quelante sintético (EDTA), simulando de forma mais real a deposição atmosférica de metais nos fragmentos urbanos de Mata Atlântica

III.3. Segunda etapa experimental

Essa etapa foi realizada com mudas de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Mata Atlântica, cultivadas em tubete, as plantas das espécies pioneiras foram adquiridas, em média, com 38 cm de altura, 4 mm de diâmetro do caule e 5 folhas e as plantas das espécies não pioneiras com 21 cm de altura, 3 mm de diâmetro do caule e 5 folhas. Deu-se preferência para espécies pertencentes a famílias predominantes na Mata Atlântica de São Paulo, como Lauraceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Solanaceae e Rutaceae, sendo elas: (*Croton floribundus* Spreng., *Inga sessilis* (Vell.) Mart. e *Rapanea ferrugínea* (Ruiz & Pav.) Mez) e três não pioneiras (*Eugenia uniflora* L., *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer, pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Primulaceae, Myrtaceae, Rutaceae e Lauraceae, respectivamente (figura 3).



Figura 03. Fotos ilustrativas das espécies arbóreas estudadas, (01) - *Croton floribundus* Spreng, (02) *Inga sessilis* (Vell.) Mart. e (03) *Rapanea ferrugínea* (Ruiz & Pav.) Mez) (espécies pioneiras) e (04) *Eugenia uniflora* L., (05) *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e (06) *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer. (espécies não pioneiras).

Após uma semana de plantio, todas as mudas receberam 100 ml de solução nutritiva contendo macronutrientes e micronutrientes, conforme sintetizado para o tratamento controle (T_c) da tabela 2.

A referida solução nutritiva balanceada continha macronutrientes nas concentrações sugeridas para espécies arbóreas nativas por Gonçalves *et al.* (2000) e micronutrientes nas concentrações propostas por Cometti *et al.* (2006).

Os vasos assim preparados foram mantidos por cerca de 30 dias na casa de vegetação para que as plantas se adaptassem às novas condições de plantio e retomassem o crescimento. Após esse período de adaptação, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos conforme dosagem apresentada na tabela 2:

- 1) Tratamento controle com adubação balanceada, referido como T_C
- 2) Tratamento com adubação balanceada para macro e micronutrientes, acrescida de Ni, referido como T_{Ni}
- 3) Tratamento com adubação balanceada para macro e micronutrientes, acrescida de maior dosagem de Zn, referido como T_{Zn} .
- 4) Tratamento com adubação balanceada para macro e micronutrientes, acrescida de maiores dosagens de Ni + Zn, referido como T_{NiZn} .

III.4. Composição da Tese

Os resultados obtidos na segunda etapa experimental serão apresentados e discutidos nos capítulos 2 e 3 adotando-se o formato de artigo científico, apresentando: introdução; material e métodos; resultados e discussão; e conclusões.

No segundo capítulo, investigamos se ocorre um aumento da fração biodisponível de Ni e Zn em solo de remanescentes urbanos de Mata Atlântica enriquecido por esses metais; se espécies pioneiras arbóreas têm maior potencial de absorção de metais pesados do solo e se o aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn resulta no aumento das taxas de translocação destes para a parte aérea das árvores e se ocorre alterações no crescimento.

No terceiro capítulo, investigamos se as espécies que possuem maior potencial de acúmulo de metais pesados do solo apresentam maior potencial de tolerância ao estresse imposto pelos mesmos e menos danos oxidativos. Além disso, as espécies incluídas no estudo foram ordenadas de acordo com seu nível de tolerância, inferido por meio de análises de componentes principais, realizadas com os resultados das variáveis bioquímicas apresentados no capítulo e concentrações absolutas nas folhas e taxas de crescimento relativo das plantas (dados apresentados no capítulo 2).

Finalizamos a Tese apresentando as conclusões gerais do estudo experimental, com base nas hipóteses propostas neste capítulo.

V. BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, J., Sherameti, I., Varma, A.** 2011. Detoxification of Heavy Metals: State of Art. *In*: Sherameti, I., Varma, A. (eds) Detoxification of heavy metals, Springer, pp 1- 34.
- Aguiar, A.; Ferraz, A.** 2007. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Química Nova*, v.30, p.623-628, 20.
- Alloway, B.J.,** 2013. Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, third edition, Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341
- Amaral Sobrinho, N.M.B.; Barra, C.M. & LÃ, O.R.** 2009. Química dos metais pesados nos solos. *In*: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R. (ed.). Química e mineralogia do solo: Aplicações. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Parte II. v.2. p.249-312. and antioxidative stress defense. *Plant Science*, v.182, p.29-41.
- Aničić, M., Spasić, T., Tomašević, M., Rajšić, S., Tasić, M.,** 2011. Trace elements accumulation and temporal trends in leaves of urban deciduous trees (*Aesculus hippocastanum* and *Tilia* spp.). *Ecol. Indic.* 11, 824–830.
- Apel, K., Hirt, H.,** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 55, 373_399.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227_1238.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., Kizek, R.,** 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review, *Environ. Chem. Lett.*, 6, 189-213.
- Baier M, Kandlbider A, Golldack D & Josef-Dietz K.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.,** 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113-123.
- Bashir, K., Takahashi, R., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K.,** 2013. The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects, *Front. Plant Sci.*, 4 (2013) 1-7.
- Bhaduri AM, Fulekar MH.** (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 11: 55–69.
- Bhattacharjee, S.** 2010. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. *In*: Gupta, S.D., Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, p.1-30.

- Birani, S. M., Fernandes, A. R., de Souza Braz, A. M. S., Pedroso, A. J. S., Alleoni, L. R. F.** 2015. Available contents of potentially toxic elements in soils from the Eastern Amazon. *Chemie der Erde - Geochemistry* 75, 143-151
- Blaylock, M.J.; Salt, D.E.; Dushenkov, S.; Zakharova, O.; Gussman, C.; Kapulnik, Y.; Ensley, B.D. & Raskin, I.** 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 31:860-865.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V.,** 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179_194.
- Boominathan, R., Doran, P. M.,** 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*, *New Phytol.*, 156, 205 – 215.
- 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
- Bray, E.A., Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158 –1203.
- Bussotti, F.,** 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Glob. Change Biol.* 14, 2727–2739.
- Calatayud V, García-Breijo FJ, Cervero J, Reig-Armiñana J, Sanz MJ.** 2011. Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:1131–38.
- 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.
- Cetesb,** 2016. Relatório de qualidade ambiental do estado de São Paulo. Valores Orientadores para Solo e Água Subterrânea no Estado de São Paulo. (acessado 26.08.2020).
- Cheng FY, Burkey KO, Robinson JM, Booker, FL.** 2007. Leaf extracellular ascorbate in relation to O₃ tolerance of two soybean cultivars. *Environ Pollut* 150:355-62.
- Colpas, G. J., Hausinger, R. P.,** 2000. In vivo and in vitro kinetics of metal transfer by the *Klebsiella aerogenes* urease nickel metallochaperone, UreE, *J. Biol. Chem.*, 275, 10731 – 10737.
- Cometti, N.N.; Furlani, P.R.; Ruiz, H.A.; Fernandes Filho, E.** 2006. Soluções Nutritivas: formulação e aplicações. In: MANLIO SF. *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. cap. 4, p. 89-114.
- Culotta, V.C.** 2001. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current Topics in cellular regulation*, 36: 117- 132.

- D'Autréaux, B.; Toledano, M.B.** 2007. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.8, p.813-824.
- Dabrowska, G. et al.** 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia*, v.49, n.1, p.7-17.
- Dafré-Martinelli, M., Figueiredo, A.M.G., Domingos, M.** 2020. Trace element leaf accumulation in native trees from the remaining Semideciduous Atlantic Forest in Brazil. *Atmospheric Pollution Research* 11 (5): 871-879.
- Dalir, N., Khoshgoftarmanesh, A.H.,** 2015. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine. *J. Plant Physiol.* 184, 8–14.
- Deng, T.H.B., Cloquet, C., Tang, Y.T., Sterckeman, T., Echevarria, G., Estrade, N., Morel, J.L., Qiu, R.L.,** 2014. Nickel and zinc isotope fractionation in hyperaccumulating and nonaccumulating plants. *Environ. Sci. Technol.* 48 (20), 11926–11933.
- Dinakar, C. et al.** 2012. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*, v.182, p.29-41.
- Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G & Forti MC.** 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: DC Bicudo, MC Forti & 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.
- Douchkov D. et al.,** 2005. Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco, *Plant Cell Environ.* 2005, 28, 365 – 374.
- Dubey, R.S,** 2011. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, Chap.9, p.178-203.
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., Thauer, R.K.,** 1998. Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 749–758.
- Esposito, M.P., Nakazato, R.K., Pedroso, A.V., Lima, M.L., Figueiredo, M.A., Diniz, A.P., Domingos, M.,** 2018. Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. *Sci. Total Environ.* 625, 382–393.
- Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H. & Furriel, R.P.M.** 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70: 20–28.
- Feng Z, Kobayashi K.** 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis *Atmos Environ* 43:1510–19.

- Foyer, C.H., Noctor, G.,** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2_18.
- França, E.J. De, Nadai Fernandes, E.A., Bacchi, M.A., Tagliaferro, F.S., Saiki, M.,** 2007. Soil-leaf transfer of chemical elements for the Atlantic Forest. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 271, 405–411.
- Fuhrer J, Booker F.** **Ecological issues related to ozone: agricultural issues.** 2003. *Environ Int* 29:141-54.
- Fuhrer J.** 2009. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. *Naturwissenschaften* 96:173–94.
- Gadjev, I.** 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v.270, p.87-144.
- Gajewska, E., Skłodowska, M.,** 2005. Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. *Physiol. Plantarum* 27 (3), 329–340.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., Mazur, J.,** 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol. Plant.* 50 (4), 653–659.
- Gill, S.S. & Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 12: 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.
- Gonçalves, J.L.M., Santarelli, E.G., Moraes Neto, S.P., Manara, M.P.** 2000. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: Gonçalves, J.L.M.; Benedetti, V. (Eds.) *Nutrição e fertilização florestal*. Piracicaba: IPEF, cap.11, p.326.
- Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R.,** 2001. Nickel and copper tolerance in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiol. Plant.* 113, 507–514.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA.** 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481–94.
- Guala, S.D., Vega, F.A., Covelo, E.F.** 2010. The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecological Modelling* 221, 1148–1152.
- Gupta, D. K., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Mishra, S., Srivastava, S., Dwivedi, S., Maathuis, F. J. M.** 2007. Growth and biochemical parameters of *Cicer arietinum* L. grown on amended fly ash. *Environmental Monitoring and Assessment* 134, 479–487.
- Guzmán-Morales, J., Morton-Bermea, O., Hernández-Álvarez, E., Rodríguez-Salazar, M.T., García-Arreola, M.E., Tapia-Cruz, V.,** 2011. Assessment of atmospheric metal pollution in the urban area of Mexico City, using *Ficus benjamina* as biomonitor. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 495–500.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 2007. Free Radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press. pp. 1 – 851.
- Hansch, R., Mendel, R.R.** 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12. 259-266.
- Hao, F., Wang, X., Chen, J.**, 2006. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Sci.* 170, 151–158.
- Huang, J.W. & Cunningham, S.D.** 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134:75-84.
- Iriti M, Faoro F.** 2008. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut* 187: 285–301.
- 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.
- Jesus.T. A** (2008). Avaliação do histórico de impactos antrópicos na bacia de drenagem do Lago das Garças (São Paulo-SP), durante o século XX, com base nos estoques de nutrientes, metais pesados e compostos orgânicos em sedimento lacustre. Tese, Sao Paulo, Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de São Carlos, pp.125.
- Jinmei, B., Xueping, L.,** 2014. Heavy metal pollution in surface soils of Pearl River Delta, China. *Environ. Monit. Assess.* 186, 8051–8061.
- Juknys, R., Vitkauskait, G; Račait'; Venclovien, J.** 2012. “The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring,” *Open Life Sciences*, vol. 7, no. 2, pp. 299–306.
- Kabata-Pendias.** 2011. Trace elements in soils and plants. 4th ed. Wyd. Nauk PWN, Warsaw, 400p.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H.,** 1999. Biogeochemistry of Trace Elements. PWN, Warszawa, Poland, pp. 398 In Polish.
- Karuppanapandian, T., Moon, J-C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W.,** 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *AJCS* 5, 709_725.
- Kasprzak, K.S., Sunderman Jr., F.W., Salnikow, K.,** 2003. Nickel carcinogenesis. *Fund Mol. Mech. Mut.* 533 (1–2), 67–97.
- Kovalchuk, I.** 2010. Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.31-44.
- Krämer, U.,** 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 517–534.

- Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A., 1996.** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379, 635–638.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., 2001.** Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.* 52, 2291–2300.
- Lester, J.N., 1987.** Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes. Flórida: CRCn Press. 195p
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K. 1997.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Locato V, Pinto MC, Paradiso A, Gara L. 2010.** Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses. In: Gupta SD. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers. p.45-64.
- Lopes, M., Ribeiro Dos Santos, A., Zuliani Sandrin Camargo, C., Bulbovas, P., Giampaoli, P., Domingos, M., 2015.** Soil chemical and physical status in semideciduous Atlantic Forest 28.
- Maeda H.; Dellapenna, D. 2007.** Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, v.10, p.260-265.
- Meers, E., Ruttens, A., Gebelen, W., Vangronsveld, J., Samson, R., Vanbroekhoven, K., Vandegehuchte, M., Diels, L., Tack, F.M.G. 2005.** Potential use of the plant antioxidant network for environmental exposure assessment of heavy metals in soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 120, 243–267.
- Milner, M.J; Seamon J.; Craf, E., Kochian, L.V., 2013.** Transport properties of members of the ZIPfamily in plants and their role in Zn and Mn homeostasis, *J. Exp. Bot.*, 64. 369-381.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant in Science*, v.9, p.405-410,
- Montalvo, D., Degryse, F., da Silva, R.C., Baird, R., McLaughlin, M.J., 2016.** Agronomic Effectiveness of Zinc Sources as Micronutrient Fertilizer, in: D.L. Sparks (Ed.) *Advances in Agronomy*, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, 2016, pp. 215-267.
- Moore, J.W., Ramamoorthy, S. 1984.** Heavy metals in natural waters. New York: Springer-Verlag, 1984. 328p.
- Morgan PB, Mies TA, Bollero GA, Nelson RL, Long SP. 2006.** Season-long elevation of ozone concentration to projected 2050 levels under fully open-air conditions substantially decreases the growth and production of soybean. *New Phytol* 170:333–43.
- Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P., 2003.** Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 239–261.

Mylona, P.V.; PolidoroS, A.N. 2010. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers. Cap.6, p.101-128.

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199–216.

Naidu, R., Krishnamurti, G.S.R., Bolan, N.S., Wenzel, W., Megharaj, M., 2001. Heavy Metal Interactions in Soils and Implications for Soil Microbial Biodiversity, in: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Metals in the environment, analysis by biodiversity*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 401-403

Nakazato, R. K., Lourenço, I.S., Esposito, M.P., Lima, M.E.L., Campos, R.O.A., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M. 2020. Bioavailability of trace metals at the plant-soil- interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by air pollution sources. *Submetido a Science of the Total Environment*.

Nali C, Pucciariello C, Mills G, Lorenzini G. 2005. On the different sensitivity of white clover clones to ozone: physiological and biochemical parameters in a multivariate approach. *Water Air Soil Pollut* 164:137–53.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249_279.

Oksanen E, Pandey V, Pandey AK, Keski-Saari S, Kontunen-Soppela S, Sharma C. 2013. Impacts of increasing ozone on Indian plants *Environ Pollut* 177:189-200

Oliveira, F. C.; Mattiazzo, M. E. 2001. Mobilidade de metais pesados em um Latossolo Amarelo Distrofido tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-acucar. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.58, n.4, p.807-812

Page, V., Weisskopf, L., Feller, U., 2006. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol.* 171 (2), 329–341.

Palmer, C.M, Guerinot, M.L., 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Nat. Chem. Biol.*, 5. 333-340.

Palmgren, M.G.; Clemens, S., Williams, L.E., Kraemer, U., Borg, S.; Schjorring J.K., Sanders, D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions, *Trends Plant Sci.*, 13 464-473.

Panwar, B.S., Ahmed, K.S., Mittal, S.B. 2002. Phytoremediation of nickel-contaminated soils by Brassica species. *Environment, Development and Sustainability* 4, 1-6.

Paoletti, E., Schaub, M., Matyssek, R., Wieser, G., Augustaitis, A., Bastrup-Birk, A.M., Bytnerowicz, A., Gunthardt-Goerg, M.S., Muller-Starck, G., Serengil, Y., 2010. Advances of air pollution science: from forest decline to multiple-stress effects on forest ecosystem services. *Environ. Pollut.* 158, 1986–1989.

- Pierangeli, M.A.P.; Guilherme, L.R.G.; Curi, N.; Silva, M.L.N.; Lima, J.M.; Costa, E.T.S.** 2005. Efeito do pH na adsorção e dessorção de cádmio em Latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.523-532.
- Rai, P.R.** 2016. Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129(2016)120–136.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F.** 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it and what makes them so interesting? *Plant Science* 180, 169–181.
- 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
- Ren, F.C.; Liu, T.C.; Liu, H.Q.; Hu, B.Y.;** 1993. Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one- year old American ginseng plants, *J. Plant Nutr.*, 16 (1993) 393-405.
- Riesen O., Feller, U.,** 2005. Redistribution of nickel, cobalt, manganese, zinc and cadmium via the phloem in young and in maturing wheat, *J. Plant Nutr.* 2005, 28, 421 – 430.
- Rieuwerts J. S.; Ashnore, M. R.; Farago, M. E.; Thornton, I.** 2006. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Science of the total Environment*, v.366, p.64–875.
- Rieuwerts, J.S.,** 2007. The mobility and bioavailability of trace metals in tropical soils: A review. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 19, 75–85.
- Rossini Oliva, S., Mingorance, M.D.,** 2004. Study of the impact of industrial emission on the vegetation grown around Huelva (south of Spain) City. *J. Atmos. Chem.* 49, 291–302.
- Salama, Z.A., El-Fouly, M., Lazova, G., Popova, L.P.,** 2006. Carboxylating enzymes and carbonic anhydrase functions were suppressed by zinc deficiency in maize and chickpea plants, *Acta Physiol. Plant.*, 28 (2006) 445-451.
- Salt, D.E.; Prince, R.C.; Pickering, I.J. and Raskin,** 1995. I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology*, vol. 109 p. 1427-1433.
- Sanchez-Lopez, Gonzalez R.c, Gonzalez-Chave. M.C.A, Rosas-Saito G.H; Vangronsveld. J,** 2015. Phytobarrriers: Plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. *Environmental Pollution*, 33e 42.
- Santos, F. S.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Mazur, N.** 2006. Em *Nutrição Mineral de Plantas*; Fernandes, M. S., ed.; SBCS: Viçosa, cap. 16.
- Sarma, H.,** 2011. Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 118-138.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Tsigaridas, K.,** 2011. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environ. Pollut.* 159, 3560–70.

Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53 (2), 257–277.

Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., M. Aslam, and E. Pinelli,2014. “Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants,” *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 232, pp. 1–44.

Song, Y., Maher, B.A., Li. F., Wang, X., Sun, X. & Zhang, H. 2015. Particulate matter deposited on leaf of five evergreen species in Beijing, China: Source identification and size distribution. *Atmospheric Environment* 105: 53-60.

Szarka, A.; Tomasskovics, B.; Bánhegyi, G. 2012.The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 4458–4483.

Tausz M, Wonisch A, Grill D, Morales D, Jiménez MS. 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 387 (4): 1505-510.

Tausz, M., Landmesser, H., Posch, S., Monschein, S., Grill, D. & Wienhaus, O. 2007. Multivariate patterns of antioxidative and photoprotective defence compounds in spruce needles at two central European forest sites of different elevation. *Environ Monit Assess* 128:75–82.

Tavares, T.M., Carvalho, F.M. 1992. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova*, 15, 2.

Tomašević, M., Aničić, M., Jovanović, L., Perić-Grujić, A., Ristić, M., 2011. Deciduous tree leaves in trace elements biomonitoring: A contribution to methodology. *Ecol. Indic.* 11, 1689–1695.

Ueda Y, Uehara N, Sasaki H, Kobayashi K, Yamakawa T. 2013. Impacts of acute ozone stress on superoxide dismutase (SOD) expression and reactive oxygen species (ROS) formation in rice leaves. *Plant Physiol Biochem.*

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, p.190-198.

Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. 2001. Principles of Ecotoxicology. 2 ed. T&F STM, London. p. 309.

Wang, C.; Zhang, S. H.; Wang, P. F.; Hou, J.; Zhang, W. J.; Li, W.; Lin, Z. P.; 2009. *Chemosphere*, 75, 1468

Wang, R.-H., Zhu, X.-F., Qian, W., Yu, Y.-C., Xu, R.-K., 2015. Effect of pectin in adsorption of Cu (II) of two variable-charge soils from southern China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 19687–19694.

Wang, R.-H., Zhu, X.-F., Qian, W., Zhao, M.-H., Xu, R.-K., Yu, Y.-C., 2016. Adsorption of Cd (II) by two variable-charge soils in the presence of pectin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 12976–12982.

White P.J., Whiting S.N., Baker A.J.M., Broadley M.R., 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol.*, 153, 201-207.

Willekens, H., Inze, D., Van Montagu, M., Van Camp, W., 1995. Catalases in plants. *Mol. Breeding* 1, 207_228.

IV. CAPÍTULO 2

Níquel e Zinco biodisponíveis em solo poluído, altera o crescimento de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica

Solange E. Brandão* ¹, Geane Martins ¹, Matheus Casarini¹, Mirian C. S. Rinaldi ¹, Marisa Domingos ¹

1- Instituto de Botânica, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, Brazil

Níquel e Zinco biodisponíveis em solo poluído, altera o crescimento de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica

Resumo

Os ecossistemas florestais encontram-se cada vez mais fragmentados e afetados por poluentes, como partículas atmosféricas. Os metais pesados adsorvidos às partículas podem ser retidos sobre as copas das árvores em ecossistemas florestais e incorporados no solo, via deposição ou por meio da decomposição da serapilheira. Uma vez disponível no solo estes podem ser absorvidos pelas plantas pela absorção radicular. Assim, o presente estudo foi proposto com o objetivo de testar experimentalmente as seguintes hipóteses: a deposição atmosférica de material particulado enriquecido de Ni e Zn aumenta a fração biodisponível destes no solo; as espécies arbóreas não pioneiras acumulam mais Ni e Zn do que as pioneiras; o aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn resulta no aumento das taxas de translocação destes para a parte aérea das árvores e alterações de seu crescimento. O experimento foi realizado com três espécies arbóreas pioneiras e três não pioneiras nativas da Mata Atlântica. Estas foram crescidas em solo coletado em fragmento urbano de Floresta por 90 dias, com adubação balanceada (controle) e em solo enriquecido de Ni, Zn e Ni+Zn, alcançando concentrações três vezes mais altas do que as propostas pela CETESB para prevenção de riscos associados à contaminação de solos (30 e 86 mg.kg de solo para Ni e Zn, respectivamente). Foram medidos no início e final do experimento altura, diâmetro do caule e número de folhas. Ao final do experimento, foram determinadas a biomassa de folhas, caules e raízes e concentrações de Ni e Zn nas frações solúveis, trocáveis e ligados a carbonatos (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4) do solo e nas raízes, caules/ramos e folhas. Foram calculados: razões de concentração entre tratamentos com acréscimo de metais e respectivos controles para solo e plantas, índices de translocação (IT) e taxas de crescimento relativo (TCR). Os resultados mostraram que as concentrações desses metais aumentaram significativamente nas frações biodisponíveis (F1, F2 e F3) do solo, nos tratamentos em que houve adição destes. Os maiores teores de Ni e Zn nas plantas foram encontrados nos tratamentos com o acréscimo destes. O conteúdo absoluto de Ni e Zn nas plantas das espécies avaliadas neste estudo refletiu diretamente o nível no solo desses metais nas formas disponíveis, sendo mais alto em espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras. Índices de translocação não foram similares entre espécies pioneiras ou entre não pioneiras e houve a translocação apenas de Ni para a parte aérea, nos tratamentos com excesso desse metal.

Palavras chaves: Metais pesados, biodisponibilidade, espécies pioneiras e não pioneiras, acúmulo

IV.1. INTRODUÇÃO

As florestas fragmentadas em áreas urbanas vêm sendo afetadas por uma diversidade de poluentes (Ferreira *et al.* 2017). 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 (Kalaierasan *et al.* 2018). A intensificação das atividades industriais, agrícolas e da urbanização tem aumentado a poluição dos solos por metais pesados (Kabata-Pendias 2011; Keshavarzi e Kumar, 2019 a), tais como cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn). O termo metal pesado tem sido adotado para um grupo de metais e metaloides associados com poluição e toxidez (Amaral Sobrinho *et al.* 2009). Estes estão naturalmente presentes nos solos em baixas concentrações por consequência dos processos pedogênicos (Alloway 2013) e de atividades vulcânicas (Paz-Ferreiro *et al.* 2014). A queima de combustíveis fósseis pela frota veicular, em áreas urbanas, é uma fonte particularmente importante de poluição ambiental por metais pesados, incluindo Ni e Zn (Kabata-Pendias 2011).

Os metais pesados, que entram no ambiente a partir de fontes naturais e antropogênicas, criam riscos potenciais significativos para os ecossistemas naturais, devido à persistência em longo prazo no ambiente, bioacumulação e efeitos de toxicidade aguda e crônica (Wu *et al.* 2018). A diminuição na entrada de metais nem sempre resulta em uma rápida diminuição do seu conteúdo nos solos, porque sob certas condições ambientais esses metais são firmemente fixados ao solo. Portanto, solos contaminados com metais podem ser considerados uma fonte de risco potencial e real ao meio ambiente (Motuzova *et al.* 2014).

De uma maneira geral, a movimentação dos metais pesados no ecossistema é condicionada por atributos químicos e físicos do solo e pela natureza química dos metais, que interferem nas reações de adsorção/dessorção, precipitação/dissolução, complexação, quelação e oxi-redução (Oliveira e Mattiazzo 2001). Dentre os atributos do solo que interferem na mobilidade dos metais, destacam-se o pH, o teor de matéria orgânica, potencial redox, tipologia e textura do solo e ação dos exsudatos

liberados pelas raízes, que facilitam a biodisponibilidade (Rieuwerts *et al.* 2006). O aumento do pH resulta no aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) pela desprotonação dos grupamentos ácidos da matéria orgânica e da superfície dos óxidos, na formação de hidróxidos, carbonatos e fosfatos insolúveis com os metais pesados e na complexação mais efetiva pela matéria orgânica (Wang *et al.* 2015 para Cu; Wang *et al.* 2016 para Cd). As mudanças nas condições, como acidificação e / ou redução da oxidação e diminuição de matéria orgânica no solo, podem levar ao aumento na mobilidade dos metais (Motuzova e Karpova 2013).

Os metais nas formas solúveis e trocáveis são considerados prontamente móveis e disponíveis para planta. Metais precipitados com carbonatos, retidos em óxidos de Fe, Mn e Al ou complexados pela matéria orgânica são considerados menos disponíveis (Costa *et al.* 2006). Geralmente, a fração biodisponível desses elementos no solo é mais alta em solos ácidos, como os que ocorrem na região tropical. Entretanto, Rieuwerts (2007), em trabalho de revisão, acrescentou que os modelos preditivos da mobilidade e biodisponibilidade de metais pesados em solo, que foram propostos para as regiões de clima temperado, podem não ser aplicáveis nos trópicos, devido a diferenças na química do solo. Esse alerta reforça a necessidade de mais estudos sobre o tema nos trópicos, inclusive no Brasil, onde a degradação dos ecossistemas naturais tem sido crescente. A Mata Atlântica, que possui alta riqueza de espécies e taxas de endemismo, está entre os biomas tropicais potencialmente afetados pela deposição de metais pesados, visto que uma parte substancial deste bioma está reduzida a pequenas ilhas de vegetação associadas a uma matriz de áreas degradadas, pastagens, campos agrícolas e silviculturais e áreas urbanas (Joly *et al.* 2014).

As árvores desempenham papel preponderante na circulação de metais pesados nos ecossistemas florestais, por funcionarem como anteparos ao material particulado atmosférico enriquecidos de metais (Sánchez-López *et al.* 2015; Song *et al.* 2015; Rai 2016) e por sua capacidade de absorvê-los naturalmente do solo (Naidu *et al.* 2001; Sarma *et al.* 2011). O acúmulo de metais

pesados nos tecidos foliares das árvores confirma, assim, sua biodisponibilidade no solo (França *et al.* 2007), embora haja diferenças marcantes entre as espécies vegetais na habilidade de absorver e acumular metais pesados (Santos *et al.* 2006). Árvores com maior potencial acumulador são boas alternativas para indicação do nível de contaminação de solos por metais pesados e até mesmo para sua remediação (Guzmán-Morales *et al.* 2011; Tomašević *et al.* 2011).

Tendo em vista que os solos da Mata Atlântica no sudeste brasileiro são ácidos (Lopes *et al.* 2015), que os fragmentos urbanos desse bioma vêm sendo afetados pela deposição de material particulado enriquecido de Ni e Zn proveniente da emissão veicular (Domingos *et al.* 2002; Nakazato *et al.* 2020) e que as concentrações foliares de metais são maiores em árvores adultas não pioneiras do que em árvores pioneiras de fragmentos de Mata Atlântica em locais poluídos (Nakazato *et al.* 2020), este estudo teve por objetivos avaliar experimentalmente se: 1) a adição de Ni e Zn no solo proveniente de um fragmento urbano de Mata Atlântica aumenta a fração biodisponível no solo; 2) os índices de translocação e o potencial acumulador destes metais diferem entre espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras; 3) há alterações nas taxas de crescimento nessas espécies em resposta ao excesso desses metais no solo. Três hipóteses foram testadas: 1) a deposição de Ni e Zn aumenta a fração biodisponível destes metais no solo de remanescentes urbanos do bioma Mata Atlântica; 2) as espécies arbóreas não pioneiras acumulam mais Ni e Zn do que espécies pioneiras quando crescidas em solo contaminado; 3) o aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn resulta no aumento das taxas de translocação destes metais para a parte aérea das árvores e alteram seu crescimento.

IV.2. MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Instituto de Botânica, localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI). Este local contém um importante fragmento urbano de Mata Atlântica, de onde o solo foi retirado para realização do experimento.

O experimento foi realizado com seis espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, sendo três pioneiras (*Croton floribundus* Spreng., *Inga sessilis* (Vell.) Mart. e *Rapanea ferrugínea* (Ruiz & Pav.) Mez) e três não pioneiras (*Eugenia uniflora* L., *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer) pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Primulaceae, Myrtaceae, Rutaceae e Lauraceae, respectivamente. As plantas utilizadas foram obtidas em tubetes no viveiro de mudas da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado em Paraibuna, SP. As plantas pioneiras foram adquiridas, em média, com 38 cm de altura, 4 mm de diâmetro do caule e 5 folhas e as plantas não pioneiras com 21 cm de altura, 3 mm de diâmetro do caule e 5 folhas. Essas plantas foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,7 L, contendo solo superficial (camada de 0 a 20 cm de profundidade, excluindo a camada de serapilheira) coletado no fragmento florestal do PEFI. O solo foi seco ao ar, homogeneizado, destorroado e passado em peneira de 10 mm de malha para retirada de pedras e raízes. Antes do plantio, esse solo foi mantido com umidade de 80% da capacidade de campo, por 15 dias. Após uma semana de plantio, todas as plantas receberam 100 ml de solução nutritiva contendo macronutrientes e micronutrientes, conforme sintetizado para o tratamento controle na tabela 2 apresentada no Capítulo 01 (Pag.21).

Após passarem por um período de adaptação de 1 mês, foram submetidas aos seguintes tratamentos aplicados ao solo contido nos vasos: 1) controle com adubação balanceada; 2) adubação balanceada acrescida de maior dosagem de Zn; 3) adubação balanceada acrescida de Ni; tratamento com adubação balanceada acrescida de maiores dosagens de Ni e Zn. Esses tratamentos foram referidos como T_C (tratamento controle adubado), T_{Zn} (tratamento zinco), T_{Ni} (tratamento níquel) e T_{ZnNi} (tratamento níquel+zinco) para apresentação dos resultados. As doses de Ni e Zn nas soluções utilizadas nos tratamentos 2 a 4 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 de solo para Ni e 86 mg.kg de solo para Zn; CETESB, 2014). As doses determinadas em cada tratamento (Tabela 2 na pag. 18) foram impostas de forma fracionada por meio de três aplicações

semanais. O experimento teve a duração de 90 dias, a contar da primeira aplicação das doses estabelecidas e foi realizado em esquema fatorial 6 x 4 (seis espécies x quatro tratamentos de solo), com cinco réplicas por tratamento e cinco plantas por réplica de tratamento, totalizando 100 plantas para cada espécie.

IV.2.2 Análises químicas e físicas em amostras de solo

Foram separadas 5 amostras do solo antes da imposição dos tratamentos, que foram secas ao ar, passadas em peneira de 2 mm e encaminhadas para o laboratório do Departamento de Solos da UNESP de Botucatu, para caracterização de parâmetros químicos e físicos, conforme descritos por Raij *et al.* (2001). O solo apresentou um pH médio (5.3), altos teores para solos florestais de P_{resina} (14 mg/dm³), Ca (66 mmolc/dm³), Mg (11 mmolc/dm³), S (27 mg/dm³), Cu (3.4 mg/dm³), Mn (10.3 mg/dm³), Zn (14.2 mg/dm³), B (58 mg/dm³) e Fe (57 mg/dm³). O solo ainda apresentou um teor considerado alto de matéria orgânica (40 g/dm³) e uma alta capacidade de troca de cátions (109 g/dm³). O teor total de areia no solo foi de 537g/kg (areia fina: 110 g/kg; areia grossa: 427 g/kg) e de argila foi de 380 g/kg, apresentando, assim uma textura argilosa.

Ao final do experimento, foram retiradas 120 amostras mista por réplica de tratamento para cada espécie, que foram submetidas a extração sequencial de Ni e Zn, utilizando o protocolo do Programa de Padrões, Medição e Teste da CE (denominado Teste BCR) (Janoš *et al.* 2010; Rauret *et al.* 1999). As concentrações de Ni e Zn nas amostras de solo foram determinadas em quatro frações: solúveis, trocáveis e ligados a carbonatos (F1); ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) residual (F4). As frações F1, F2, F3 e F4 foram extraídas por meio da preparação sequencial de 4 extratos utilizando 1 g de solo. F1 foi extraída com 40 mL de ácido acético (0,11M), F2 com 40 ml de cloridrato de hidroxilamina (0,5 M), F3 com 10 ml de peróxido de hidrogênio (30%) e, após a redução a 1 ml, com 40 ml de acetato de amônio (1 M) e F4 com 8 ml de água régia (HCL:HNO₃, 3:1). A extração de cada fração ocorreu por agitação por 16 horas, seguida

de centrifugação por 20 min. em 10.000 RPM. O sobrenadante foi retirado, filtrado e adicionado ácido nítrico (2N) afim de ajustar o pH de 2,0. Na fração residual (F4), após adicionar a água régia, as amostras foram aquecidas a 130°C em bloco digestor por 5 horas, para digestão total da amostra. Os teores de Ni e Zn nos extratos de solo foram analisados por espectroscopia de plasma indutivamente acoplado de emissão óptica (ICP-OES), utilizando equipamento da marca Varian, modelo 720, disponibilizado pelo Laboratório de Reciclagem, Tratamento de Resíduos e Extração (LAREX) da Politécnica/USP. Curvas analíticas foram preparadas com padrão externo da marca Perkin Elmer. A faixa de concentração utilizada para obtenção das curvas para ambos os elementos foi de 100ppb a 1000 ppb. Os limites de detecção foram 0,001mg/L para Zn e 0,002mg/L para Ni. As amostras foram diluídas quando necessário. A validação da metodologia foi feita a partir da análise de material de referência certificada (SRM 1515 - Apple Leaves).

IV.2.3 Análises químicas em amostras vegetais

Ao final do experimento, as raízes, os caules/ramos e as folhas de cada planta foram separados, secos em estufa (60°C), para obtenção de massa seca. Após pesagem para determinação da massa seca, as amostras de folhas, raízes e caule/ramos das plantas de cada réplica de tratamento foram reunidas de modo a obter 5 amostras compostas de cada órgão da planta, por tratamento e por espécie. As amostras compostas foram moídas em moinho de ágata e submetidas à digestão ácida em forno de microondas fechado (CEM-Mars-Xpres), utilizando 5 ml HNO₃, no Centro de Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA- USP). Após digestão, os extratos foram avolumados com 10 ml de água deionizada e armazenados em frascos de polipropileno, até a determinação dos teores de Ni e Zn, utilizando o mesmo método analítico descrito no item anterior.

O acúmulo de Ni e Zn em folhas, caule/ramos e raízes foi determinado por meio da estimativa das concentrações absolutas (concentrações*biomassa seca de cada órgão por planta).

A partir das concentrações absolutas (C_a) obtidas nos diferentes órgãos das plantas, foi calculado um índice de translocação (IT), utilizando a seguinte fórmula proposta por Chanu and Gupta (2016):

$$IT = (C_a \text{ caules_ramos} + C_a \text{ folhas}) / C_a \text{ raízes}$$

$IT > 1$ indica que o elemento foi acumulado em maior proporção na parte aérea do que nas raízes das plantas.

IV.2.4. Medidas de Crescimento e biomassa

Foram realizadas medidas de altura e diâmetro da base do caule e foi contado o número de folhas no caule principal de cada planta por réplica de tratamento.

Os resultados dessas variáveis de crescimento, assim como da biomassa seca de cada órgão das plantas, foram expressos na forma de taxa de crescimento relativo (TCR), utilizando os valores obtidos no início e final do experimento, com base na equação proposta por Benincasa (1988):

$$TCR = [(Ln_2 - Ln_1) / (t_2 - t_1)]$$

Onde: Ln_2 e Ln_1 = Logaritmo natural do valor final e inicial; t_2 e t_1 = tempo final e tempo inicial em dias de exposição.

Foi calculada, também, a razão de biomassa entre raízes e parte aérea (folhas + caules/ramos).

IV.3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das concentrações de Ni e Zn nas frações do solo e concentrações absolutas nos diferentes órgãos das plantas foram apresentados de duas maneiras, visando à visualização e comprovação das tendências de efeitos dos diferentes tratamentos: 1) gráficos descritivos utilizando valores médios de concentração; 2) razões de concentração entre os valores encontrados nos tratamentos T_{Ni} , T_{Zn} ou T_{NiZn} e valores encontrados no controle (T_C).

As diferenças significativas nas razões de níquel e zinco no solo entre tratamentos e respectivos controles foram identificadas utilizando a One ANOVA. Foram agrupadas nessas análises os resultados obtidos no solo de cultivo das seis espécies, tendo em vista que não foram observadas variações nas concentrações dos metais nas frações do solo induzidas pelas espécies.

As diferenças significativas nas razões de Zn e Ni nos diferentes órgãos das plantas de cada espécie entre tratamentos e respectivos controles foram identificadas por two-way ANOVA (Fator 1: Espécies e Fator 2: Órgãos da planta), considerando os efeitos significativos de cada fator e a interação entre eles, seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Tukey).

As diferenças significativas para o índice de translocação de Zn e Ni também foram identificadas por two-way ANOVA (Fator 1: Tratamentos e Fator 2: Espécies), considerando os efeitos significativos de cada fator e a interação entre eles, seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Tukey).

As taxas de crescimento relativo (TCR) foram identificadas utilizando a One way ANOVA, seguida de teste de comparações múltiplas.

Em todos os casos, quando necessário, os dados foram transformados em log10 para atender aos requisitos da ANOVA (distribuição normal e igualdade de variâncias).

IV.4. RESULTADOS

A somatória das concentrações de Ni e Zn nas quatro frações do solo foi significativamente mais alta nos tratamentos com o acréscimo desses metais do que nos demais tratamentos (Figura 1).

A partir da estimativa de razões de concentração entre tratamentos com adição de metais e tratamento controle para as diferentes frações, foi possível destacar o nível de biodisponibilidade de Ni e Zn, quando em excesso no solo (Tabela 2). Essas estimativas indicaram que Ni foi encontrado na maior proporção ligado a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (fração 2) no tratamento com

excesso deste no solo ($T_{Ni}/T_C = 44,9 \pm 19,0$) e ligado a matéria orgânica (fração 3) quando Ni e Zn são aplicados conjuntamente no solo ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 5,4 \pm 2$) do que nas demais frações extraídas. Além disso, Ni foi encontrado em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) e ligado a óxidos/hidróxidos e ferro e manganês (fração 2) no tratamento com excesso de Zn em relação às concentrações obtidas nas mesmas frações no tratamento controle ($T_{Zn}/T_C = 3,0 \pm 1,1$ em ambas as frações).

Zn foi encontrado proporcionalmente em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) do solo de todos os tratamentos ($T_{Zn}/T_C = 19,4 \pm 5,9$; $T_{Ni\ Zn}/T_C = 13,3 \pm 4,3$; $T_{Ni}/T_C = 2,1 \pm 0,9$), em relação à concentração encontrada na mesma fração do tratamento controle, do que nas demais frações.

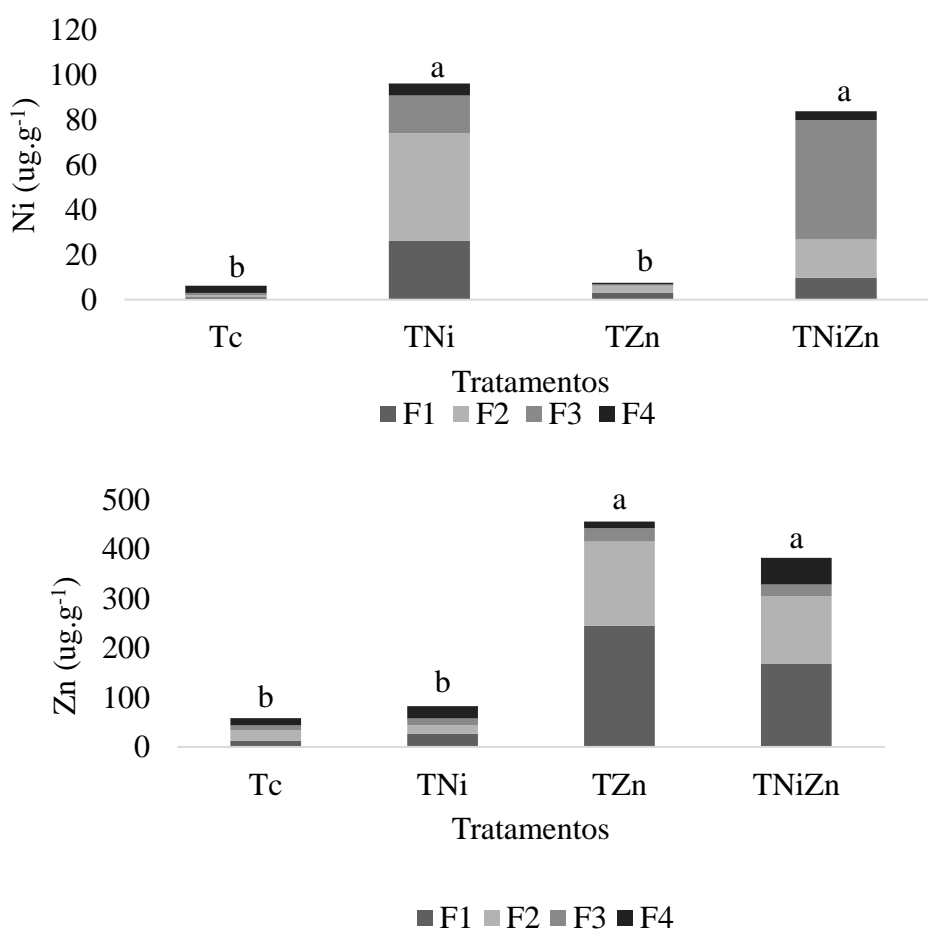


Figura 1. Somatória das concentrações de níquel e zinco solúvel, trocável e ligados a carbonatos; (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4) do solo

proveniente dos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras distintas indicam diferenças significativas nas razões de concentração entre as frações ($p < 0,001$).

Tabela 2. Razão de concentração de níquel e zinco no solo entre tratamentos com acréscimo de metais e tratamento controle, nas formas solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1) e ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4). Letras distintas indicam diferenças significativas nas razões de concentração entre as frações ($p < 0,001$).

	F1	F2	F3	F4
[Ni] tratamentos/[Ni]controle				
T_{Ni} / T_C	$24,6 \pm 6,2$ b	$44,9 \pm 19,0$ a	$17,5 \pm 7,4$ b	$1,7 \pm 0,6$ c
T_{Zn} / T_C	$3,0 \pm 1,1$ a	$3,0 \pm 1,1$ a	$0,7 \pm 0,4$ b	$0,2 \pm 0,1$ c
$T_{Ni Zn} / T_C$	$9,3 \pm 2,8$ b	$16,6 \pm 3,8$ b	$54,4 \pm 21,5$ a	$1,2 \pm 0,5$ c
[Zn] tratamentos/[Zn]controle				
T_{Ni} / T_C	$2,1 \pm 0,9$ a	$0,8 \pm 0,5$ c	$1,4 \pm 0,7$ b	$1,7 \pm 0,3$ a
T_{Zn} / T_C	$19,4 \pm 5,9$ a	$8,1 \pm 4,6$ b	$2,7 \pm 0,8$ b	$0,9 \pm 0,7$ c
$T_{Ni Zn} / T_C$	$13,3 \pm 4,3$ a	$6,5 \pm 1,9$ b	$2,4 \pm 0,5$ c	$3,6 \pm 2,1$ c

A figura 2 mostra as somatórias de concentração de Ni nas frações biodisponíveis do solo ($F1+F2+F3$) e o conteúdo absoluto dos metais nos diferentes órgãos das plantas das espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos 4 tratamentos de solo. Verificou-se que as variações no conteúdo absoluto de Ni nas plantas de todas as espécies entre os tratamentos foi similar às variações no nível de Ni biodisponível no solo. Denota-se, ainda, que o conteúdo absoluto total de Ni foi mais alto nas espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras crescidas em todos os tratamentos.

O conteúdo absoluto de Ni foi significativamente mais alto nas plantas das três espécies pioneiras crescidas em solo com excesso de Ni (T_{Ni}) e de Ni + Zn ($T_{Ni Zn}$) do que nos tratamentos controle e com excesso de Zn (T_C e T_{Zn}). Nas plantas das 3 espécies não pioneiras, o acúmulo de Ni foi significativamente mais alto no T_{Ni} em comparação aos valores obtidos em T_C e T_{Zn} e em relação aos valores estimados em $T_{Ni Zn}$. As plantas não pioneiras cultivadas no $T_{Ni Zn}$ apresentaram conteúdo total mais alto do que as plantas crescidas no T_C e T_{Zn} (figura 2).

Na tabela 3, foram comparadas as estimativas da razão do conteúdo absoluto de Ni entre tratamentos com acréscimo do mesmo e tratamento controle (T_{Ni}/T_C e $T_{Ni Zn}/T_C$) entre espécies

considerando cada órgão da planta (fator 1) e entre folhas, caules e raízes de cada espécie pioneira (Pi) e não pioneira (NPi) (fator 2). A ANOVA indicou ter havido efeito significativo de ambos os fatores e da interação entre eles. Além disso, as razões T_{Ni}/T_C pareceram ser mais altas do que as razões e $T_{Ni\ Zn}/T_C$, de modo que as comparações estatísticas entre espécies e entre os diferentes órgãos vegetais foram realizadas separadamente para ambas as estimativas.

O acúmulo foliar absoluto de Ni foi significativamente mais acentuado nas plantas de *E. leiocarpa* (NPi) crescidas com excesso desse metal no solo em relação ao obtido no tratamento controle ($T_{Ni}/T_C = 24,2 \pm 2,3$) e nas plantas de *E. leiocarpa*, *C. floribundus* (Pi) e *I. sessilis* (Pi) crescidas em solo enriquecido de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 6,5 \pm 2,0$; $5,5 \pm 1,1$ e $5,2 \pm 1,3$ respectivamente). Aumento significativo do conteúdo de Ni nos caules, relativo ao controle, ocorreu em *E. leiocarpa*, *E. uniflora* (NPi) e *C. floribundus* cultivadas em solo enriquecido de Ni ($T_{Ni}/T_C = 55,0 \pm 6,6$; $42,0 \pm 9,5$; $34,5 \pm 3,0$). Houve similaridade nas razões de conteúdo caulinar de Ni entre as espécies crescidas no tratamento com excesso de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C$ entre $23,5 \pm 9,4$ para *E. uniflora* e $16,0 \pm 3,1$ para *C. floribundus*), excetuando-se *R. ferruginea* (Pi), cuja razão $T_{Ni\ Zn}/T_C (= 6,3 \pm 2,1)$ foi significativamente inferior do que as estimadas nas demais espécies. *C. floribundus* e *I. sessilis* também mostraram maior capacidade de acumular Ni nas raízes do que as demais espécies, quando crescidas tanto no tratamento com excesso de Ni ($T_{Ni}/T_C = 14,4 \pm 3,7$ e $18,0 \pm 2,4$ respectivamente) quanto no tratamento com excesso de Ni e Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 20,3 \pm 8,0$ e $14,1 \pm 4,0$) (Tabela 3).

Na maioria dos casos, Ni foi retido em maior proporção no caule do que nas raízes e/ou folhas das plantas de todas as espécies crescidas no solo enriquecido de Ni ou de Ni e Zn, em relação ao conteúdo de Ni estimado nas plantas do tratamento controle. Os valores de T_{Ni}/T_C foram significativamente menores nas raízes e folhas do que no caule de plantas de *C. floribundus*, *R. ferruginea*, *E. leiocarpa* e *O. odorifera*. A razão $T_{Ni\ Zn}/T_C$ foi mais baixa nas folhas do que no caule e raízes de todas as espécies (Tabela 3).

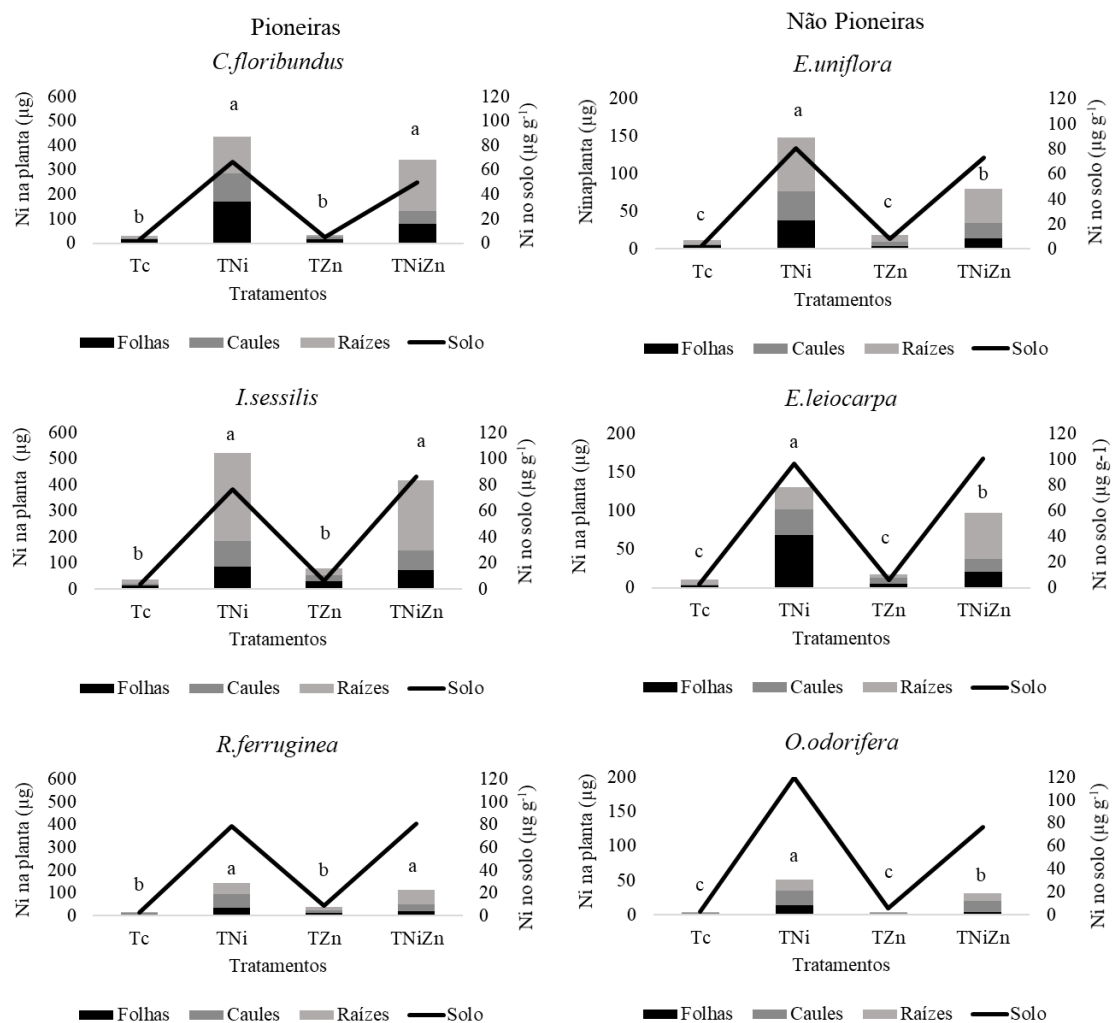


Figura 2. Somatória das concentrações de níquel ligado às frações biodisponíveis no solo solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e conteúdo absoluto (concentração*biomassa) de níquel em folhas, caules e raízes de espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras minúsculas indicam diferenças significativas na somatória da concentração do metal nos diferentes órgãos das plantas, entre os tratamentos.

Tabela 3. Razão de conteúdo absoluto (concentração*biomassa) de níquel entre tratamentos com acréscimo do mesmo e tratamento controle (T_{Ni}/T_C e $T_{Ni Zn}/T_C$) em folhas, caules e raízes de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas nas razões estimadas para cada órgão entre as espécies. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas nas razões estimadas entre folhas, caules e raízes de cada espécie ($p < 0,001$). Fator 1: Espécies; Fator 2: Órgãos das plantas.

Espécies	T_{Ni}/T_C			$T_{Ni Zn}/T_C$		
	Folhas	Caules	Raízes	Folhas	Caules	Raízes
<i>C. floribundus</i> (Pi)	11,7±2,5 Bb	34,5±3,0 Aa	14,4±3,7 Ba	5,5±1,1Ba	16,0±3,1Aa	20,3±8,0 Aa
<i>I. sessilis</i> (Pi)	6,4 ±1,0 Bb	20,3±5,0 Ab	18,0±2,4 Aa	5,2±1,3 Ba	16,4±4,8 Aa	14,1±4,0 Aa
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	6,3±1,1 Bb	12,4±5,3 Ac	8,1 ±2,5 Bb	3,3±1,0 Cb	6,3±2,1 Bb	11,0±1,7 Ab
<i>E. uniflora</i> (NPi)	7,0±4,1 Cb	42,0±9,5 Aa	14,0±3,2 Ba	2,4±0,5 Cb	23,5±9,4 Aa	8,8±2,0 Bb
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	24,2±2,3 Ba	55,0±6,6 Aa	4,0±1,4 Cb	6,5±2,0 Ca	17,4±3,6 Aa	9,5±3,5 Bb
<i>O. odorifera</i> (NPi)	12,1±2,4 Bb	21,8±7,4 Ab	7,0±2,0 Cb	3,0±1,0 Cb	16,7±4,0 Aa	4,7±1,0 Bc
Two way ANOVA*						
Fator 1	< 0,001			< 0,001		
Fator 2	< 0,001			< 0,001		
Fator 1 x 2	< 0,001			< 0,001		

* Valores de p

A figura 3 mostra as somatórias de concentração de Zn nas frações biodisponíveis do solo ($F1+F2+F3$) e o conteúdo absoluto dos metais nos diferentes órgãos das plantas das espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos 4 tratamentos de solo. Da mesma forma que ocorreu com Ni, o conteúdo absoluto de Zn nas plantas de todas as espécies variou de forma similar aos níveis de Zn biodisponível no solo dos 4 tratamentos. Verificou-se, também, que o conteúdo absoluto total de Zn foi pelo menos duas vezes maior nas espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras crescidas em todos os tratamentos.

O conteúdo absoluto de Zn foi significativamente mais alto nas plantas das espécies arbóreas crescidas em solo com excesso de Zn (T_{Zn}) do que nos tratamentos controle (T_C), com excesso de Ni

(T_{Ni}) e com excesso de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}$). O conteúdo absoluto de Zn foi similar em plantas expostas aos tratamentos T_{Zn} e $T_{Ni\ Zn}$ apenas para *C. floribundus* (figura 3).

Na tabela 4, foram comparadas as estimativas da razão do conteúdo absoluto de Zn entre tratamentos com acréscimo do mesmo e tratamento controle (T_{Zn}/T_C e $T_{Ni\ Zn}/T_C$) entre espécies considerando cada órgão da planta (fator 1) e entre folhas, caules e raízes de cada espécie pioneira (Pi) e não pioneira (NPi) (fator 2). Houve efeito significativo de ambos os fatores e interação entre eles de acordo com a ANOVA aplicada. Além disso, as comparações estatísticas entre espécies e entre os diferentes órgãos vegetais foram realizadas separadamente para ambas as estimativas de razão.

O acúmulo foliar absoluto de Zn foi também significativamente mais acentuado nas plantas de *E. leiocarpa* (NPi) crescidas com excesso desse metal no solo em relação ao obtido no tratamento controle ($T_{Zn}/T_C = 23,2 \pm 5,5$) e nas plantas de *E. leiocarpa* (NPi) e *C. floribundus* (Pi) crescidas em solo enriquecido de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 8,1 \pm 1,5$ e $6,7 \pm 1,0$ respectivamente). Aumento significativo do conteúdo de Zn nos caules, relativo ao controle, ocorreu em *E. leiocarpa* (NPi), *O. odorifera* (NPi) e *R. ferruginea* (Pi) cultivadas em solo enriquecido de Zn ($T_{Zn}/T_C = 11,0 \pm 1,6$; $10,9 \pm 2,5$; $8,8 \pm 1,8$) e em *C. floribundus* exposto ao tratamento com excesso de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 7,1 \pm 1,9$). *I. sessilis* e todas as espécies não pioneiras mostraram maior capacidade de acumular Zn nas raízes do que as demais espécies pioneiras, quando crescidas no tratamento com excesso de Zn (T_{Zn}/T_C entre $28,5 \pm 1,4$ para *E. leiocarpa* e $13,5 \pm 2,0$ para *O. odorifera*). Plantas de *E. leiocarpa* também mostraram maior capacidade de acúmulo de Zn nas raízes quando expostas ao tratamento com excesso de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}/T_C = 26,1 \pm 2,6$) (Tabela 4).

Na maioria das espécies, Zn foi retido em maior proporção nas raízes e em menor proporção no caule quando crescidas em solo enriquecido de Zn ou de Ni+ Zn, em relação ao conteúdo de Zn estimado nas plantas do tratamento controle. Por outro lado, Zn foi retido de maneira similar em

raízes, caules e folhas de plantas de *R. ferruginea* e *O. odorifera* expostas ao excesso de Zn no solo e de plantas de *C. floribundus* expostas ao excesso de Ni + Zn, em relação ao conteúdo absoluto em plantas do tratamento controle (Tabela 4).

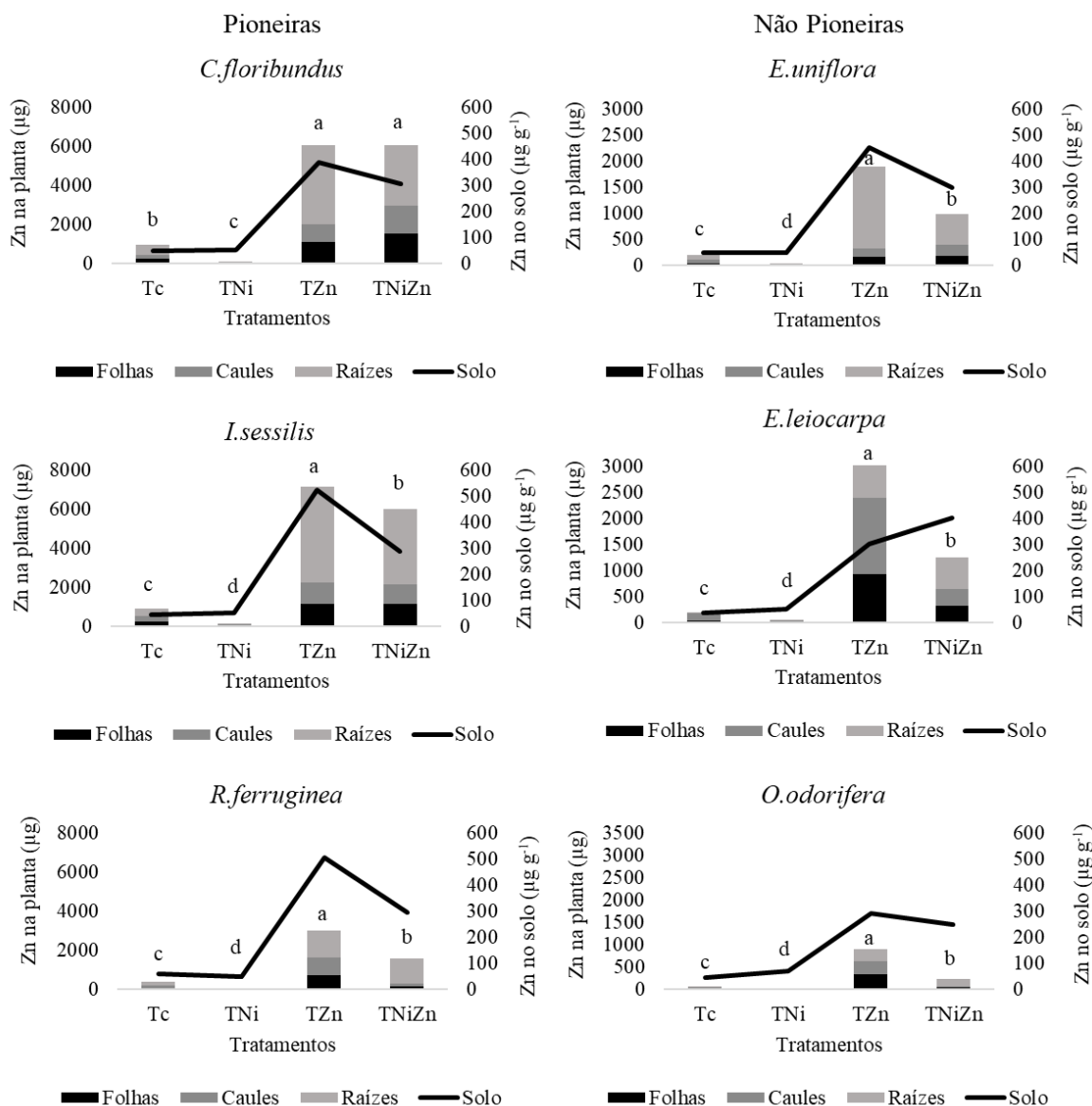


Figura 3. Somatória das concentrações de zinco ligado às frações biodisponíveis solo solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e concentração de zinco em folhas, caules e raízes de espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{Ni Zn}). Letras minúsculas indicam diferenças significativas na somatória da concentração do metal nos diferentes órgãos das plantas, entre os tratamentos.

Tabela 4. Razão de conteúdo absoluto (concentração*biomassa) de zinco entre tratamentos com acréscimo do mesmo e tratamento controle (T_{Zn}/T_C e $T_{Ni Zn}/T_C$) em folhas, caules e raízes de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas nas razões estimadas para cada órgão entre as espécies. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas nas razões estimadas entre folhas, caules e raízes de cada espécie ($p < 0,001$). Fator 1: Espécies; Fator 2: Órgãos das plantas.

Espécies	T_{Zn}/T_C			$T_{Ni Zn}/T_C$		
	Folhas	Caules	Raízes	Folhas	Caules	Raízes
<i>C. floribundus</i> (Pi)	4,8±1,6 Bb	4,5±0,9 Bb	7,5±1,0 Ab	6,7±1,0 Aa	7,1±1,9 Aa	5,7±1,1 Ac
<i>I. sessilis</i> (Pi)	4,5±1,0 Bc	3,7±1,1 Bb	14,3±2,3 Aa	4,6±2,3 Bb	3,4±0,7 Bb	11,3±0,8 Ab
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	8,6±4,1 Ab	8,8±1,8 Aa	7,1±0,8 Ab	1,8±0,4 Bc	1,3±0,4 Bb	6,8±0,8 Ac
<i>E. uniflora</i> (NPi)	4,3±1,2 Bc	2,4±0,6 Cc	19,0±4,4 Aa	4,8±1,7 Bb	3,0±0,5 Cb	7,1±0,8 Ab
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	23,2±5,5 Aa	11,0±1,6 Ba	28,5±1,4 Aa	8,1±1,5 Ba	2,3±0,8 Cb	26,1±2,6 Aa
<i>O. odorifera</i> (NPi)	12,0±6,7 Ab	10,9±2,5 Aa	13,5±2,0 Aa	1,4±1,0 Bc	1,1±0,4 Bc	8,5±1,0 Ab
Two way ANOVA*						
Fator 1	< 0,001			< 0,001		
Fator 2	< 0,001			< 0,001		
Fator 1 x 2	< 0,001			< 0,001		

* Valores de p

Na tabela 5, foi comparado o índice de translocação (IT) de níquel e zinco da raiz para a parte aérea (caules +folhas) de cada espécie entre os tratamentos controle (T_C) e com o acréscimo dos metais (T_{Ni} ou T_{Zn} e T_{NiZn}) (fator 1) e entre espécies em cada tratamento (fator 2). Houve um efeito significativo de ambos os fatores e interação entre eles de acordo com a ANOVA aplicada.

O índice de translocação de Ni da raiz para a parte aérea foi significativamente mais alto nas plantas de *C. floribundus* (Pi), *R. ferruginea* (Pi) e *E. uniflora* (NPi) crescidas no tratamento controle (IT = 1,8±0,4, 1,8±0,3 e 1,3±0,3 respectivamente). No tratamento com acréscimo de Ni, os maiores IT foram estimados para plantas de *E. leiocarpa* (NPi) e *C. floribundus* (IT = 4,0±1,2 e 2,0±0,5). No tratamento $T_{Ni Zn}$, plantas de *O. odorifera* (NPi) translocaram mais Ni das raízes para a parte aérea do

que as demais espécies ($IT = 1,8 \pm 0,1$). As plantas expostas ao excesso de Ni + Zn (T_{NiZn}) mostraram menor índice de translocação de Ni das raízes para a parte aérea do que as plantas expostas ao tratamento com excesso de Ni (T_{Ni}), exceto *O. odorifera*, que apresentou translocação similar nos 2 tratamentos.

As espécies que mostraram maior capacidade de translocação de Zn para a parte aérea foi *E. leiocarpa* ($T_C: 7,5 \pm 2,0$; $T_{Zn}: 3,6 \pm 0,4$; $T_{NiZn}: 1,1 \pm 0,3$), *O. odorifera* ($T_C: 3,0 \pm 1,0$; $T_{Zn}: 2,4 \pm 0,5$) e *C. floribundus* (Pi) ($T_{NiZn}: 1,0 \pm 0,1$). Todas as espécies mostraram um maior índice de translocação no tratamento controle (T_C) do que nos tratamentos com o acréscimo de Zn ou de Ni e Zn apresentaram menor índice de translocação. As plantas *R. ferruginea*, *E. leiocarpa* e *O. odorifera* crescidas no tratamento T_{Zn} translocaram mais Zn para a parte aérea do que as crescidas no $T_{Ni Zn}$ e o inverso ocorreu nas plantas de *C. floribundus*.

Tabela 5. Valores médios \pm desvios-padrão do Índice de Translocação (IT) de níquel e zinco da raiz para a parte aérea nas espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (Tc) e com excesso de metais no solo (T_{Ni} ou T_{Zn} e T_{Ni Zn}). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies para cada tratamento. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada espécie ($p < 0,001$). Fator 1: Tratamentos; Fator 2: Espécies.

Espécies	IT (níquel)			IT (zinco)		
	T _c	T _{Ni}	T _{NiZn}	T _c	T _{Zn}	T _{NiZn}
<i>C. floribundus</i> (Pi)	1,8 \pm 0,4 Aa	2,0 \pm 0,5 Ab	0,8 \pm 0,4 Bb	0,9 \pm 0,4 Ac	0,5 \pm 0,1 Bc	1,0 \pm 0,1 Aa
<i>I. sessilis</i> (Pi)	1,1 \pm 0,5 Ab	0,5 \pm 0,1 Cc	0,6 \pm 0,2 Bb	1,7 \pm 0,5 Ac	0,5 \pm 0,1 Bc	0,6 \pm 0,2 Bb
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	1,8 \pm 0,3 Aa	2,0 \pm 0,3 Ab	0,7 \pm 0,2 Bb	1,1 \pm 0,4 Ac	1,2 \pm 0,4 Ab	0,2 \pm 0,03 Bc
<i>E. uniflora</i> (NPi)	1,3 \pm 0,5 Aa	1,1 \pm 0,5 Ac	0,8 \pm 0,4 Bb	1,4 \pm 0,5 Ac	0,2 \pm 0,04 Cc	0,7 \pm 0,2 Bb
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	0,7 \pm 0,1 Bc	4,0 \pm 1,2 Aa	0,7 \pm 0,2 Bb	7,5 \pm 2,0 Aa	3,6 \pm 0,4 Ba	1,1 \pm 0,3 Ca
<i>O. odorifera</i> (NPi)	1,0 \pm 0,3 Bb	2,2 \pm 0,4 Ab	1,8 \pm 0,1 Aa	3,0 \pm 1,0 Ab	2,4 \pm 0,5 Aa	0,5 \pm 0,2 Bb
Two way ANOVA *						
Fator 1	< 0,001			< 0,001		
Fator 2	< 0,001			< 0,001		
Fator 1 x 2	< 0,001			< 0,001		

* Valores de p

Na figura 4, foram comparadas as taxas de crescimento relativo (TCR) em altura, diâmetro e número de folhas das plantas tratadas com o acréscimo dos metais em relação as plantas do tratamento controle.

A TCR em altura não foi alterada e a TCR em diâmetro foi reduzida nas plantas de *C. floribundus* (Pi) crescidas em solo com excesso de Ni, Zn e Ni+Zn; a espécie mostrou um aumento no número de folhas nos tratamentos com Zn e com a combinação de Ni e Zn. *I. sessilis* (Pi) não mostrou alterações nas taxas de crescimento em altura e diâmetro, mas mostrou uma menor taxa em relação ao número de folhas quando tratadas com os metais. Plantas de *R. ferruginea* (Pi) também não apresentaram alterações nas taxas em relação a altura, mas houve uma menor TCR para diâmetro

e número de folhas quando crescidas em solo com acréscimo de Zn e Ni e Zn. *E. uniflora* (NPi) apresentou uma maior taxa em relação a altura quando crescidas em solo com o acréscimo de Ni e Ni e Zn, além de maior TCR em diâmetro quando tratadas com o Zn e menor TCR em número de folhas quando tratadas com Zn e Ni + Zn. As plantas de *E. leiocarpa* (NPi) apresentaram as menores taxas para altura e diâmetro quando crescidas em solo com acréscimo dos metais e uma menor taxa em relação ao número de folhas, quando tratadas com Zn e Ni + Zn. *O. odorifera* (NPi) apresentou as menores TCR apresentando valores negativos em todos os parâmetros mensurados quando crescidas em solo com o acréscimo dos metais, resultado da perda de gema apical, uma redução acentuada do diâmetro caulinar e uma acentuada queda das folhas.

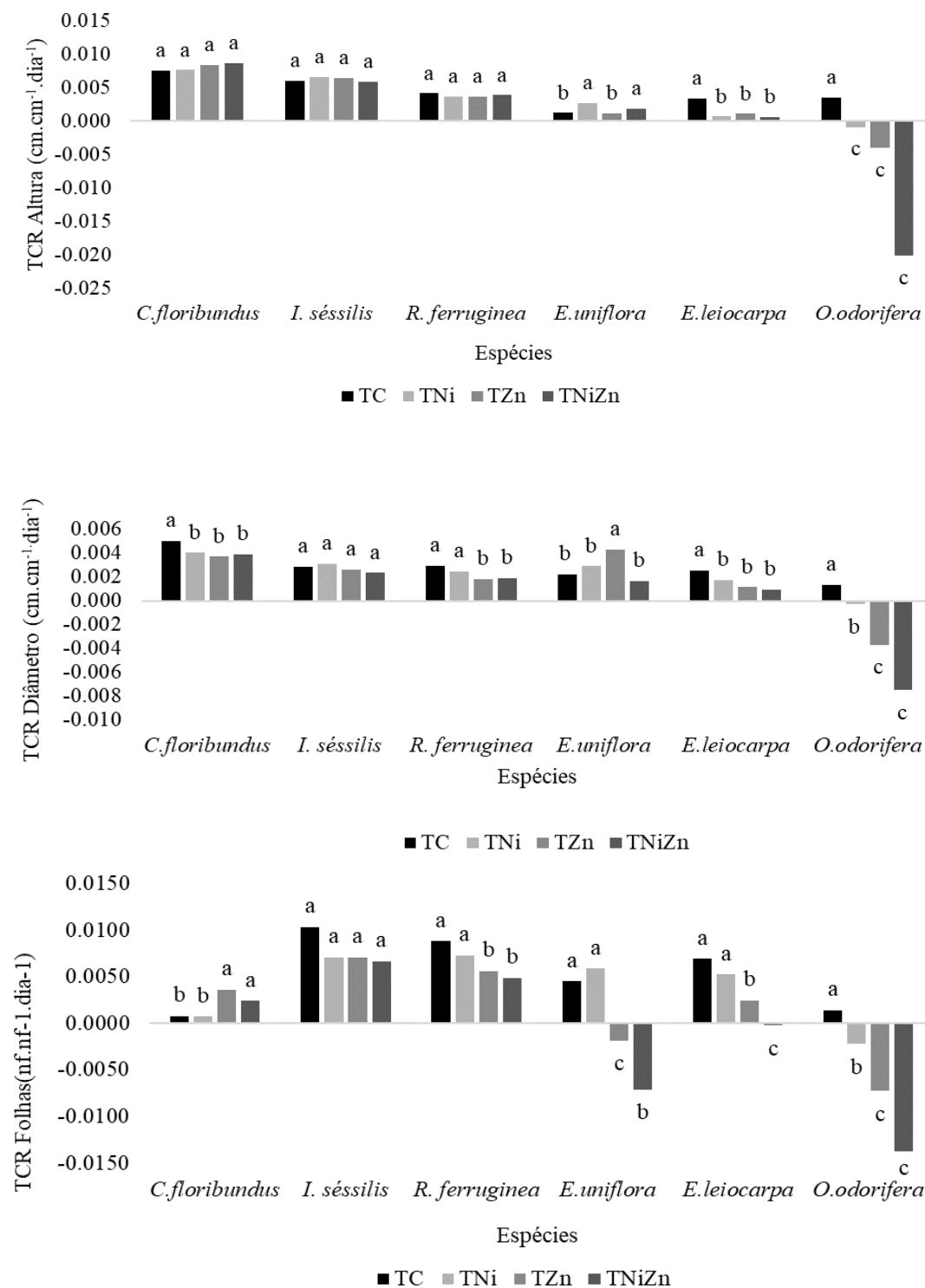


Figura 4. Valores médios para taxa de Crescimento Relativo (TCR) em altura, diâmetro e número de folhas de espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos tratamentos controle (T_C) e com excesso de níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras distintas indicam diferenças significativas nas TCR entre tratamentos para cada espécie, quando comparadas aos respectivos tratamentos controle (p<0,05).

Na figura 5, foram comparadas as taxas de crescimento relativo (TCR) em biomassa da parte aérea, raiz, total e as razões de biomassa raiz/parte aérea nas plantas tratadas com o acréscimo dos metais em relação às plantas do tratamento controle.

As plantas de *C. floribundus* (Pi) não apresentaram alteração nas TCR em biomassa da parte aérea e biomassa total, mas mostraram diminuição da biomassa das raízes e menor razão raiz/parte aérea, quando tratadas com o acréscimo dos metais no solo. Plantas de *I. sessilis* (Pi) expostas ao excesso de metais no solo não apresentaram nenhuma alteração nas TCR em biomassa e na razão raiz/parte aérea. Foram observadas reduções significativas apenas nas TCR em biomassa da parte aérea e raízes das plantas de *R. ferruginea* (Pi) crescidas em solo com acréscimo de Zn e Ni + Zn. As plantas de *E. uniflora* (NPi) não apresentaram alterações na produção de biomassa da parte aérea, raiz e na razão raiz/parte aérea, mas houve aumento significativo da TCR em biomassa total nas plantas crescidas em solo com o acréscimo de Ni. A espécie *E. leiocarpa* (NPi) apresentou redução na TCR da parte aérea e biomassa total, nas plantas crescidas em solo com acréscimo de Zn e de Ni + Zn, mas a produção de biomassa de raízes não foi alterada, assim como a razão raiz/parte aérea nas plantas expostas ao excesso de metais no solo. As plantas de *O. odorifera* (NPi) apresentaram reduções nas taxas de crescimento em biomassa da parte aérea e de raízes quando crescidas em solo com acréscimo de Zn e da biomassa total nas plantas quando crescidas em solo com acréscimo de Zn e Ni + Zn.

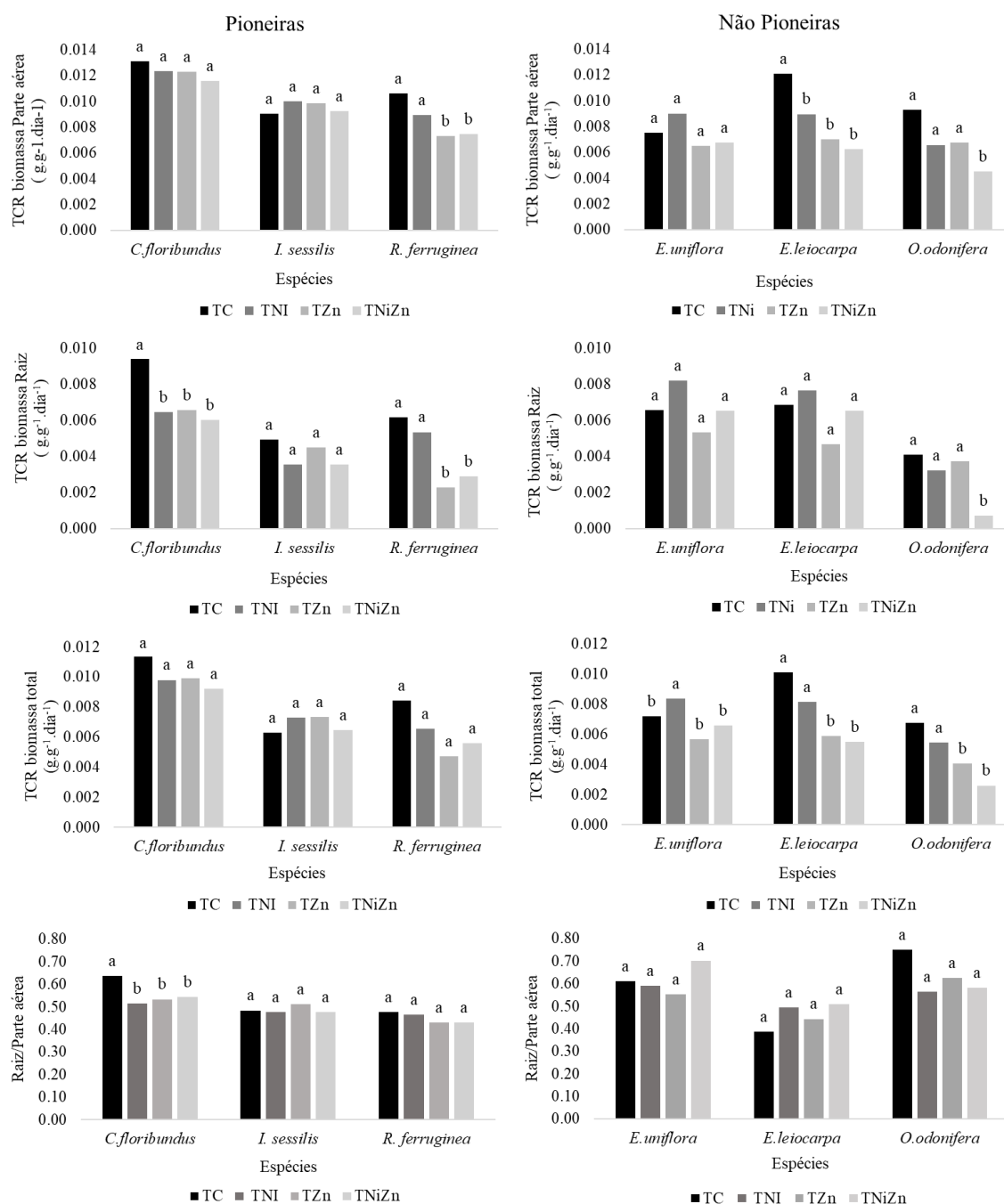


Figura 5. Valores médios para Taxa de Crescimento Relativo (TCR) em biomassa seca da parte aérea, raiz e biomassa total e razão raiz/parte aérea das espécies pioneiras e não pioneiras, crescidas nos tratamentos controle (TC) e com excesso de níquel (TNi), zinco (TZn) e níquel + zinco (TNiZn). Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos para cada espécie, quando comparadas aos respectivos tratamentos controle (p<0,05).

IV.5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível simular experimentalmente a deposição de Ni e Zn em solo de um fragmento urbano de Mata Atlântica, avaliar as interações entre esses íons tóxicos e demais constituintes do solo e verificar se uma alta contaminação do solo afetaria o crescimento de espécies arbóreas. Os resultados obtidos mostraram o nível de disponibilidade de Ni e Zn, quando depositados no solo proveniente do fragmento florestal urbano incluído Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), na forma de sais de sulfato. As simulações realizadas foram baseadas no estudo de Nakazato *et al.* (2020), que concluiu que tais metais são constituintes preponderantes do material particulado oriundo da emissão veicular e são incorporados na interface árvores-serapilheira-solo do fragmento florestal incluído no PEFI.

Verificou-se que Ni e Zn em excesso no solo da floresta do PEFI permaneceram em grande parte nas formas biodisponíveis, ou seja, nas formas solúveis, trocáveis ou ligados a carbonatos, óxidos/hidróxidos de ferro e manganês ou à matéria orgânica. São, portanto, passíveis de serem absorvidos pelas plantas, podendo causar efeitos danosos ao crescimento destas, a depender do nível de translocação das raízes para a parte aérea e do nível de tolerância ao acúmulo dos metais (Norouzi *et al.*, 2015).

A disponibilidade desses metais para absorção das plantas pode ser influenciada por suas fontes e pelas características físico-química desse solo (Mao *et al.*, 2017). O pH em CaCl_2 do solo neste estudo apresentou um pH valor médio (5,3), assim como foram observados teores muito altos de Fe ($>57 \text{ mg/dm}^3$) e de B ($>0,58 \text{ mg/dm}^3$), conforme a classificação de Raij *et al.* (2001). Segundo Brokbarthold *et al.* (2012), valores de pH mais baixos resultam em maior mobilidade de cátions e, portanto, maior disponibilidade para as plantas. Rieuwerts (2007) concluiu que os solos encontrados nos trópicos, tais como latossolos e argisolos (altos teores de matéria orgânica, baixos valores de pH e altos níveis de óxidos de Fe), resultam na alta mobilidade e biodisponibilidade de metais. Smolders e Degryse (2006) discutiram que os processos de fixação de Zn em solos são relativamente lentos e

altamente controlados pelo pH do solo e pela forma química desse metal. Joris e colaboradores (2012) avaliaram a dinâmica de Cu, Ni, Zn e Cd em latossolo vermelho distrófico, manejado por sistema de plantio direto com e sem calagem e verificaram que o aumento do pH, causado pela calagem, resultou na diminuição da disponibilidade de Cu, Zn, Cd e Ni, principalmente na camada superficial do solo.

Com base nesses estudos, podemos afirmar que as características químicas do solo do PEFI contribuem para o aumento da biodisponibilidade de Ni e Zn para as plantas, confirmando a primeira hipótese deste estudo.

O conteúdo absoluto de Ni e Zn nas plantas das espécies incluídas neste estudo refletiu diretamente o nível de biodisponibilidade no solo, sendo mais alto em espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras (figuras 2 e 3). Esses resultados contrastam com os obtidos por Nakazato *et al.* (2020). Os autores, ao amostrarem folhas de árvores adultas de espécies pioneiras e não pioneiras em fragmentos florestais de Mata Atlântica, incluindo o PEFI, observaram que a concentração dos metais geralmente é mais alta nas espécies não pioneiras do que nas pioneiras. Essa conclusão foi a base para a proposição da segunda hipótese deste estudo, que foi rejeitada em função dos resultados obtidos. Ao multiplicar a concentração pela biomassa para expressar o conteúdo absoluto dos metais em cada órgão vegetal, comprovou-se o inverso. Ocorre que as espécies arbóreas pioneiras têm maior potencial de absorção de metais pesados do solo, por apresentarem taxas fotossintéticas e crescimento mais acelerados do que espécies não pioneiras (Boukhris *et al.*, 2016). Tais características podem resultar em menor concentração nos diferentes órgãos das árvores pioneiras do que das não pioneiras presentes no fragmento florestal, como foi observado por Nakazato *et al.* (2020), visto que esta representa a massa de um dado elemento químico por unidade de biomassa do órgão vegetal. Sendo assim, o conteúdo absoluto do elemento expressa melhor o nível de acúmulo dos metais nas árvores do que a concentração propriamente dita.

Com base no conteúdo absoluto ainda foi possível observar que as espécies não pioneiras, quando crescidas em solo contaminado pela combinação de Ni e Zn, mostraram menor absorção de

Ni do que quando crescidas em solo enriquecido apenas com Ni, indicando uma possível inibição da absorção de Ni por Zn (figura 2 e tabela 3). O mesmo ocorreu nas plantas tratadas com Zn (figura 3 e tabela 4). A absorção de Zn pareceu ser inibida por Ni, em todas as espécies expostas ao excesso de Ni e Zn, exceto *C. floribundus*. Em um estudo sobre a interação de Ni com outros elementos, Deng *et al.* (2019) concluíram que o Zn pode suprimir severamente a absorção de Ni e, quando absorvido, o faz principalmente por transportadores de Zn, ocorrendo um efeito antagônico entre Ni e Zn durante o transporte nas raízes. Ainda, durante o processo de transporte das raízes, Ni e Zn podem continuar a competir um com o outro. Isso é consistente com as descobertas de Assunção *et al.* (2001), o que sugere que Ni também compartilha parte do sistema de transporte de Zn, provavelmente durante o processo de carregamento do xilema.

Além disso, as razões incluídas nas tabelas 3 e 4 e índice de translocação (tabela 5) indicaram que a capacidade relativa de aumento do conteúdo absoluto de Ni e Zn de plantas crescidas em solo com alto nível de contaminação não é uma característica nitidamente associada a um grupo funcional específico. Isto porque as mencionadas razões e os índices de translocação estimados não foram necessariamente similares entre espécies pioneiras ou entre não pioneiras. *C. floribundus* (Pi), *E. leiocarpa* (NPi) e *O. odorifera* (NPi) se destacaram por terem mostrado acúmulo relativo considerável em pelo menos um de seus órgãos, quando tratadas com excesso de Ni e Zn.

Na maioria das espécies, o acúmulo relativo de Ni, indicado pela estimativa da razão entre os valores encontrados nos tratamentos T_{Ni} , T_{Zn} ou $T_{Ni\ Zn}$ e no controle (T_C), ocorreu em maior proporção nos caules e o acúmulo relativo de Zn nas raízes. *E. leiocarpa* (NPi) está entre as espécies que armazenaram Ni e Zn preponderantemente no caule. Nazir *et al.* (2019), em estudo com *Solanum lycopersicum* L. exposta a diferentes doses de Ni no solo (10 ou 100 mg kg⁻¹), encontraram um aumento da concentração de Ni nas raízes e brotações em plantas submetidas à maior concentração de Ni. Em um estudo com vinte espécies arbóreas tropicais, Soares *et al.* (2001) verificaram que a maioria das espécies apresentaram maior quantidade relativa de Zn nas raízes em solo contaminado.

O mesmo conclui que o acúmulo do elemento no caule indica uma imobilização do metal em órgão perene das espécies arbóreas, tornando-as interessantes para fitorremediação do solo, desde que elas possam tolerar o alto nível de contaminação.

O índice de translocação (IT) permite identificar um possível mecanismo de defesa das plantas contra o excesso de metais no solo. A imobilização dos contaminantes inorgânicos nas raízes, restringindo a translocação destes para a parte aérea e resultando em $IT < 1$, tem sido considerado um mecanismo de evitação de danos a processos metabólicos e fisiológicos foliares. Por outro lado, $IT > 1$ pode indicar que as plantas não apenas toleram, mas utilizam o contaminante de uma maneira benéfica, característica comum de plantas hiperacumuladoras (Chanu e Gupta, 2016). Portanto, $IT > 1$ é um fator decisivo para categorizar as espécies para fitorremediação (Chanu e Gupta, 2016). Neste estudo, o aumento das taxas de translocação dos metais das raízes para a parte aérea, em resposta ao aumento da biodisponibilidade no solo, não foi uma característica observada em todas as espécies. Foram estimados valores de IT próximos a 1 nas plantas da maioria das espécies tratadas com o acréscimo de Ni e Zn, indicando que as espécies tenderam a imobilizar os metais nas raízes. No entanto, *C. floribundus* (Pi), *E. leiocarpa* (NPi) e *O. odorifera* (NPi) se destacaram novamente pelos altos valores de IT estimados. *E. leiocarpa*, em particular, é uma espécie recomendada para fitorremediação caso essa tolere a contaminação, por acumular em média, 4 e 3,6 vezes mais Ni e Zn, respectivamente, na parte aérea do que nas raízes, quando expostas ao excesso destes no solo, apesar de não estar entre as espécies com maior conteúdo absoluto total desses metais.

As taxas de crescimento relativo em altura, diâmetro, número de folhas e biomassa foram reduzidas, na maior parte das vezes, nas plantas das espécies não pioneiras tratadas com excesso dos metais, apesar destas terem apresentado menor conteúdo absoluto dos metais em seus órgãos do que as espécies pioneiras. Essa redução de crescimento parece indicar que as espécies não pioneiras estudadas são mais susceptíveis ao estresse induzido por Ni e Zn do que as pioneiras, contribuindo para comprovar parcialmente a terceira hipótese. O estresse por Zn pode danificar a estrutura das

raízes (Ambrosini *et al.*, 2015; Bochicchio *et al.*, 2015), reduzindo a absorção de água e nutrientes minerais do solo e, assim, diminuir o crescimento das plantas (Ambrosini *et al.*, 2016). Estudos mostram, também o impacto negativo que excesso de Ni provoca nos indicadores de crescimento, sendo associado à diminuição do teor de clorofila em plantas em condições de estresse por este elemento (Sheetal *et al.*, 2016). Esses resultados comprovam em partes a terceira hipótese do trabalho, uma vez o índice de translocação para parte aérea só ocorreu para as espécies arbóreas tratadas com o metal Ni.

IV.6. CONCLUSÕES

Os metais aplicados ao solo proveniente de um fragmento de Mata Atlântica urbano, simulando a deposição do material particulado atmosférico enriquecido dos mesmos, aumentam a fração biodisponível destes para a comunidade vegetal. O conteúdo absoluto de Ni e Zn nas plantas das espécies incluídas neste estudo refletiu diretamente o nível de biodisponibilidade no solo, sendo mais alto em espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras, enquanto índices de translocação estimados não foram similares entre espécies pioneiras ou entre não pioneiras. *C. floribundus* (Pi), *E. leiocarpa* (NPi) e *O. odorifera* (NPi) se destacaram por terem mostrado acúmulo relativo considerável em pelo menos um de seus órgãos, quando tratadas com excesso de Ni e Zn. Ainda, com base no conteúdo absoluto foi possível observar que as espécies não pioneiras, quando crescidas em solo contaminado pela combinação de Ni e Zn, mostraram menor absorção de Ni do que quando crescidas em solo enriquecido apenas com Ni, indicando uma possível inibição da absorção de Ni por Zn. O mesmo ocorreu nas plantas tratadas com Zn.

IV. BIBLIOGRAFIA

Alloway, B.J., 2013. Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, third edition, Dordrecht, Netherlands: Springer Alloway;

Amaral Sobrinho, N.M.B.; Barra, C.M. & LÃ, O.R. 2009. Química dos metais pesados nos solos. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R. (ed.). Química e mineralogia do solo: Aplicações. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Parte II. v.2. p.249-312.

Ambrosini, V. G.; Rosa, D. J.; Basso, A.; Borghezan, M.; Pescador, R.; Miotto, A.; Melo, G. W. B. de; Soares, C. R. F. S.; Comin, J. J.; Brunetto, G., 2016. Liming as an ameliorator of copper toxicity in black oat (*Avena strigosa* Schreb.). Journal of Plant Nutrition.

Ambrosini, V. G.; Rosa, D. J.; Prado, J. P. C.; Borghezan, M.; Melo, G. W. B. de; Soares, C. R. F. de S.; Comin, J. J.; Simão, D. G.; Brunetto, G., 2015. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). Plant Physiology and Biochemistry, v. 96, p. 270-280, Nov.

Assunção, A.G.L., Martins, P.D.C., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ. 24, 217–226.

Benincasa, M.M.P. 1988. Análise de crescimento de plantas; noções básicas s. Jaboticabal: FUNEP. 42p.

Bochicchio, R.; Sofo, A.; Terzano, R.; Gattullo, C. E.; Amato, M.; Scopa, A., 2015. Root architecture and morphometric analysis of *Arabidopsis thaliana* grown in Cd/Cu/Zn-gradient agar dishes: A new screening technique for studying plant response to metals. Plant Physiology and Biochemistry, v. 91, p. 20-27, Jun.

Boukhris, A.; Laffont-Schwob, I.; Mezghani, I.; El Kadri, L.; Prudent, P.; Pricop, A.; Tatoni, T.; Chaieb, M. 2016. Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for in-situ phytoremediation. Chemosphere, v. 119, p. 217-223.

Brokbartold, M., Grupe, M., Marschner, B., 2012. Effectiveness of different soil amendments to reduce the Pb and Zn extractability and plant uptake in soils contaminated by anticorrosion paints beneath pylons. J. Plant Nutr. Soil Sci. 175, 443–455.

Cetesb, 2016. Relatório de qualidade ambiental do estado de São Paulo. Valores Orientadores para Solo e Água Subterrânea no Estado de São Paulo. (acessado 26.08.2020).

Chanu, L.B., Gupta, A., 2016. Phytoremediation of lead using *Ipomoea aquatica* Forsk. In hydroponic solution. Chemosphere 156, 407–411.

Costa, C. N.; Meurer, E. J.; BissanI, C. A. & Selbach, P. A., 2006. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente In: Fundamentos de química do solo 3º Edição, Porto Alegre: Evangraf, p.285.

Deng Teng-Hao-Bo, Tang Ye-Tao, Sterckeman Thibault, Echevarria Guillaume, Morel Jean-Louis, Qiu Rong-Liang. 2019. Effects of the interactions between nickel and other trace metals on their accumulation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*, *Environmental and Experimental Botany* 158 (2019) 73–79.

Domingos M, Bourotte C, Klumpp A, Klumpp G & Forti MC. 2002. Impactos da poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: DC Bicudo, MC Forti & CEM Bicudo (eds.). Parque Estadual das Fontes do Ipiranga.

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.

França, E.J. De, Nadai Fernandes, E.A., Bacchi, M.A., Tagliaferro, F.S., Saiki, M., 2007. Soil-leaf transfer of chemical elements for the Atlantic Forest. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 271, 405–411.

Guzmán-Morales, J., Morton-Bermea, O., Hernández-Álvarez, E., Rodríguez-Salazar, M.T., García-Arreola, M.E., Tapia-Cruz, V., 2011. Assessment of atmospheric metal pollution in the urban area of Mexico City, using *Ficus benjamina* as biomonitor. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 495–500

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.

Joly C, Metzger JP, Tabarelli M (2014) Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. *New Phytol* 204:459–473

Joris, H. A. W.; Fonseca, A. F; Asami, V. Y.; Briedis, C.; Borszowskei, P. R.; Garbuio, F. J. 2012. Adsorção de metais após calagem superficial em um latossolo vermelho sob sistema de plantio direto. *Revista Ciência Agronômica*, 43, 1.

Kabata-Pendias. 2011. Trace elements in soils and plants. 4 th ed. Wyd. Nauk PWN, Warsaw, 400p. Pendias, 2011;

Kalaiarasan, G., Balakrishnan, R.M., Sethunath, N.A., Manoharan, S. 2018. Source apportionment studies on particulate matter (PM10 and PM2.5) in ambient air of urban Mangalore, India. *Journal of Environmental Management*, 217, 815-824.

Keshavarzi, A., Kumar, V., 2019a. Spatial distribution and potential ecological riskLandscapes 00, 1–17.

Lopes, M., Ribeiro Dos Santos, A., Zuliani Sandrin Camargo, C., Bulbovas, P., Giampaoli, P., Domingos, M., 2015. Soil chemical and physical status in semideciduous Atlantic Forest fragments affected by atmospheric deposition in central-eastern São Paulo State, Brazil. *iForest - Biogeosciences For.* E1–e11.

Mao et al., 2017 (Mao, L.C., Younga, S.D. Tye A.M, Bailey, E.H. 2017. Predicting trace metal solubility and fractionation in Urban soils from isotopic exchangeability. *Environmental Pollution* 231, 1529 – 1542).

- Motuzova, G.V., Karpova, E.A.,** 2013. Chemical Contamination of the Biosphere and its Environmental Consequences. Moscow University Press, Moscow (in Russian).
- Motuzova, G.V., Minkina, T.M., Karpova, E.A., Barsova, N.U., Mandzhieva, S.S.,** 2014. Soil contamination with heavy metals as a potential and real risk to the environment. *J. Geochem. Explor.* 144, 241e 246.
- Naidu, R., Krishnamurti, G.S.R., Bolan, N.S., Wenzel, W., Megharaj, M.,** 2001. Heavy Metal Interactions in Soils and Implications for Soil Microbial Biodiversity, in: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Metals in the environment, analysis by biodiversity*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca.
- Nakazato, R. K., Lourenço, I.S., Esposito, M.P., Lima, M.E.L., Campos, R.O.A., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M.** 2020. Bioavailability of trace metals at the plant-soil- interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by air pollution sources. *Submetido a Environmental Pollution*.
- Nazir, F., Hussain, A., Fariduddin, Q.** 2019. Interactive role of epibrassinolide and hydrogen peroxide in regulatin stomatal physiology, root morphology, photosynthetic and growth traits in *Solanum lycopersicum L.* under nickel stress. *Environmental and Experimental Botany*, 162 (479-495).
- Norouzi, S., Khademi, H., Faz Cano, A., Acosta, J.A.,** 2015. Using plane tree leaves for biomonitoring of dust borne heavy metals: a case study from Isfahan, Central Iran. *Ecol. Indic.* 57, 64e73.
- Oliveira, F. C.; Mattiazzo, M. E.** 2001. Mobilidade de metais pesados em um Latossolo Amarelo Distrofico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-acucar. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.58, n.4, p.807-812.
- Paz-Ferreiro, J. and Fu, S.** 2014. Biological indices for soil quality evaluation: perspectives and limitations, *Land Degrad. Dev.*, doi:10.1002/ldr.2262, in press.
- Rai. P.R.** 2016 Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129(2016)120–136.
- Raij, B. van; Andrade, J.C.; Cantarella, H.; Quaggio, J.A.** 2001 *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas Instituto Agrônômico. 285p.
- 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.
- Rieuwerts J. S.; Ashnore, M. R.; Farago, M. E.; Thornton, I.** 2006. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Science of the total Environment*, v.366, p.64–875.
- Rieuwerts, J.S.,** 2007. The mobility and bioavailability of trace metals in tropical soils: A review. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 19, 75–85.

- Sanchez-Lopes., Gonzalez R. C., Gonzalez-Chaves M.C. A, Rosas-Saito G. H., Vangronsvelt, J.,** 2015. Phytobarriers: Plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. *Environmental Pollution* (2015) 33e42.
- Santos, F. S.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Mazur, N.** 2006. Em *Nutrição Mineral de Plantas*; Fernandes, M. S., ed.; SBCS: Viçosa, cap. 16.
- Sarma, H.,** 2011. Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 118-138.
- Sheetal, K.R., Singh, S.D., Anand, A., Prasad, S.,** 2016. Heavy metal accumulation and effects on growth, biomass and physiological processes in mustard. *Indian J. Plant Physiol.* 21, 219–223.
- Smolders E., Degryse F.** 2006. Fixation of cadmium and zinc in soils: implication for risk assessment. In: *Natural Attenuation of Trace Element Availability in Soils*, eds. R. Hamon, M. McLaughlin, E. Lombi, 157–171, Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- Soares C. R. F. S.; Accioly A.M.A.; Marques T.C.L.L.S.M.; Siqueira J.O.; Moreira F. M. S.** 2001. Content and distribution of heavy metals in roots, stems and leaves of tree seedlings in soil contaminated by zinc industry wastes. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(3): 302-315.
- Song, Y., Maher, B.A., Li, F., Wang, X., Sun, X. & Zhang, H.** 2015. Particulate matter deposited on leaf of five evergreen species in Beijing, China: Source identification and size distribution. *Atmospheric Environment* 105: 53-60.
- Tomašević, M., Aničić, M., Jovanović, L., Perić-Grujić, A., Ristić, M.,** 2011. Deciduous tree leaves in trace elements biomonitoring: A contribution to methodology. *Ecol. Indic.* 11, 1689–1695.
- Wang, R.-H., Zhu, X.-F., Qian, W., Zhao, M.-H., Xu, R.-K., Yu, Y.-C.,** 2016. Adsorption of Cd (II) by two variable-charge soils in the presence of pectin. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 12976–12982.
- Wu, J., Lu, J., Li, L., Min, X., Luo, Y.,** 2018. Pollution, ecological-health risks, and sources of heavy metals in soil of the northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *Chemosphere* 201, 234–242.

V. CAPÍTULO 3

Capacidade Antioxidante e a formação de Espécies reativas de oxigênio em espécies arbóreas da Mata atlântica em solo contaminado com Ni e Zn.

Solange E. Brandão ¹, Geane Martins ¹, Mirian C. S. Rinaldi ¹, Marisa Domingos ¹

1- Instituto de Botânica, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, Brazil

Capacidade Antioxidante e a formação de Espécies reativas de oxigênio em espécies arbóreas da Mata atlântica em solo contaminado com Ni e Zn.

Resumo

A poluição atmosférica causada por partículas tornou-se um grande problema ambiental. Dentre os metais pesados encontrados no material particulado podemos destacar Ni e Zn, provenientes de atividades antrópicas. Os metais podem ser absorvidos pelas plantas pela absorção radicular podendo ocasionar o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando diversas alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas. Assim, o presente estudo foi proposto com o objetivo de testar experimentalmente a seguinte hipótese: As espécies pioneiras arbóreas têm um maior potencial de acúmulo de metais pesados do solo (conforme demonstrado no capítulo anterior) e apresentam maior potencial de tolerância ao estresse imposto pelos mesmos, do que espécies não pioneiras. O experimento foi realizado com três espécies arbóreas pioneiras (Pi; *Croton floribundus* Spreng., *Inga sessilis* (Vell.) Mart. e *Rapanea ferrugínea* (Ruiz & Pav.) Mez) e três não pioneiras (NPi; *Eugenia uniflora* L., *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer) nativas da Mata Atlântica. Estas foram crescidas em solo coletado em fragmento urbano de Mata Atlântica por 90 dias, com adubação balanceada (controle) e em solo enriquecido de Ni, Zn e Ni+Zn, alcançando concentrações três vezes mais altas do que as propostas pela CETESB para prevenção de riscos associados à contaminação de solos (30 e 86 mg kg de solo para Ni e Zn respectivamente). Foram realizadas coletas de folhas para análise de antioxidantes (ácido ascórbico, glutathione, catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase), indicadores de danos oxidativos malondialdeído (MDA), hidroperoxidienos conjugados (HPCD) e extravasamento de eletrólitos (EE), espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), teores de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides). As espécies arbóreas apresentaram características bioquímicas diferentes entre si e respostas semelhantes à exposição a níquel e zinco. Análises de componentes principais nos permitiram verificar o grau de tolerância das espécies ao estresse oxidativo induzido por Ni e/ou Zn, da seguinte forma: *R. ferrugínea* (Pi) (alta TCR (altura e diâmetro), GSH/GSG+GSSG, GR e APX) = *E. uniflora* (NPi) (GSH/GSG+GSSG, GR e APX) > *I. sessilis* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e APX) > *C. floribundus* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e carotenoides) > *E. leiocarpa* (NPi) (alta TCR (raiz), SOD e CAT) > *O. odorífera* (NPi) (SOD, GR e CAT).

Palavras chaves: EROs, antioxidantes, danos bioquímicos, Ni, Zn e pioneira e não pioneiras

V.1. INTRODUÇÃO

Os poluentes atmosféricos podem incluir gases e material particulado (MP), que podem ter um impacto adverso no meio ambiente (Lelieveld *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019) e até na saúde humana (Castañeda *et al.*, 2017). O número de estudos sobre MP atmosférico tem aumentado acentuadamente nas últimas duas décadas o que está relacionado à rápida urbanização e industrialização em todo o mundo (Fuzzi *et al.*, 2015). A poluição atmosférica causada por partículas tornou-se um grande problema ambiental em alguns países em desenvolvimento e em muitas cidades dos países desenvolvidos (Chen *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015). Desde a década de 1930, a deposição de MP na vegetação tem sido observada e estudada (Cai *et al.*, 2017). Mais recentemente, aumentou o interesse no papel das florestas urbanas na remoção de MPs da atmosfera (Abhijith K.V. *et al.*, 2017; Janhäll, 2015). Essas partículas do material particulado são constituídas por uma mistura complexa de água, carbono elementar, carbono orgânico, metais pesados e poeira de minerais, cátions e ânions (Li *et al.*, 2013). Miranda *et al.*, 2018 identificaram Na, Al, Si, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, nitrato, sulfato e amônio como os principais componentes do material particulado coletado na região metropolitana de São Paulo, os quais foram relacionados às emissões dos veículos e ressuspensão do solo e poeira do pavimento.

Dentre os metais pesados encontrados no material particulado podemos destacar Ni e Zn, provenientes de atividades antrópicas. Em áreas urbanas, esses metais oriundos da queima de combustíveis fósseis pela frota veicular representam uma fonte particularmente importante de poluição (Kabata-Pendias, 2011; Calvo *et al.*, 2013).

No solo, os metais podem ser absorvidos pelas plantas ou lixiviados, contaminando as águas subterrâneas (Pierangeli *et al.*, 2005). Vale destacar que os metais no solo estão presentes nas formas de íons livres, de complexos solúveis, de íons trocáveis. Os metais podem também estar ligados organicamente ou formar compostos insolúveis como óxidos, carbonatos e hidróxidos no solo (Taiz & Zeiger, 2006; Alloway, 2013; Birani *et al.* 2015).

O níquel pode ser absorvido pelas raízes das plantas por difusão passiva e transporte ativo (Seregin e Kozhevnikova, 2006). Ambos os mecanismos de absorção dependem de vários fatores como forma de Ni, espécies vegetais, concentração de Ni no substrato, pH do solo, metabolismo do vegetal e conteúdo orgânico no solo (Vogel-Mikuš *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Mas, a concentração excessiva de Ni pode levar à redução do crescimento e da plasticidade das paredes celulares e a perturbações nas relações hídricas, como osmose e difusão, condutância estomática, taxa de transpiração entre outros (Seregin e Kozhevnikova 2006, Shi e Cai 2009, Velikova *et al.* 2011).

O zinco é absorvido pelas raízes na forma Zn^{2+} , de forma ativa, por um transportador como ZNT1, identificado por Pence *et al.* (2000). Da mesma forma que é absorvido o Zn sofre transporte radial de forma passiva e ativa, em seguida tem-se o transporte a longa distância, das raízes para a parte aérea pelo xilema (Malavolta, 2006). Os efeitos da sua toxicidade nas plantas incluem inibição do crescimento, clorose e necrose foliar, estresse oxidativo, inibição das funções das proteínas e comprometimento da fotossíntese, promovendo a redução de rendimento de transporte de elétrons no fotossistema II (PSII) e da biossíntese de pigmentos (Todeschini *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2017).

A concentração excessiva desses íons metálicos tóxicos leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células vegetais, incluindo H_2O_2 , $O^{\cdot 2}$ e OH^{\cdot} , o que induz o estresse oxidativo (Gajewska *et al.*, 2006; Khaliq *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). A peroxidação lipídica e degradação da membrana são as consequências comuns das EROs. Elas induzem dano oxidativo a lipoproteínas de membrana, resultando na perda de eletrólitos (Dat *et al.*, 2000; Verma e Dubey, 2003; Wang *et al.*, 2008; Anjum *et al.*, 2016c; Tanveer *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018).

Alternativamente, as células vegetais são capazes de controlar o excesso de íons metálicos e utilizam vários mecanismos de desintoxicação para evitar sua participação em reações tóxicas. Na primeira linha de defesa, as plantas utilizam estratégias que impedem ou reduzem a captação, restringindo os íons metálicos ao apoplasto, ligando-os à parede celular ou aos exsudatos celulares,

ou impedindo o transporte de longa distância (Manara, 2012; Hasan *et al.*, 2015). Por outro lado, quando presentes em concentrações elevadas, as células ativam uma complexa rede de estratégias de armazenamento e desintoxicação, como quelação de íons metálicos com fitoquelatinas e metalotioneínas no citosol, tráfico e sequestro no vacúolo por transportadores vacuolares (Zhao e Chengcai, 2011). Podem também apresentar diferentes níveis de tolerância ao estresse oxidativo gerado pelos metais pesados, por possuírem variados mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa (Kramer 2010; Agrawal *et al.*, 2011). Portanto, a capacidade das plantas para lidar com o estresse oxidativo é caracterizada pelo grau de atividades antioxidantes (Anjum *et al.*, 2015; Shahzad *et al.*, 2018). No entanto, as atividades desses antioxidantes podem variar de acordo com a duração do estresse, espécies de culturas e partes de plantas sob quaisquer condições de estresse (Anjum *et al.*, 2017). Dentre os compostos antioxidantes, podemos citar as substâncias não enzimáticas de baixo peso molecular como ácido ascórbico e glutathione, e enzimáticas como as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase, todas pertencentes ao ciclo ascorbato-glutathione (Baier *et al.* 2005, Bray *et al.* 2000, Tausz *et al.* 2003, Favaretto *et al.* 2011). A glutathione reduzida (GSH) possui um papel importante na desintoxicação dos metais pesados, pois esta serve como substrato para as fitoquelatinas, por meio de uma reação catalisada pela enzima γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase, conhecida como fitoquelatina sintase, que é ativada pela presença de metais pesados (Grill *et al.*, 1989).

As árvores vêm desempenhando um papel preponderante na circulação de metais pesados nos ecossistemas florestais, por funcionarem como anteparos ao material particulado atmosférico enriquecidos de metais (Sánchez-López *et al.* 2015; Song *et al.* 2015; Rai 2016) e por sua capacidade de absorvê-los naturalmente do solo (Naidu *et al.*, 2001; Sarma *et al.*, 2011). Dentro dos ecossistemas florestais brasileiros afetados pela deposição do material particulado, podemos citar a Mata Atlântica, que está reduzida a pequenas ilhas de vegetação inseridas em áreas agrícolas e urbanas. Os fragmentos urbanos desse bioma vêm sendo afetados pela deposição de material particulado enriquecido de Ni e

Zn proveniente da emissão veicular (Nakazato *et al.* 2020). Estudos realizados por Brandão *et al.* 2017 e Esposito *et al.* 2018 em fragmentos de Mata Atlântica com espécies arbóreas adultas pertencentes a grupo funcionais distintos (pioneira e não pioneiras) em ambientes naturais, mostraram que as espécies pioneiras possuem um maior nível de tolerância ao estresse oxidativo, imposto por condições climáticas e poluição atmosférica.

Com base nesses estudos levantamos a hipótese que as espécies pioneiras arbóreas, que têm maior potencial de acúmulo de metais pesados do solo (conforme demonstrado no capítulo anterior), apresentam maior potencial de tolerância ao estresse imposto pelos mesmos, do que espécies não pioneiras. Este estudo teve por objetivo determinar experimentalmente o nível de tolerância de espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras nativas da Mata Atlântica ao Ni e Zn adicionados ao solo, por meio da análise das defesas antioxidantes (ácido ascórbico, glutatona, catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase), indicadores de danos oxidativos malondialdeído (MDA), hidroperóxidos conjugados (HPCD) e extravasamento de eletrólitos (EE), espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), teores de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides).

V.2. MATERIAL E MÉTODOS

V.2.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Instituto de Botânica, localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), localizado na zona sul da cidade de São Paulo. Este local contém um importante fragmento urbano de Mata Atlântica, de onde o solo foi retirado para realização deste experimento.

O nível de tolerância das espécies arbóreas pioneiras e não pioneiras da Mata Atlântica no Estado de São Paulo foi determinado ao final de 90 dias do experimento descrito detalhadamente no capítulo anterior (páginas 42 a 43). Em síntese, as três espécies pioneiras incluídas no estudo foram *Croton floribundus* Spreng., *Inga sessilis* (Vell.) Mart. e *Rapanea ferrugínea* (Ruiz & Pav.) Mez e três não pioneiras (*Eugenia uniflora* L., *Esenbeckia leiocarpa* Engl. e *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer, pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Primulaceae, Myrtaceae, Rutaceae e Lauraceae, respectivamente. As plantas obtidas no viveiro de mudas da Companhia Energética de São Paulo (CESP), localizado em Paraibuna, SP, foram transplantadas para vasos com capacidade de 1,7 L, contendo solo superficial (camada de 0 a 20 cm de profundidade, excluindo a camada de serapilheira) coletado no fragmento florestal do PEFI. Após uma semana de plantio, todas as plantas receberam 100 ml de solução nutritiva contendo macro nutrientes e micronutrientes, conforme sintetizado para o tratamento controle na Tabela 2 incluída no capítulo 01(Pag.20).

Após passarem por um período de adaptação de 1 mês, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos aplicados ao solo contido nos vasos: 1) controle com adubação balanceada; 2) adubação balanceada acrescida de maior dosagem de Zn; 3) adubação balanceada acrescida de Ni; tratamento com adubação balanceada acrescida de maiores dosagens de Ni e Zn. Esses tratamentos também são referidos neste capítulo como T_C (tratamento controle adubado), T_{Zn} (tratamento zinco), T_{Ni} (tratamento níquel) e T_{ZnNi} (tratamento níquel+zinco) para apresentação dos resultados.

V.2.2 Análises Bioquímicas

Ao final do experimento, foram coletadas as folhas inseridas no 3º ou 4º nós do caule principal das plantas, formando 05 amostras compostas de cada tratamento e espécie. As folhas foram imediatamente trituradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C, até o momento da realização das análises bioquímicas, que incluíram defesas antioxidantes não enzimáticos (ácido ascórbico, glutathione), antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase), indicadores de danos oxidativos (malondialdeído, hidroperóxido dienos conjugados, e extravasamento de eletrólitos), pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) e espécies reativas de oxigênio (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila). Antes do início da rotina analítica, os métodos foram testados e ajustados para as espécies estudadas, quando necessário. Cada amostra composta foi analisada em triplicata de acordo com as metodologias descritas abaixo.

V.2.2.1 Antioxidantes não enzimáticos

Ácido ascórbico: as formas reduzidas (AA), oxidada (DHA) e total (AA + DHA) foram obtidas por meio de cromatografia líquida com detector UV, a 245 nm. A separação foi realizada em coluna C18, com uma vazão de 1,00mL/min, utilizando-se fase móvel solução aquosa acidificada (pH 2,3) com ácido ortofosfórico (H₃PO₄). Os extratos vegetais para determinação de AA foram preparados com ácido metafosfórico (HPO₃) e EDTA. Para análise do ácido ascórbico total, aos extratos vegetais foi adicionado dithiothreitol (DTT) em tampão de fosfato de sódio pH 7,0 e fosfato de potássio monobásico (K₂HPO₄) mantidos no escuro, para que ocorra a redução total do DHA para AA. O conteúdo de DHA foi calculado pela subtração entre AA total e AA reduzido (López *et al.* 2005). Foram calculadas as razões AA/AA+DHA, seguindo proposta de Burkey *et al.* (2006), para avaliar a capacidade de oxi-redução do ácido ascórbico.

Glutathione: Os conteúdos de glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (GSH + GSSG) foram obtidos em extratos preparados a partir de 0.500g de folhas homogeneizadas em ácido

sulfosalicílico 0,1%. Após centrifugação foram realizada duas reações e leituras em espectrofotômetro a 412nm. Para a primeira reação, para obtenção da GSH, ao extrato foi adicionado uma mistura de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,0 com 0,5mM de EDTA, e ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 3mM. Após 5 minutos foi realizada a leitura. Na segunda reação, para a obtenção de GSH total, nesta mesma mistura, foram adicionados glutathione redutase e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) 0,4mM. 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 foi calculada as razões GSH/GSH+GSSG, com a finalidade de determinar a capacidade de oxi-redução da glutathione.

V.2.2.2 Antioxidantes Enzimáticos

Enzimas: Para as análises das enzimas glutathione redutase, catalase e ascorbato peroxidase, amostras vegetais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5 contendo 1mM EDTA, 3mM DTT e 4% (p/v) de PVPP. O extrato resultante foi utilizado para os ensaios das atividades enzimáticas (Azevedo *et al.* 1998).

A atividade da glutathione redutase (GR) foi determinada como descrito por Smith *et al.* (1988), com modificações. Ao extrato vegetal foi inserido numa mistura de reação contendo tampão fosfato 100 mM pH 7,5, DTNB 1 mM, NADPH 0,1 mM e glutathione 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, e 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). A temperatura de 25°C, ao extrato vegetal foi adicionado em uma mistura de reação de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 contendo H₂O₂ 30%. A reação foi 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 analisada pela metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), com modificações. A mistura de reação consistia de tampão fosfato 80 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 5 mM e H₂O₂ 2 mM. A reação foi iniciada com a adição do extrato vegetal à mistura. A atividade foi medida em espectrofotômetro a 290 nm, por meio da decomposição do H₂O₂.

Para a determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD), o material vegetal foi homogeneizado com PVPP e solução tampão fosfato 50 mM pH 7,5 contendo EDTA-Na₂ 1 mM, NaCl 50 mM e ácido ascórbico 1 mM. Extratos foram preparados adicionando-se ao sobrenadante EDTA-Na₂ 0,54 mM, tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, metionina 0,13 mM, azul p-nitrotetrazolio (NBT) 0,44 mM e riboflavina 1mM, e expostos a luz fluorescente (80 W) por 20 min. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro ($\lambda = 560$ nm) em ambos os tipos de extrato (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que consiste na inibição da redução do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido (Oswald *et al.* 1992).

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 ($\lambda = 595$ nm).

V.2.2.3 Indicadores de Danos Celulares

Malondialdeído (MDA): o método utilizado foi o proposto por Heath & Packer (1968) e Buege & Aust (1978), com algumas 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 um rápido resfriamento em gelo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.

Hidroperoxidienos conjugados (HPCD): a análise foi feita a partir da leitura em espectrofotômetro dos extratos etanólicos dos pigmentos a 234 nm e o conteúdo de HPCD foi calculado a partir da fórmula $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levin & Pignata 1995).

Extravasamento de eletrólitos (EE): os danos celulares foram avaliados também por meio de extravasamento de eletrólitos, conforme descrito por Lima *et al* (2002). Para isso, 10 discos de 1,2 cm foram colocados em 15 mL de água miliQ e deixados por 6 horas em temperatura ambiente (média de 25°C). A condutância inicial (Ci) foi estimada utilizando um condutivímetro. Após essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em estufa a 90°C por 2 horas e feita uma segunda leitura (Cf). A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $Ci/(Ci+Cf) \times 100$ (Tarhanen *et al*, 1999) e o resultado foi expresso em percentagem.

V.2.2.4 Espécies reativas de oxigênio

Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$): A taxa de produção de O_2 foi determinada pelo método de oxidação da hidroxilamina (Wang e Luo, 1990) com algumas modificações. Cerca de 0,1 g de amostras foliar foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 65 mmol (pH 7,8). A solução foi então centrifugada a 5.000 rpm, durante 15 min. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado com tampão fosfato de potássio 65 mmol (pH 7,8) e cloreto de hidroxilamina 10 mmol. A mistura homogeneizada foi aquecida durante 20 min a 25 ° C. Adicionou-se cerca de 1 ml de ácido 3-aminobenzenossulfônico e 1 ml de 1-naftilamina. A mistura foi aquecida durante 20 min a 25 ° C, o sobrenadante final foi usado para medir a absorvância a 530 nm.

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 = 390 nm (Alexieva *et al.* 2001).

Radical hidroxila ($\bullet OH$): para determinação da radical hidroxila, foi utilizado o método da desoxirribose (Halliweel, 1987) com algumas modificações. Onde 0,1 g de amostras foliar foram homogeneizadas em 2-Deoxi-D-Ribose (15mM), centrifugado a 5.000 rpm por 20 min. Após centrifugação 1 ml do sobrenadante foi aquecido durante 02 horas a 40°C. após incubação foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (1%) e 1 ml de ácido acético glacial. A mistura homogeneizada foi aquecida durante 30 min a 100°C. O sobrenadante final foi usado para medir a absorvância a 535 nm. 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. O radical foi expresso em porcentagem de inibição da oxidação da 2-Deoxi-D-Ribose com a seguinte formula: Scavenging activity (%)= $1-(As/Ac) * 100$, onde As= absorvância da amostra e Ac= Absorvância do controle.

V.2.2.5 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 fresca.

V.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças significativas entre tratamentos e respectivos controles e diferenças entre as espécies no mesmo tratamento, para cada parâmetro bioquímico analisado, foram identificadas utilizando a one way ANOVA, seguida por teste de comparações múltiplas (Tukey). Em todos os casos, quando necessário, os dados foram transformados em \log_{10} para atender os requisitos da ANOVA (distribuição normal e igualdade de variâncias).

Análises de componentes principais (ACP), utilizando o PC ORD (Versão 6.0) foram realizadas visando a ordenar as espécies em função do nível de tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo acúmulo foliar de Ni e/ou Zn. As ACP foram realizadas separadamente com conjuntos de dados obtidos em cada tratamento, incluindo as variáveis bioquímicas (AA/AA+DHA: potencial redox de ácido ascórbico; GSH/GSH+GSSG: potencial redox de glutathione; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; APX: ascorbato peroxidase; GR: glutathione redutase; Clo a/b: razão das clorofilas a e b; Carot: carotenoides; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; EE: extravasamento de eletrólitos; MDA: malondialdeído; $\bullet\text{OH}$: radical de hidroxila, $\text{O}_2\bullet^-$: radical superóxido; e H_2O_2 : peróxido de hidrogênio), assim como concentrações absolutas dos metais nas folhas e taxas de crescimento relativo das plantas (dados apresentados no capítulo 2). Todas as variáveis foram transformadas em \log_{10} para normalizar os dados.

V.4. RESULTADOS

Os indivíduos da espécie *O. odorifera* tratados com a combinação de níquel e zinco (T_{NiZn}) morreram ao final do tratamento, não sendo possível analisá-los quanto às variáveis bioquímicas.

A tabela 1 mostra a variação da concentração de ácido ascórbico e glutathiona em suas formas reduzida e oxidada e respectivas razões nas espécies expostas aos quatro tratamentos.

O conteúdo de ácido ascórbico variou significativamente somente nas plantas de *R. ferruginea* (Pi) e *C. floribundus* (Pi) tratadas com acréscimo de Ni no solo em comparação com os valores encontrados nas plantas do tratamento controle (T_C). *R. ferruginea* (Pi) mostrou um maior conteúdo de ácido ascórbico em sua forma reduzida e *C. floribundus* (Pi) apresentou um aumento no conteúdo na forma oxidada, assim como uma menor razão AA/AA+DHA (Tabela 1).

A concentração de ácido ascórbico variou entre as espécies e geralmente de forma similar nos quatro tratamentos. *I. sessilis* (Pi) e *E. leiocarpa* (NPi) mostraram o menor conteúdo e *R. ferruginea* o maior conteúdo de AA. *O. odorifera* (NPi) e *E. leiocarpa* (NPi) apresentaram altos teores de DHA e menor razão AA/AA+DHA; o inverso foi observado nas plantas de *C. floribundus* (Tabela 1).

Assim como para o ácido ascórbico, os conteúdos de glutathiona também variaram entre as espécies e entre tratamentos com acréscimo dos metais e tratamento controle. A variação no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e na razão GSH/GSH+GSSG entre tratamentos com metais (T_{Ni} , T_{Zn} ou T_{NiZn} versus T_C) não foi significativa apenas em *E. uniflora* (NPi). As plantas de *C. floribundus* (Pi), *I. sessilis* (Pi), *E. leiocarpa* (NPi) e *O. odorifera* (NPi) apresentaram um menor conteúdo de GSH quando crescidas em solo com o acréscimo dos metais em comparação com as plantas do T_C . Houve aumento do conteúdo de GSSG nas plantas de *C. floribundus*, *R. ferruginea* e *E. leiocarpa* crescidas em T_{Ni} , T_{Zn} e T_{NiZn} , em relação aos valores encontrados em T_C . Porém, a razão GSH/GSH+GSSG foi reduzida significativamente apenas nas plantas de *C. floribundus* expostas ao excesso de metais quando comparada à razão estimada para as plantas do T_C . (Tabela 1).

As maiores concentrações foliares de GSH foram obtidas em plantas de *R. ferruginea* e as menores em *I. sessilis*. *C. floribundus* apresentou o maior conteúdo de GSSG e a menor razão GSH/GSH+GSSG, contrastando com *E. uniflora*, que mostrou o mais baixo teor de GSSG e a mais alta razão GSH/GSH+GSSG em todos os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de ascórbico reduzido (AA- mg.g⁻¹), oxidado (DHA- mg.g⁻¹), razão AA/AA+DHA, glutathiona reduzida (GSH- mg.g⁻¹), oxidada (GSSG- mg.g⁻¹) e razão GSH/GSH+GSSG em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as espécies dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre T_{Ni}, T_{Zn} ou T_{NiZn} e T_C, para a mesma espécie (p < 0,05).

Tratamentos		AA	DHA	AA/AA +DHA	GSH	GSSG	GSH/GSH +GSSG
<i>C. floribundus</i> (Pi)	T _C	1.1 Ab	0,5 Bc	0,7 Aa	25,0 Ab	18,9 Ba	0,5 Ac
	T _{Ni}	1,1Ab	2,1 Ab	0,5 Ba	16,3 Bb	42,0 Aa	0,3 Bc
	T _{Zn}	1,2Ab	0,6 Bc	0,7 Aa	15,5 Bb	40,6 Aa	0,3 Bc
	T _{Ni Zn}	1,1Ab	0,5 Bc	0,7 Aa	18,0 Bb	40,1 Aa	0,3 Bc
<i>I. sessilis</i> (Pi)	T _C	0,3Ac	1,6 Ab	0,2 Ab	14,6 Ab	22,2 Ab	0,3 Ac
	T _{Ni}	0,4Ac	1,7 Ab	0,2 Ab	11,1 Bc	21,4 Ab	0,3 Ac
	T _{Zn}	0,6Ac	1,4 Ab	0,3 Ab	10,8 Bc	22,4 Ab	0,3 Ac
	T _{Ni Zn}	0,4Ac	1,4 Ab	0,2 Ab	7,6 Bc	24,4 Ab	0,2 Ac
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	T _C	2,3 Ba	1,2 Ab	0,7 Aa	37,6 Aa	9,1 Bc	0,8 Ab
	T _{Ni}	3,7 Aa	1,7 Ab	0,7 Aa	48,4 Aa	15,6 Ab	0,8 Aa
	T _{Zn}	2,6 Ba	1,2 Ab	0,7 Aa	40,3 Aa	18,0 Ab	0,7 Ab
	T _{Ni Zn}	3,2 Ba	1,4 Ab	0,7 Aa	44,8 Aa	15,8 Ab	0,8 Aa
<i>E. uniflora</i> (NPi)	T _C	1,6 Ab	0,8 Ac	0,7 Aa	27,5Ab	1,6 Ac	0,9 Aa
	T _{Ni}	1,5 Ab	0,8 Ac	0,6 Aa	28,9 Ab	1,5 Ac	1,0 Aa
	T _{Zn}	1,7 Ab	0,7 Ac	0,7 Aa	27,2 Ab	1,6 Ac	0,9 Aa
	T _{Ni Zn}	1,5 Ab	1,0 Ab	0,6 Ab	25,7 Ab	1,1 Ac	1,0 Aa
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	T _C	0,7 Ac	3,9 Aa	0,2 Ab	38,3 Aa	9,3 Bc	0,8 Aa
	T _{Ni}	0,7 Ac	4,3 Aa	0,2 Ab	25,8 Bb	27,5 Ab	0,4 Bb
	T _{Zn}	0,6 Ac	4,6 Aa	0,2 Ab	31,4 Bb	23,5 Ab	0,6 Bb
	T _{Ni Zn}	0,6 Ac	3,6 Aa	0,2 Ab	23,6 Bb	22,1 Ab	0,5 Bb
<i>O. odorifera</i> (NPi)	T _C	1,5 Ab	4,5 Aa	0,2 Ab	33,5 Ab	17,3 Ab	0,7 Ab
	T _{Ni}	1,2 Ab	4,0 Aa	0,2 Ab	22,0 Bb	22,7 Ab	0,5 Ab
	T _{Zn}	1,4 Ab	4,4 Aa	0,2 Ab	24,6 Bb	18,8 Ab	0,6 Ab
	T _{Ni Zn}	*	*	*	*	*	*

Na tabela 2, é apresentada a variação na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR), entre as espécies e entre tratamentos a que foram submetidas em comparação com o tratamento controle.

A atividade de CAT, APX e GR nas folhas das espécies arbóreas foi mais afetada pelos tratamentos T_{Ni} , T_{Zn} e T_{NiZn} , em comparação ao T_C , do que a de SOD, que foi reduzida significativamente apenas nas plantas de *E. uniflora* expostas no T_{Ni} . A exposição ao excesso de Ni (T_{Ni}) promoveu: aumento da atividade de CAT, APX e GR em *C. floribundus*, *I. sessilis* e *R. ferruginea*; aumento da atividade de CAT e GR e redução de APX em *E. uniflora*; redução da atividade da CAT e GR e aumento de APX em *E. leiocarpa* e aumento da atividade de APX e GR em *O. odorifera*. A exposição ao excesso de Zn (T_{Zn}) promoveu: aumento de APX e GR em *C. floribundus*; aumento da atividade de CAT e GR em *R. ferruginea*; aumento de CAT e redução de APX em *E. uniflora*; redução de CAT em *E. leiocarpa* e aumento de APX em *O. odorifera*. A exposição ao excesso de ambos os metais (T_{NiZn}) promoveu: aumento da atividade de APX e redução de CAT e GR em *C. floribundus*; aumento da atividade de CAT em *E. uniflora* e redução de CAT em *E. leiocarpa* (Tabela 2).

Ainda na tabela 2, verificou-se que houve variação entre as espécies para todas as enzimas. Tais variações foram geralmente similares nos quatro tratamentos. A atividade da SOD foi maior em *E. leiocarpa* e menor em *I. sessilis*, *R. ferruginea* e *E. uniflora*. A atividade da CAT tendeu a ser mais alta em *C. floribundus* e *O. odorifera* e mais baixa em *I. sessilis* e *E. leiocarpa*. A atividade da APX foi geralmente mais alta nas espécies *I. sessilis*, *R. ferruginea* e *E. uniflora* e mais baixa em *C. floribundus*. A atividade da GR foi mais alta para as plantas de *R. ferruginea* e mais baixa em *C. floribundus*.

Tabela 2. Valores médios da atividade de superóxido dismutase (SOD, unit/g⁻¹ dw), catalase (CAT, unidade/g⁻¹ dw), ascorbato peroxidase (APX, unit/g⁻¹ dw) e glutathione redutase (GR, unit/g⁻¹ dw) em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{Ni Zn}). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as espécies dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre T_{Ni}, T_{Zn} e T_{NiZn} em relação ao T_C, para a mesma espécie (p < 0, 05).

	<i>Tratamentos</i>	<i>SOD</i>	<i>CAT</i>	<i>APX</i>	<i>GR</i>
<i>C.floribundus (Pi)</i>	T _C	5,2 Ab	48,6 Bb	1,2 Bc	2,2 Ac
	T _{Ni}	4,3 Ab	85,4 Aa	2,6 Ac	1,2 Bc
	T _{Zn}	3,5 Ab	56,4 Ba	1,8 Ac	1,2 Bc
	T _{Ni Zn}	3,6 Ab	36,8 Ca	2,8 Ac	1,4 Bc
<i>I.sessilis (Pi)</i>	T _C	0,5 Ac	24,7 Bc	6,2 Bb	8,1 Bb
	T _{Ni}	0,2 Ac	42,3 Ab	15,7 Aa	10,9 Ab
	T _{Zn}	0,7 Ac	23,5 Bb	6,1 Bb	4,5 Bc
	T _{Ni Zn}	0,7 Ac	25,8 Ba	4,4 Bb	6,4 Bb
<i>R. ferruginea (Pi)</i>	T _C	1,6 Ab	18,8 Bc	7,3 Bb	21,6 Ba
	T _{Ni}	0,5 Ac	52,7 Ab	19,3 Aa	44,1 Aa
	T _{Zn}	1,1 Ac	55,7 Aa	7,6 Bb	31,9 Aa
	T _{Ni Zn}	0,8 Ac	19,2 Bb	6,9 Bb	13,4 Ba
<i>E. uniflora (NPi)</i>	T _C	1,4 Ab	23,7 Bc	15,4 Aa	31,1 Ba
	T _{Ni}	0,7 Bc	76,6 Aa	7,7 Bb	43,5 Aa
	T _{Zn}	1,2 Ac	44,5 Ab	7,2 Bb	24,7 Bb
	T _{Ni Zn}	1,3 Ac	47,3 Aa	15,6 Aa	24,2 Ba
<i>E. leiocarpa (NPi)</i>	T _C	11,3 Aa	69,9 Aa	5,7 Bb	9,3 Ab
	T _{Ni}	11,9 Aa	37,5 Bb	8,1 Ab	7,3 Bb
	T _{Zn}	12,1 Aa	49,1 Bb	4,9 Bb	9,7 Ac
	T _{Ni Zn}	16,0 Aa	34,6 Bb	3,8 Bc	13,7 Ab
<i>O. odorifera (NPi)</i>	T _C	4,6 Ab	63,9 Aa	0,5 Bc	15,2 Bb
	T _{Ni}	3,8 Ab	64,8 Aa	4,7 Ab	26,8 Aa
	T _{Zn}	5,5 Ab	75,2 Aa	1,6 Ac	15,5 Bb
	T _{Ni Zn}	*	*	*	*

Na tabela 3, são apresentados os valores médios encontrados para os indicadores de danos celulares oxidativos [conteúdos de hidroperóxidienos conjugados (HPCD) e malonaldeído (MDA) e percentagem de extravasamento de eletrólitos (EE)] nas plantas das espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos 4 tratamentos de solo.

Os indicadores de danos celulares mostraram variação entre as espécies e tratamentos com acréscimo dos metais quando comparados com o tratamento controle. Comparados aos valores obtidos nas plantas do T_C, os conteúdos de HPDC foram significativamente maiores em plantas de *C. floribundus*, *R. ferruginea* e *E. uniflora* crescidas nos 3 tratamentos com o acréscimo dos metais, de *I. sessilis* crescidas nos tratamentos T_{Ni} e T_{NiZn}, de *E. leiocarpa* expostas aos tratamentos T_{Zn} e T_{NiZn} e de *O. odorifera* expostas ao T_{Zn}. Houve aumento significativo da percentagem de extravasamento de eletrólitos, em relação à percentagem obtida nas plantas do T_C, em *C. floribundus* em todos os tratamentos com o acréscimo dos metais, em *I. sessilis* no T_{Zn} e em *R. ferruginea* (Pi) nos tratamentos T_{Ni} e T_{Zn}. Maior conteúdo de MDA, comparado ao valor encontrado nas plantas controle, foi observado nas plantas de *C. floribundus*, *I. sessilis*, *E. uniflora* e *E. leiocarpa* crescidas nos 3 tratamentos com o acréscimo dos metais e nas de *O. odorifera* expostas ao excesso de Zn. Não houve efeito significativo do excesso de metais na concentração foliar de MDA em *R. ferruginea*. Ainda, na tabela 3 é possível verificar a diferenças entre as espécies estudadas. O conteúdo de HPDC foi em geral maior nas espécies *E. uniflora*, *E. leiocarpa* e *O. odorifera* e menor em *C. floribundus*. A percentagem de extravasamento de eletrólitos não variou significativamente entre as espécies. O conteúdo de MDA foi maior nas espécies *C. floribundus* (Pi) e *E. leiocarpa* e mais baixo em *O. odorifera*.

Tabela 3. Valores médios da concentração de hidroperóxidienos conjugados (HPCD $\mu\text{mol/g}^{-1}$ dw) e malonaldeído (MDA, mM^{-1} dw) e de porcentagem de extravasamento de eletrólitos (EE %) e em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as espécies dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre T_{Ni} , T_{Zn} e T_{NiZn} em relação ao T_C , para a mesma espécie ($p < 0,05$).

	<i>Tratamentos</i>	<i>HPDC</i>	<i>MDA</i>	<i>EE</i>
<i>C. floribundus</i> (Pi)	T_C	8,8 Bb	45,4 Ba	15,9 Ba
	T_{Ni}	14,3 Ac	84,9 Aa	34,7 Aa
	T_{Zn}	16,2 Ac	97,0 Aa	33,2 Aa
	T_{NiZn}	16,0 Ac	94,6 Aa	41,3 Aa
<i>I. sessilis</i> (Pi)	T_C	14,5 Ba	27,0 Bb	16,0 Ba
	T_{Ni}	31,4 Ab	41,1 Ab	28,0 Ba
	T_{Zn}	29,3 Ab	37,1 Ab	32,3 Aa
	T_{NiZn}	35,0 Ab	38,3 Ab	28,8 Bb
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	T_C	9,4 Bb	36,5 Ab	19,0 Ba
	T_{Ni}	37,5 Ab	32,8 Ab	33,9 Aa
	T_{Zn}	39,8 Ab	36,5 Ab	35,0 Aa
	T_{NiZn}	38,2 Ab	32,0 Ab	28,7 Bb
<i>E. uniflora</i> (NPi)	T_C	27,4 Ba	18,4 Bc	18,1 Aa
	T_{Ni}	54,0 Aa	26,7 Ab	22,6 Aa
	T_{Zn}	53,3 Aa	32,4 Ab	21,5 Aa
	T_{NiZn}	53,0 Aa	34,5 Ab	24,2 Ab
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	T_C	32,6 Ba	14,2 Bc	19,9 Aa
	T_{Ni}	41,0 Bb	69,1 Aa	26,0 Aa
	T_{Zn}	44,5 Aa	109,4 Aa	29,5 Aa
	T_{NiZn}	45,1 Aa	112,4 Aa	28,6 Ab
<i>O. odorifera</i> (NPi)	T_C	27,1 Ba	15,3 Bc	19,6 Aa
	T_{Ni}	30,8 Bb	14,6 Bc	21,4 Aa
	T_{Zn}	32,3 Ab	34,1 Ab	21,8 Aa
	T_{NiZn}	*	*	*

Na tabela 4, são apresentados os valores médios do conteúdo das espécies reativas de oxigênio nas plantas das espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos 4 tratamentos de solo. Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos com o acréscimo dos metais e o tratamento controle e entre espécies.

Maior conteúdo foliar do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) foi verificado em *C. floribundus*, *I. sessilis*, *E. uniflora* e *E. leiocarpa* expostas aos tratamentos T_{Ni} , T_{Zn} e T_{NiZn} e em *O. odorifera* crescidas em T_{Ni} e T_{Zn} . A concentração de $\cdot\text{OH}$ em plantas de *R. ferruginea* não variou entre tratamentos. Em relação aos valores encontrados no T_{C} , as concentrações foliares do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foram significativamente mais altas em plantas de *C. floribundus*, *R. ferruginea* e *E. leiocarpa* crescidas em todos os tratamentos com acréscimo dos metais e nas plantas de *O. odorifera* expostas ao excesso de Zn. A concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ não variou entre tratamentos para *I. sessilis* e *E. uniflora*. As plantas de *I. sessilis*, *R. ferruginea*, *E. uniflora* e *E. leiocarpa* apresentaram um maior conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em todos tratamentos com o acréscimo dos metais no solo. As plantas de *O. odorifera* expostas ao excesso de Ni e Zn igualmente apresentaram maior conteúdo foliar de H_2O_2 do que as plantas controle. A concentração de H_2O_2 nas mudas de *C. floribundus* foi similar em todos os tratamentos (Tabela 4).

O conteúdo de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) foi significativamente mais alto nas plantas de *C. floribundus* e mais baixo nas de *R. ferruginea*. O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi também encontrado em maior nível em *C. floribundus*, comparado às demais espécies. O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi de modo geral maior nas espécies não pioneiras do que nas pioneiras (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da concentração do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$, degradação oxidativa 2'-desoxyribose % dw), radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$, nmol/g dw), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $\mu\text{mol/g dw}$), em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_Ni), zinco (T_Zn) e níquel + zinco ($\text{T}_\text{Ni Zn}$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as espécies dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre T_Ni , T_Zn ou T_NiZn e T_C , para a mesma espécie ($p < 0,05$).

	Tratamentos	$\bullet\text{OH}$	$\text{O}_2\bullet^-$	H_2O_2
<i>C. floribundus</i> (Pi)	T_C	19,7 Ba	6,8 Ba	0,7 Ab
	T_Ni	79,1 Aa	24,0 Aa	1,2 Aa
	T_Zn	85,3 Aa	25,9 Aa	1,0 Ab
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	80,9 Aa	21,5 Aa	1,1 Ab
<i>I. sessilis</i> (Pi)	T_C	20,0 Ba	5,2 Ab	0,5 Bb
	T_Ni	30,2 Ac	4,9 Ab	0,9 Ab
	T_Zn	35,6 Ab	5,1 Ab	0,8 Ab
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	43,4 Ab	6,3 Ab	0,9 Ab
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	T_C	20,0 Aa	3,5 Bb	0,2 Bc
	T_Ni	29,5 Ac	12,2 Ab	0,3 Ab
	T_Zn	28,0 Ac	10,4 Ab	0,3 Ac
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	31,2 Ac	8,9 Ab	0,3 Ab
<i>E. uniflora</i> (NPi)	T_C	17,2 Ba	4,5 Ab	1,5 Ba
	T_Ni	40,4 Ab	5,7 Ab	3,4 Aa
	T_Zn	39,5 Ab	5,6 Ab	3,2 Aa
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	41,9 Ab	4,9 Ab	4,3 Aa
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	T_C	17,8 Ba	5,7 Ba	1,5 Ba
	T_Ni	55,6 Ab	9,5 Ab	2,7 Aa
	T_Zn	32,5 Ab	11,1 Ab	2,3 Aa
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	41,3 Ab	9,6 Ab	3,1 Aa
<i>O. odorifera</i> (NPi)	T_C	16,4 Ba	5,9 Bb	1,0 Ba
	T_Ni	35,1 Ac	8,5 Bb	1,8 Aa
	T_Zn	48,3 Ab	13,1 Aa	3,6 Aa
	$\text{T}_\text{Ni Zn}$	*	*	*

Na tabela 5, é mostrada a variação no conteúdo de clorofila *a*, *b*, razão *Clo a/b* e conteúdo de carotenoides em plantas de espécies pioneiras e não pioneiras crescidas nos 4 tratamentos. O conteúdo de *Clo a* foi significativamente menor em plantas de *R. ferruginea* e *E. leiocarpa* (NPi) tratadas com excesso Ni no solo (T_Ni) do que nas plantas do T_C . A concentração de *Clo b* foi menor nas plantas de *R. ferruginea* crescidas nos tratamentos T_Ni e T_Zn e de *O. odorifera* crescidas no T_Zn do que nas do

T_C. Consequentemente, a razão *Clo a/b* foi maior em plantas de *C. floribundus* e *R. ferruginea* (Pi) expostas ao excesso de Ni e da combinação de Ni e Zn e menor nas mudas de *E. leiocarpa* expostas ao T_{Ni} do que a razão estimada nas plantas do T_C. O conteúdo de carotenoides não apresentou variação entre tratamentos para as espécies estudadas.

Houve pouca variação entre as espécies estudadas com relação ao conteúdo de pigmentos. *I. sessilis* mostrou menor conteúdo de *Clo a* do que as demais espécies somente no tratamento T_{NiZn}. *E. uniflora* apresentou menor conteúdo de *Clo a* e menor razão *Clo a/b* nos tratamentos T_{Zn} e T_{NiZn}, assim como menor conteúdo de *Clo b* e carotenoides no tratamento T_{NiZn}. *E. leiocarpa* apresentou um menor conteúdo de *Clo a* nos tratamentos T_{Zn} e T_{NiZn}, *Clo b* no tratamento T_{Zn} e menor conteúdo de carotenoides nos tratamentos T_C, T_{Ni} e T_{NiZn}.

Tabela 5. Valores médios de concentração de clorofilas a e b (*Clo a*, *Clo b* mg/g⁻¹ dw), razão *Clo a/b* e concentração de carotenoides (*Carot.*, mg/g⁻¹ dw) em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi) crescidas nos tratamentos controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{Ni Zn}). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as espécies dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre T_{Ni}, T_{Zn} ou T_{Ni Zn} e T_C, para a mesma espécie (p < 0,05).

	<i>Tratamentos</i>	<i>Clo a</i>	<i>Clo b</i>	<i>Clo a/b</i>	<i>Carot.</i>
<i>C.floribundus (Pi)</i>	T _C	2.0 Aa	1.1 Aa	2.0 Ba	0.4 Aa
	T _{Ni}	2.1 Aa	0.9 Aa	2.4 Aa	0.3 Aa
	T _{Zn}	2.2 Aa	1.2 Aa	2.1 Ba	0.5 Aa
	T _{Ni Zn}	2.0 Aa	0.9 Aa	2.4 Aa	0.6 Aa
<i>I.sessilis (Pi)</i>	T _C	2.1 Aa	0.9 Aa	2.7 Aa	0.4 Aa
	T _{Ni}	1.9 Aa	0.7 Aa	2.8 Aa	0.4 Aa
	T _{Zn}	2.1 Aa	0.8 Aa	2.8 Aa	0.4 Aa
	T _{Ni Zn}	1.9 Ab	0.7 Aa	2.8 Aa	0.4 Aa
<i>R. ferruginea (Pi)</i>	T _C	2.6 Aa	1.3 Aa	2.1 Ba	0.5 Aa
	T _{Ni}	1.9 Ba	0.6 Ba	3.3 Aa	0.4 Aa
	T _{Zn}	2.5 Aa	0.7 Ba	4.0 Aa	0.5 Aa
	T _{Ni Zn}	2.3 Aa	0.9 Aa	2.5 Ba	0.5 Aa
<i>E.uniflora (NPi)</i>	T _C	1.8 Aa	1.0 Aa	2.0 Aa	0.3 Aa
	T _{Ni}	1.6 Aa	0.6 Aa	2.3 Aa	0.4 Aa
	T _{Zn}	1.5 Ab	0.8 Aa	2.0 Ab	0.3 Aa
	T _{Ni Zn}	1.3 Ab	0.6 Ab	2.2 Ab	0.2 Ab
<i>E. leiocarpa (NPi)</i>	T _C	2.0 Aa	0.7 Aa	3.1 Aa	0.2 Ab
	T _{Ni}	1.3 Ba	0.7 Aa	2.2 Ba	0.2 Ab
	T _{Zn}	1.6 Ab	0.6 Ab	3.1 Aa	0.5 Aa
	T _{Ni Zn}	1.5 Ab	0.6 Aa	2.5 Aa	0.2 Ab
<i>O. odorifera (NPi)</i>	T _C	2.0 Aa	1.0 Aa	2.1 Aa	0.3 Aa
	T _{Ni}	1.8 Aa	0.8 Aa	2.3 Aa	0.2 Aa
	T _{Zn}	1.7 Aa	0.7 Ba	2.6 Aa	0.4 Aa
	T _{Ni Zn}	*	*	*	*

As espécies foram ordenadas em função do nível de tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo acúmulo foliar de Ni e/ou Zn, utilizando-se análises de componentes principais (ACP), aplicadas aos conjuntos de dados provenientes de cada tratamento. Os resultados das ACP foram apresentados na Figura 1 e tabelas 6 e 7.

A ACP (figura 1) realizada com dados obtidos para as plantas crescidas no tratamento controle (T_C) resumiu 54% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 34%; eixo 2: 20%). Para as plantas crescidas em solo com excesso níquel (T_{Ni}), a ACP resumiu 50% da variabilidade conjunta dos dados nos dois primeiros eixos (eixo 1: 27%; eixo 2: 23%). Para as plantas crescidas em solo com excesso de zinco (T_{Zn}), a ACP resumiu 45% da variabilidade conjunta dos dados nos dois primeiros eixos (eixo 1: 28%; eixo 2: 17%). Para as plantas crescidas em solo com a combinação de níquel e zinco ($T_{Ni\ Zn}$), a ACP resumiu 59% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros eixos de ordenação (eixo 1: 36%; eixo 2: 23%). As variáveis que mais caracterizaram os eixos de cada ACP foram destacadas em negrito ($r > 0,50$) na tabela 6.

As unidades amostrais que representam as espécies em cada tratamento foram separadas de forma significativa ($p < 0,001$) por um conjunto de variáveis indicadoras de tolerância ao estresse oxidativo e de danos celulares. As respostas ao estresse oxidativo das espécies foram semelhantes para o excesso de Ni, Zn e Ni+Zn, indicando características intrínsecas de cada espécie, como pode ser visto na ACP aplicada aos dados do tratamento controle. As variáveis que caracterizaram cada espécie em ambos os tratamentos foram: *C. floribundus* (Pi): altos níveis de Ni e Zn, altas taxas de crescimento em altura, diâmetro e biomassa da parte aérea, altas concentrações de carotenoides, $\bullet OH$ e $O_2^{\bullet -}$ e MDA e alta perda de eletrólitos; *I. sessilis* (Pi): altos níveis de Ni e Zn altas taxas de crescimento em altura, diâmetro e biomassa da parte aérea, alta razão clorofilas (a/b) e alta atividade de APX, altas concentrações de carotenoides, $\bullet OH$ e $O_2^{\bullet -}$ e alta perda de eletrólitos; *R. ferruginea*

(Pi): altas taxas de crescimento em altura e diâmetro, alta razão clorofilas (a/b) e GSH/GSH+GSSG, uma alta atividade de APX e GR e altas concentrações de carotenoides; *E. uniflora* (NPi): alta razão de GSH/GSH+GSSG e alta atividade de APX e GR; *E. leiocarpa* (NPi): altas taxas de crescimento relativo (raízes), alta atividade de enzimas SOD e CAT e alta concentração de H₂O₂, O₂[•] e MDA; *O.odorifera* (NPi): alta atividade de SOD, GR e CAT e alta concentração de H₂O₂, •OH e O₂[•].

Com base no conjunto de variáveis mais relevantes mostrados pelas ACPs, as espécies foram classificadas de acordo com seu nível de tolerância ao estresse oxidativo induzido por Ni e/ou Zn, da seguinte forma: *R. ferruginea* (Pi) = *E. uniflora* (NPi) > *I. sessilis* (Pi) > *C. floribundus* (Pi) > *E. leiocarpa* (NPi) > *O. odorifera* (NPi) (tabela 7).

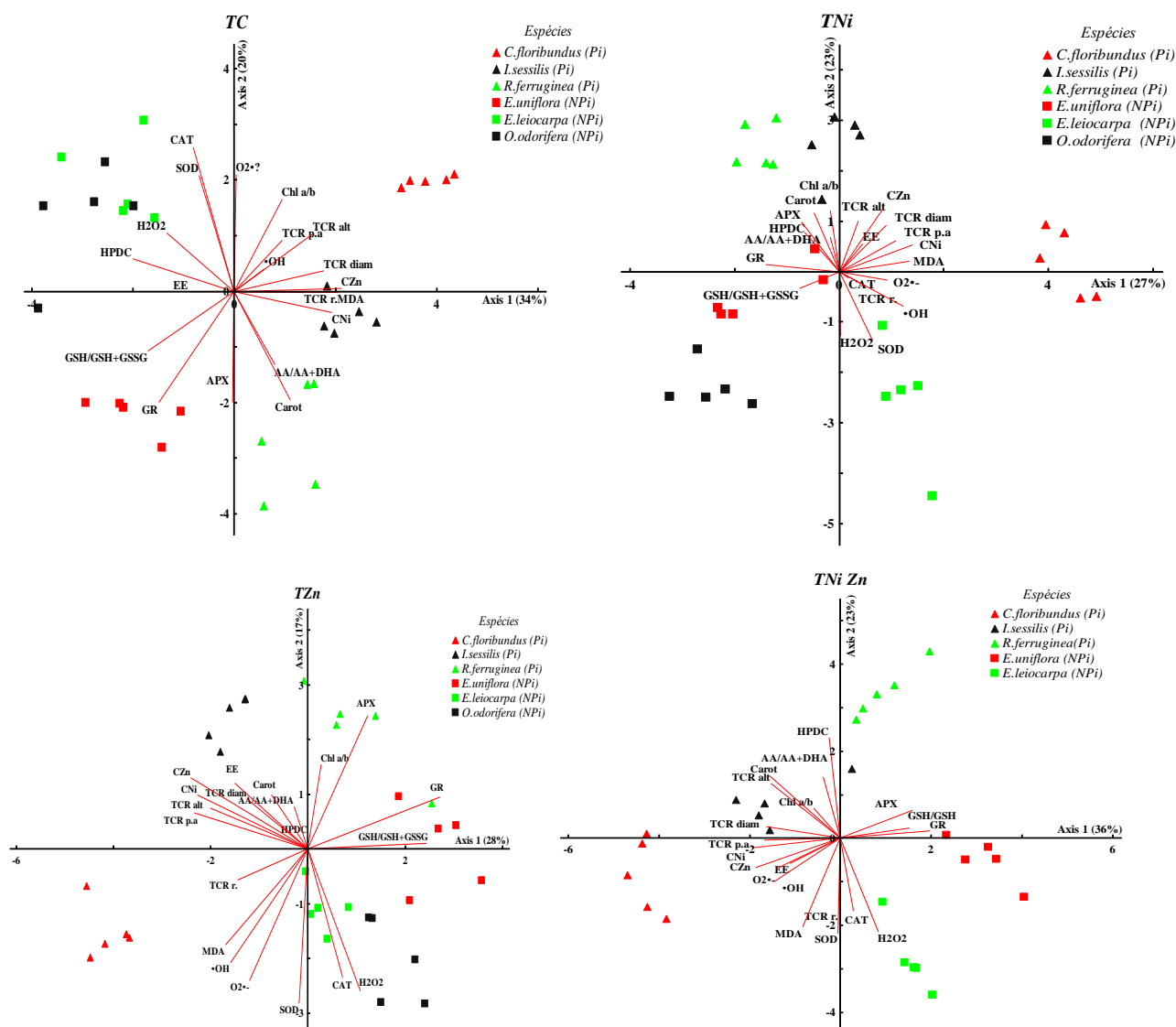


Figura 1. Representação gráfica da análise de componentes principais (ACP) para os tratamentos controle (Tc), com acréscimo de níquel (TNi), com acréscimo de zinco (TZn) e com a combinação de níquel e zinco (TNiZn), incluindo as variáveis analisadas em amostras de folhas de espécies pioneiras (Pi) e não pioneiras (NPi). CNI: conteúdo absoluto de Ni; CZn: conteúdo absoluto de Zn; TCR alt.: taxa de crescimento relativo em altura; TCR diam.: taxa relativa de crescimento em diâmetro do caule; TCR p.a.: taxa de crescimento em biomassa da parte aérea; TCR r. taxa de crescimento em biomassa de raiz; AA/AA+DHA: potencial redox de ácido ascórbico; GSH/GSH+GSSG: potencial redox de glutatona; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; APX: ascorbato peroxidase; GR: glutatona redutase; Clo a/b: razão das clorofilas a e b; Carot: carotenoides; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; EE: extravasamento de eletrólitos; MDA: malondialdeído; $\cdot OH$: radical de hidroxila, $O_2^{\cdot-}$: radical superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio

Tabela 6. Coeficientes de correlação de cada variável incluída nas ACPs representadas nas Figura 1 com os eixos 1 e 2. CNi: conteúdo absoluto de Ni; CZn: conteúdo absoluto de Zn; TCR alt.: taxa de crescimento relativo em altura; TCR diam.: taxa relativa de crescimento em diâmetro do caule; TCR p.a.: taxa de crescimento em biomassa da parte aérea ;TCR r. taxa de crescimento em biomassa de raiz; AA/AA+DHA: potencial redox de ácido ascórbico; GSH/GSH+GSSG: potencial redox de glutatona; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; APX: ascorbato peroxidase; GR: glutatona redutase; Clo a/b: razão das clorofilas a e b; Carot: carotenoides; HPDC: hidroperóxido dienos conjugados; EE: extravasamento de eletrólitos; MDA: malondialdeído; •OH: radical de hidroxila, O₂•⁻: radical superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

	<i>TC</i>		<i>TNi</i>		<i>TZn</i>		<i>TNiZn</i>	
<i>Variáveis</i>	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 2	Eixo 2	Eixo 2
<i>Valor de p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>CNi</i>	0.839	-0.124	0.898	0.309	0.898	0.309	-0.909	-0.082
<i>CZn</i>	0.921	0.020	0.525	0.735	0.525	0.735	-0.876	-0.251
<i>TCR alt</i>	0.675	0.352	0.224	0.592	0.224	0.592	-0.714	0.467
<i>TCR diam</i>	0.768	0.127	0.574	0.542	0.574	0.542	-0.761	0.093
<i>TCR P.A</i>	0.417	0.315	0.690	0.352	0.690	0.352	-0.780	-0.018
<i>TCR R</i>	0.605	-0.005	0.319	-0.162	0.319	-0.162	-0.008	-0.648
<i>AA/AA+DHA</i>	0.351	-0.440	-0.115	0.401	-0.115	0.401	-0.177	0.522
<i>GSH/GSH+GSSG</i>	-0.740	-0.355	-0.491	-0.189	-0.491	-0.189	0.718	0.082
<i>SOD</i>	-0.301	0.702	0.400	-0.794	0.400	-0.794	-0.019	-0.815
<i>CAT</i>	-0.346	0.869	0.113	-0.065	0.113	-0.065	0.136	-0.622
<i>APX</i>	-0.011	-0.669	-0.474	0.580	-0.474	0.580	0.748	0.235
<i>GR</i>	-0.649	-0.670	-0.906	0.084	-0.906	0.084	0.923	0.061
<i>Clo a/b</i>	0.408	0.559	-0.114	0.716	-0.114	0.716	-0.279	0.257
<i>Carot</i>	0.480	-0.654	-0.314	0.685	-0.314	0.685	-0.727	0.533
<i>HPDC</i>	-0.867	0.196	-0.429	0.457	-0.429	0.457	-0.114	0.858
<i>EE</i>	-0.392	0.001	0.285	0.330	0.285	0.330	-0.517	-0.216
<i>MDA</i>	0.890	-0.003	0.862	0.120	0.862	0.120	-0.384	-0.760
<i>•OH</i>	0.260	0.140	0.783	-0.394	0.783	-0.394	-0.685	-0.380
<i>O₂•⁻</i>	0.019	0.705	0.590	-0.094	0.590	-0.094	-0.657	-0.255
<i>H₂O₂</i>	-0.575	0.358	0.013	-0.738	0.013	-0.738	0.389	-0.804
<i>Variação explicada</i>	34%	20%	27%	23%	28%	17%	36%	23%

Tabela 7. Análise crítica do nível de tolerância ao estresse oxidativo de cada espécie, de acordo com as variáveis mais relevantes destacadas nas ACP realizadas com dados obtidos nos tratamentos Ni, Zn e Ni+Zn. TCR: taxa de crescimento relativo (altura, diâmetro, biomassa da parte aérea e raiz), [Ni]: Conteúdo foliar absoluto de Ni, [Zn]: Conteúdo foliar absoluto de Zn, razão de clorofila (a/b), razão de glutathione (GSH/GSH+GSSG), atividade enzimática (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e Glutathione redutase (GR), concentração de carotenoides, concentração de oxidantes (radical hidroxila $\bullet\text{OH}$, radical superóxido O_2^\bullet e peróxido de hidrogênio H_2O_2) e indicadores de danos a membranas (conteúdo de malondialdeído MDA e extravasamento de eletrólitos EE).

<i>Espécies</i>	<i>Variáveis indicadoras de tolerância</i>	<i>Variáveis indicadoras de danos celulares</i>	<i>Nível de tolerância¹</i>
<i>C. floribundus</i> (Pi)	Alta [Ni], [Zn] Alta TCR (altura, diâmetro, biomassa da parte aérea) Alta [carotenoides]	Alta [oxidantes] ($\bullet\text{OH}$, O_2^\bullet) Danos a membranas (MDA, EE)	***
<i>I. sessilis</i> (Pi)	Alta [Ni], [Zn] Alta TCR (altura, diâmetro e biomassa da parte aérea) Alta [carotenoides] Alta razão clorofilas (a/b) Alta atividade de APX	Alta [oxidantes] ($\bullet\text{OH}$, O_2^\bullet) Danos a membranas (EE)	****
<i>R. ferruginea</i> (Pi)	Alta TCR (altura, diâmetro), Alta [carotenoides] Alta razão clorofilas (a/b) Alta GSH/GSH+GSSG Alta atividade de enzimas (GR, APX)	--	*****
<i>E. uniflora</i> (NPi)	Alta GSH/GSH+GSSG Alta atividade de enzimas (GR, APX)	--	*****
<i>E. leiocarpa</i> (NPi)	Alta atividade de enzimas (SOD, CAT) Alta TCR (raízes)	Alta [oxidantes] (H_2O_2 , O_2^\bullet) Alta peroxidação lipídica (MDA)	**
<i>O. odorifera</i> (NPi) ²	Alta atividade de enzimas (SOD, GR, CAT)	Alta [oxidantes] (H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$, O_2^\bullet)	*

¹ ***** Muito tolerante a * muito sensível

² Não resistiu ao tratamento Zn+Ni

V.5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível verificar experimentalmente as respostas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica quando submetidas a altas concentrações de níquel e zinco no solo, que podem ser considerados fitotóxicos, apesar de serem essenciais, conforme já descreveram Mulrooney e Hausinger (2003); Palmer *et al.* (2009). Vários estudos já demonstram os efeitos deletérios e similares nas plantas desses metais quando em altas concentrações (Gomes et al., 2013a, Gajewska et al. 2007). Ambos podem promover danos ao aparelho fotossintético, levando assim a uma diminuição do crescimento, a uma alta produção de espécies reativas de oxigênio, levando a danos e destruição de membranas (Gajewska et al., 2006; Khaliq et al., 2015).

No entanto, manter funções metabólicas em condições de estresse é crucial para as plantas sobreviverem. Portanto, o equilíbrio entre geração e eliminação de compostos oxidativos é necessário, o que é alcançado por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Wu et al., 2017). As análises bioquímicas realizadas neste estudo nos mostraram que as espécies apresentam distintas estratégias de defesa antioxidativa, tanto quando receberam adubação balanceada quanto quando foram expostas a altos níveis de Ni e Zn biodisponíveis no solo. Tais estratégias basais de defesa independem do grupo funcional a que pertencem as espécies, contrariando a hipótese deste estudo e resultados obtidos em condições naturais por Brandão et al. (2017) e Esposito et al. (2018). Esses autores relataram que em espécies arbóreas adultas o equilíbrio oxidante / antioxidante mostrou ser mais comprometido nas árvores não pioneiras do que nas pioneiras. As espécies ainda mostraram respostas semelhantes quando pertencentes ao mesmo grupo funcional, quando expostas a perturbações ambientais em condições naturais.

Espécies como *R. ferruginea* (Pi) e *E. uniflora* (NPi) mostraram um alto grau de tolerância, demonstrado pelo potencial redox da glutathiona e atividade da enzima GR. A glutathiona é um antioxidante solúvel em água e desempenha um papel central na eliminação de EROs através do ciclo de ascorbato-glutathiona e está envolvida na desintoxicação de metais pesados e xenobióticos (Noctor

et al., 2012). Uma alta proporção GSH / GSSG é suportada pela atividade da enzima GR e os genótipos tolerantes ao estresse têm proporções mais altas do que os sensíveis ao estresse (Noctor et al. 1998, El-Shabrawi et al. 2010). Outro fator importante associado à tolerância a metais é o fato da GSH ser substrato para as fitoquelatinas. As fitoquelatinas são oligômeros de GSH caracterizados pela estrutura geral (γ -Glu-Cys) a enzima responsável pela sua síntese é a fitoquelatina sintase, isto é, γ -glutamil-cisteína transpeptidase que é ativada na presença de íons metálicos. As fitoquelatinas quelam o Cd de forma mais eficaz, seguido de As. (Bashir et al. 2012). Segundo Inouhe (2005) as espécies de plantas denominadas de "hiperacumuladoras" de Cd, Zn, Ni e As apresentam como característica comum, o transporte maciço para as partes aéreas, além da capacidade do sistema radicular de formar as fitoquelatinas. A espécie *R. Ferruginea* ainda apresentou alta TCR (altura, diâmetro), como visto no capítulo anterior, um alto teor de carotenoides e razão clorofila a/b e alta atividade de APX; como consequência demonstrou um baixo nível de danos oxidativos. A espécie *E. uniflora* também apresentou uma alta atividade da enzima APX e baixa concentração de danos celulares oxidativos.

Por outro lado, as espécies *E. leiocarpa* (NPi) e *O. odorifera* (NPi) mostraram maior sensibilidade ao estresse oxidativo causado por Ni e Zn, apesar da alta capacidade de acúmulo dos metais nos caules e raízes, indicando redução da translocação desse elemento para a parte aérea, como visto no capítulo 1. Esta é uma característica das espécies excludentes, que acabam por restringir o estresse por metais por meio da diminuição da translocação das raízes para as folhas (Agrawal *et al.*, 2011; Leyval *et al.*, 1997; Kramer, 2010). No entanto, a redução da translocação de Ni e Zn para as folhas de *E. leiocarpa* e *O. odorifera* não foi suficiente para evitar os danos induzidos pelos mesmos, visto que ambas mostraram redução significativa nas taxas de crescimento relativo (resultados incluídos no capítulo 1). Além disso, os indivíduos de *O. odorifera* quando tratados com a combinação dos metais morreram. Essas espécies apresentaram uma alta concentração das espécies reativas de oxigênio avaliadas nesse estudo e ainda alta atividade das enzimas superóxido dismutase

(SOD), que dismuta O_2^{\bullet} para H_2O_2 , e ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) que são responsáveis pela eliminação de H_2O_2 (Foyer e Noctor, 2011). Esse contraste aponta para um desequilíbrio entre oxidantes /antioxidantes. Estudos mostram que altas concentrações de Ni aumentaram o conteúdo de H_2O_2 no trigo (*Triticum aestivum* L.) (Gajewska e Sklodowska, 2007), canola (*Brassica napus* L.) (Kazemi et al., 2010) e *Alyssum bertolonii* (Boominathan e Doran, 2002).

Já as espécies *C. floribundus* (Pi) e *I. sessilis* (Pi) foram categorizadas com nível de tolerância intermediário em função de sua alta concentração foliar de Ni e Zn, altas taxas de crescimento e altos níveis de clorofila e carotenoides e alta atividade de APX, embora apresentem acúmulo de espécies reativas de oxigênio e danos celulares oxidativos. Gomes et al. (2013) encontraram resultados semelhantes em plantas de *Myracrodruon urundeuva* expostas ao excesso de Zn. Os autores observaram que a tolerância ao Zn é modulada pelo aumento no conteúdo de carotenoides de plantas em resposta a altas concentrações de Zn e aumento da acumulação de H_2O_2 e peroxidação lipídica (MDA) nas plantas. O conteúdo de carotenoides provavelmente protege os sistemas fotossintéticos contra danos oxidativos induzidos pelos metais, embora outros locais como (mitocondrias e perixossomos) permaneçam alvos de espécies reativas de oxigênio (Boussiba, 2000). Os carotenoides geralmente estão envolvidos na desintoxicação de singletos de oxigênio (1O_2). As EROs podem ser convertidas enzimaticamente como a superóxido dismutase em oxigênio singlete, que pode reagir posteriormente com carotenoides, protegendo as plantas contra danos oxidativos (Boussiba, 2000).

V.6. CONCLUSÕES

Os resultados, em seu conjunto, permitiram verificar as respostas bioquímicas frente ao estresse causado pela adição de níquel e zinco. Tais características apontaram para a existência de níveis de tolerância ao estresse oxidativo distintos para cada espécie, independente do grupo funcional a que pertencem, contrariando a hipótese de que as plantas pioneiras apresentariam maior potencial de tolerância ao estresse imposto por ambos os metais do que espécies não pioneiras. As espécies ainda mostraram respostas bioquímicas semelhantes a níquel e zinco. Os resultados ainda nos permitiram verificar o nível de tolerância das espécies ao estresse oxidativo induzido por Ni e/ou Zn, da seguinte forma: *R. ferruginea* (Pi) (alta TCR (altura e diâmetro), GSH/GSG+GSSG, GR e APX) = *E. uniflora* (NPi) (GSH/GSG+GSSG, GR e APX) > *I. sessilis* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e APX) > *C. floribundus* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e carotenoides) > *E. leiocarpa* (NPi) (alta TCR (raiz), SOD e CAT) > *O. odorifera* (NPi) (SOD, GR e CAT).

V.7. BIBLIOGRAFIA

- Abhijith K.V., Kumar Prashant, Gallagher J., McNabola A., Baldauf R., Pilla F., Broderick B., Sabatino S.D., Pulvirenti B.,** 2017. Air pollution abatement performances of green infrastructure in open road and built-up street canyon environments – A review. *Atmospheric Environment*. 162, 71–86.
- Agrawal, J., Sherameti, I., Varma, A.** 2011. Detoxification of Heavy Metals: State of Art. *In: Sherameti, I., Varma, A. (eds) Detoxification of heavy metals*, Springer, pp 1- 34.
- 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 Environmmt* 24: 1337–1344
- Alloway, B.J.,** 2013. Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, third edition, Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, A., Saleem, M.F., Ali, I., Wang, L.C.,** 2017. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Front*.
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Ashraf, U., Hussain, S., Shahzad, B., Khan, I., Wang, L.,** 2016c. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Ullah, E., Tung, S.A., Samad, R.A., Shahzad, B.,** 2015. Cadmium toxicity in maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17022–17030.
- 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.
- Baier M, Kandlbider A, Golldack D & Josef-Dietz K.** 2005. Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020.
- 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
- Bashir, H.; Ahmad, J.; Bagheri, R.; Nauman, M.; Qureshi, M.I.** 2012. Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* doi:10.1016/j.envexpbot.2012.05.004.
- Birani, S. M., Fernandes, A. R., de Souza Braz, A. M. S., Pedroso, A. J. S., Alleoni, L. R. F.** 2015. Available contents of potentially toxic elements in soils from the Eastern Amazon. *Chemie der Erde - Geochemistry* 75, 143-151.
- Boominathan, R., Doran, P.M.,** 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol.* 156 (2), 205–215.

- Boussiba, S. 2000.** Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108 111–117
- 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., 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
- Bray, E.A., Baylei-Serres, J. & Werentilnyk, E. 2000.** Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. 2000 eds). American Society of Plant Physiologists. USA, New York, pp. 1158 –1203.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 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.
- Cai M.F., Xin Z.B., Yu X.X., 2017.** Spatio-temporal variations in PM leaf deposition: A meta-analysis. *Environmental Pollution*. 231,207-218
- 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.
- Castañeda D.M.A., Teixeira E.C., Schneider I.L., Lara S.R., Silva L.F.O., 2017.** Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric PM1.0 of urban environments: Carcinogenic and mutagenic respiratory health risk by age groups. *Environmental Pollution*. 224,158-170.
- Chen L., Shi M.S., Gao S., Li S.H., Mao J., Zhang H., Sun Y.L., Bai Z.P., Wang Z.L., 2017.** Assessment of population exposure to PM2.5 for mortality in China and its public health benefit based on BenMAP. *Environmental Pollution*. 221, 311-317.
- Chen, Huang, D., Liu, J., 2009.** Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean. - Soil, Air, Water* 37 (4–5), 304–313.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F., 2000.** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (5), 779–795.
- Esposito, M.P., Nakazato, R.K., Pedroso, A.V., Lima, M.L., Figueiredo, M.A., Diniz, A.P., Domingos, M., 2018.** Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. *Sci. Total Environ.* 625, 382–393.
- El-Shabrawi, H.; Kumar, B.; Kaul, T.; Reddy, M.K.; Singla-Pareek, S.L.; Sopory, S.K. 2010.** Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, 245, 85–96.

Favaretto, V.F., Martinez, C.A., Soriani, H.H. & Furriel, R.P.M. 2011. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70: 20–28.

Fuzzi S., Baltensperger U., Carslaw K., Decesari S., van Der Gon H.D., Facchini M.C., Fowler D., Koren I., Langford B., Lohmann U., 2015. Particulate matter, air quality and climate: lessons learned and future needs. *Atmospheric Chemistry Physics*. 15, 8217-8299.

Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., Mazur, J., 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol. Plant.* 50 (4), 653–659.

Gajewska, E., Skłodowska, M., 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals* 20 (1), 27–36.

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., 2013a. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 1–6.

Grill, E.; Löffler, S.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. 1989. Phytochelatins. the heavy-metal -binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.84, p. 439–443.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., and Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165.

Hasan K, Cheng Y, Kanwar MK, Chu XY, Ahammed GJ, Qi ZY. 2017. Responses of plant proteins to heavy metal stress - A review, *Frontiers in Plant Science*. 8: 1492.

Hasan M, Ahammed GJ, Yin L, Shi K, Xia X, Zhou Y, et al., 2015. Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatins biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Front. Plant Sci.*6:601. doi: 10.3389/fpls.2015.00601

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

Inoue, Masahiro. 2005. Fitoquelatinas. *Braz. J. Plant Physiol.* [online], vol.17, n.1, pp.65-78. ISSN 1677-9452.

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

Janhäll S., 2015. Review on urban vegetation and particle air pollution–deposition and dispersion. *Atmos. Environ.* 105, 130–137.

Kabata-Pendias. 2011. Trace elements in soils and plants. 4th ed. Wyd. Nauk PWN, Warsaw, 400p.

Khaliq, A., Ali, S., Hameed, A., Farooq, M.A., Farid, M., Shakoar, M.B., Mahmood, K., Ishaque, W., Rizwan, M., 2015. Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seed- lings through

enhancing growth, photosynthesis and suppressing Ni uptake and oxidative stress. Arch. Agron Soil Sci. 62, 633–647.

Krämer, U., 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 61, 517–534.

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.

Lelieveld J., Evans J.S., Fnais M., Giannadaki D., Pozzer A., 2015. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. Nature. 525(7569), 367-384.

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

Li M, Ahammed GJ, Li C, Bao X, Yu J, Huang C, et al., 2016. Brassinosteroid ameliorates zinc oxide nanoparticles-induced oxidative stress by improving antioxidant potential and redox homeostasis in tomato seedling. Front. Plant Sci.7:615. doi: 10.3389/fpls.2016.00615

Li, R., Wiedinmyer, C., Hannigan, M.P., 2013. Contrast and correlations between coarse and fine particulate matter in the United States. Sci. Total Environ. 456, 346–358.

Lima A. L. S., Dam et al. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea Canephora* under water deficit conditions. Environmental and Experimental Botany, v. 47, p. 239-247.

Lopes, M., Ribeiro Dos Santos, A., Zuliani Sandrin Camargo, C., Bulbovas, P., Giampaoli, P., Domingos, M., 2015. Soil chemical and physical status in semideciduous Atlantic Forest fragments affected by atmospheric deposition in central-eastern São Paulo State, Brazil. iForest - Biogeosciences For. e1–e11

López A, Montaña A, Garcia P, Garrido A. 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. Food Sciencie. Tech. Int. 11(3):199-204.

Ma T., Duan F.K., He K.B., Qin Y., Tong D., Geng G.N., Liu X.Y., Li H., Yang S., Ye S.Q., Xu B.Y., Zhang Q., Ma Y.L., 2019. Air pollution characteristics and their relationship with emissions and meteorology in the Yangtze River Delta region during 2014-2016. Journal of Environmental Sciences. 83, 8-20.

Malavolta, E. 2006. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Agronômica Ceres, 638p.

Manara A., 2012. Plant responses to heavy metal toxicity, in Plants and Heavy Metals, ed A. Furini (Springer);27–53.

Miranda, R. M., Andrade M.F., Ribeiro, F. N.D., Kelliton José M. F., Martinezc, P. J. P., 2018. Source apportionment of fine particulate matter by 3 positive matrix factorizations in the Metropolitan Area of 4 São Paulo, Brazil. Journal of Cleaner Production. Volume 202 , 253-263.

- Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P.**, 2003. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 239–261.
- Palmer, C.M., Guerinot, M.L.**, 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Nat. Chem. Biol.*, 5. 333-340.
- Naidu, R., Krishnamurti, G.S.R., Bolan, N.S., Wenzel, W., Megharaj, M.**, 2001. Heavy Metal Interactions in Soils and Implications for Soil Microbial Biodiversity, in: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Metals in the environment, analysis by biodiversity*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca
- 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., Campos, R.O.A., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M.** 2020. Bioavailability of trace metals at the plant-soil- interface in Brazilian Atlantic Forest plots surrounded by air pollution sources. *Submetido a Environmental Pollution*.
- Noctor, G.; Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G.; Foyer, C.H.** 2012 Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35, 454–484.
- Oswald WF, Kraus R, Hipelli S, Benz B, Volpert R, Elstner EF.** 1992. Comparison of the enzymatic actives of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiol* 139:742-748.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Eide, D. and Kochian, L. V.** 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 4956–4960.
- Pierangeli, M.A.P.; Guilherme, L.R.G.; Curi, N.; Silva, M.L.N.; Lima, J.M.; Costa, E.T.S.** 2005. Efeito do pH na adsorção e dessorção de cádmio em Latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.523-532.
- 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. P.R.** 2016 Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129(2016)120.
- Sanchez-Lopes., Gonzalez R. C., Gonzalez-Chaves M.C. A, Rosas-Saito G. H., Vangronsveld, J.,** 2015. Phytobarriers: Plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. *Environmental Pollution* (2015) 33e42

Sarma, H., 2011. Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 118-138.

Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53 (2), 257–277.

Shahzad, B., Tanveer, M., Zhao, C., Rehman, A., Cheema, S.A., Shams ur, Rehman, Sharma, A., Song, H., Zhaorong, D., 2018. Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 935–944.

Sharma, A., Kumar, V., Kumar, R., Shahzad, B., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., 2018. Brassinosteroid-mediated pesticide detoxification in plants: a mini-review. *Cognit. Food Agric.* 4 (1), 1436212.

Shi, G., Cai, Q., 2009. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. *Environ. Exp. Bot.* 67, 112–117.

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

Song, Y., Maher, B.A., Li, F., Wang, X., Sun, X. & Zhang, H. 2015. Particulate matter deposited on leaf of five evergreen species in Beijing, China: Source identification and size distribution. *Atmospheric Environment* 105: 53-60.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Fisiologia Vegetal*. 3ed. Porto Alegre: Artmed.

Tanveer, M., Shahzad, B., Sharma, A., Biju, S., Bhardwaj, R., 2018. 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: a review. *Plant Physiol. Biochem.* 130, 69–79.

Tarhanen S. et al. 1999 Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environ Pollut.* 104:121-9.

Tausz M, Wonisch A, Grill D, Morales D, Jiménez MS. 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 387 (4): 1505-510.

Todeschini V, Lingua G, D'Agostino G, Carniato F, Roccotiello E, Berta G. 2011.

Vallee B.L., Falchuk K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73 (79-118).

Velikova, V., Tsonev, T., Loreto, F., Centritto, M., 2011. Changes in photosynthesis, mesophyll conductance to CO₂, and isoprenoid emissions in *Populus nigra* plants exposed to excess nickel. *Environ. Pollut.* 159 (5), 1058–1066.

Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164 (4), 645–655.

Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., Regvar, M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environ. Pollut.* 133 (2), 233–242.

Wang AG, Luo GH (1990) Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol Commun* 6:55–57.

Wang, Z., Zhang, Y., Huang, Z., Huang, L. 2008. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil* 310 (1), 137.

Wu, H., Tito, N., Giraldo, J.P., 2017. Anionic cerium oxide nanoparticles protect plant photosynthesis from abiotic stress by scavenging reactive oxygen species. *ACS Nano* 11 (11), 11283–11297.

Zhang R.Y., Wang G.H., Guo S., Zamora M.L., Ying Q., Lin Y., Wang W., Hu M., Wang Y. 2015. Formation of urban fine particulate matter. *Chemical reviews*.115, 10, 3803-3855.

Zhao Y, Chengcai C. 2011. “Towards understanding plant response to heavy metal stress,” in *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, ed A. Shanker (Rijeka: Tech Europe),59–78.

VI. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos e apresentados nos capítulos anteriores permitiram testar as hipóteses gerais formuladas.

(1) Ni e Zn, ao serem incorporados no solo de um fragmento florestal urbano, por deposição seca e úmida ou pela decomposição da serapilheira, aumentam a fração biodisponível para a comunidade vegetal e resultam no aumento das taxas de translocação destes para a parte aérea das árvores e alterações no crescimento;

Essa hipótese foi confirmada, uma vez em o solo contaminado com os metais presentes no material particulado na cidade de São Paulo, simulando não só uma alta deposição como uma alta contaminação, onde o valor foi superado 3 vezes o valor estabelecido pela Cetesb para prevenção de riscos associados à contaminação de solos no Estado de São Paulo, pudemos perceber a disponibilidade do mesmo para assimilação das plantas. Uma maior concentração de ambos os metais foi encontrada nas frações mais biodisponíveis, na fração 01 (solúveis, trocáveis e ligados a carbonatos) e a fração 2 (ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês). Já para o índice de translocação para parte aérea essa hipótese pode ser confirmada em partes uma vez que só ocorreu para as espécies arbóreas tratadas com o metal Ni.

(2) As espécies arbóreas não pioneiras acumulam mais Ni e Zn do que espécies pioneiras quando crescidas em solo contaminado e são mais susceptíveis ao estresse oxidativo induzido pelos mesmos, apresentando menores níveis de defesa antioxidante e mais danos celulares.

Com os resultados desse estudo essa hipótese foi testada e rejeitada. Ao se considerar o conteúdo absoluto (biomassa*concentração encontrada), as espécies pioneiras mostraram um maior potencial de acúmulo desses elementos do que as espécies não pioneiras. Ainda vimos que as características bioquímicas medidas apontaram para a existência de níveis de tolerância ao estresse oxidativo distintos para cada espécie, independente do grupo funcional a que pertencem. As espécies ainda mostraram respostas bioquímicas semelhantes a níquel e zinco

Finalmente, ainda foi possível classificar as espécies quanto ao seu nível de tolerância frente ao estresse. *R. ferruginea* (Pi) (alta TCR (altura e diâmetro), GSH/GSG+GSSG, GR e APX) = *E. uniflora* (NPi) (GSH/GSG+GSSG, GR e APX) > *I. sessilis* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e APX) > *C. floribundus* (Pi) (alta [Ni], [Zn], TCR (altura e diâmetro) e carotenoides) > *E. leiocarpa* (NPi) (alta TCR (raiz), SOD e CAT) > *O. odorifera* (NPi) (SOD, GR e CAT).

Com base nessa ordenação de espécies, *C. floribundus* e *I. sessilis* poderiam ser testadas para restauração ou fitorremediação do solo em locais da Mata Atlântica com alta contaminação por Ni e Zn. Apesar da *E. leiocarpa*, ter sido indicada no capítulo 2 para fitorremediação (devido a translocação e acúmulo para parte aérea (caules)) a mesma não mostrou um alto nível de tolerância a contaminação.

ANEXO A

Resultados da primeira etapa experimental

As concentrações de metais presentes em solo coletado dos vasos das plantas submetidas aos quatro tratamentos, controle adubado (T_C), solo com acréscimo de níquel (T_{Ni}), solo com acréscimo de zinco (T_{Zn}) e solo com acréscimo dos metais Ni e Zn (T_{NiZn}) com e sem adição de EDTA foram determinadas em quatro frações, através da extração sequencial desses metais: trocável e ligados a carbonatos (F1) e ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4).

Foi possível verificar que as maiores concentrações de Ni e Zn (tabela 1) foram verificadas nas frações 1 e 2 das amostras de solo das plantas da espécie *S. granulosumlepersun* (Pi) submetidas aos tratamentos com os metais Zn e/ou Ni. A aplicação do EDTA no solo não influenciou a disponibilidade dos metais, os mesmos mostraram a disponibilidade seja no solo sem a adição quanto no solo com a adição de EDTA.

O conteúdo de Ni no solo para espécie *S. granulosumlepersun* (Pi) foi encontrado em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) nos tratamentos com excesso deste no solo ($T_{Ni} = 33.3$ e $T_{NiZn} = 35.0$ sem adição de EDTA) e ($T_{Ni} = 50.4$ e $T_{NiZn} = 40.4$ com adição de EDTA) e ligado a óxidos/hidróxidos e ferro e manganês (fração 2) ($T_{Ni} = 26.3$ e $T_{NiZn} = 32.3$ sem adição de EDTA) e ($T_{Ni} = 16.9$ e $T_{NiZn} = 15.4$ com adição de EDTA).

O conteúdo de Zn no solo foi encontrado em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) nos tratamentos com excesso deste no solo ($T_{Zn} = 99.4$ e $T_{NiZn} = 109.0$ sem adição de EDTA) e ($T_{Zn} = 66.2$ e $T_{NiZn} = 91.8$ com adição de EDTA) e ligado a óxidos/hidróxidos e ferro e manganês (fração 2) ($T_{Zn} = 47.4$ e $T_{NiZn} = 49.5$ sem adição de EDTA) e ($T_{Zn} = 66.2$ e $T_{NiZn} = 91.8$ com adição de EDTA).

Tabela 1: Valores médios da concentração de níquel e zinco no solo para plantas da espécie pioneira *S. granulosumleprosun* (Pi) nos tratamentos com acréscimo de metais e tratamento controle, nas formas solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1) e ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4), com a adição de EDTA e sem adição de EDTA. Letras maiúsculas comparam tratamentos com e sem EDTA. Letras minúsculas comparam os tratamentos para a mesma espécie ($p < 0,001$).

<i>S. granulosumleprosun</i> (Pi)								
[Ni]	Sem EDTA				Com EDTA			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
T _C	0.53Ab	0.5 Ac	1.5 Ab	8.8 Bb	0.7Ac	0.5 Ac	0.1 Bc	11.2 Aa
T _{Ni}	33.3 Ba	26.3 Aa	3.5 Ab	11.9 Aa	50.6 Aa	16.9 Ba	3.9 Aa	10.3 Aa
T _{Zn}	0.56 Bb	2.8 Ab	0.3 Ac	11.6 Aa	6.40 Ab	4.8 Ab	2.4 Ab	9.2 Bb
T _{Ni Zn}	35.0 Aa	32.3 Aa	6.6 Aa	10.4 Aa	40.4 Aa	15.4 Ba	4.3 Ba	9.8 Ab
[Zn]	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
T _C	3.5 Ab	23.0 Ab	11.7 Ab	10.3 Bc	4.6 Ac	3.7 Bc	11.6 Aa	16.2 Aa
T _{Ni}	5.7 Ab	8.6 Ac	14.0 Ab	12.1 Ab	6.2 Ac	4.7 Bc	16.2 Aa	14.8 Ab
T _{Zn}	99.4 Aa	47.4 Aa	25.6 Aa	24.2 Aa	66.2 Bb	44.0 Aa	17.6 Bb	11.6 Bb
T _{Ni Zn}	109.0 Aa	49.5 Aa	16.6 Ab	15.4 Ab	91.8 Ba	17.7 Bb	18.0 Aa	16.6 Aa

Na tabela 2 é possível verificar que as maiores concentrações de Ni e Zn foram verificadas nas frações 1 e 2 das amostras de solo das plantas da espécie *E. leiocarpa* (NPi) submetidas aos tratamentos com os metais Zn e/ou Ni. Assim como para espécie pioneira a aplicação do EDTA no solo não influenciou a disponibilidade dos metais, os mesmos mostraram a disponibilidade seja no solo sem a adição quanto no solo com a adição de EDTA.

O conteúdo de Ni no solo para espécie *E. leiocarpa* (NPi) foi encontrado em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) nos tratamentos com excesso deste no solo (T_{Ni} = 26.2 e T_{NiZn} = 28.0 sem adição de EDTA) e (T_{Ni} = 27.9 e T_{NiZn} = 17.5 com adição de EDTA) e ligado a óxidos/hidróxidos e ferro e manganês (fração 2) (T_{Ni} = 14.3 e T_{NiZn} = 16.01 sem adição de EDTA) e (T_{Ni} = 27.9 e T_{NiZn} = 17.5 com adição de EDTA).

O conteúdo de Zn no solo foi encontrado em maior concentração nas formas solúveis, trocáveis e ligado a carbonatos (fração 1) nos tratamentos com excesso deste no solo (T_{Zn} = 95.2 e T_{NiZn} = 100.3 sem adição de EDTA) e (T_{Zn} = 82.8 e T_{NiZn} = 89.1 com adição de EDTA) e ligado a

óxidos/hidróxidos e ferro e manganês (fração 2) ($T_{Zn} = 55.1$ e $T_{NiZn} = 44.1$ sem adição de EDTA) e ($T_{Zn} = 40.4$ e $T_{NiZn} = 49.4$ com adição de EDTA).

Tabela 2: Valores médios da concentração de níquel e zinco no solo para plantas da espécie não pioneira *E.leiocarpa* (Pi) nos tratamentos com acréscimo de metais e tratamento controle, nas formas solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1) e ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e residual (F4), com a adição de EDTA e sem adição de EDTA. Letras maiúsculas comparam tratamentos com e sem EDTA. Letras minúsculas comparam os tratamentos para a mesma espécie ($p < 0,001$).

<i>E. leiocarpa</i>								
[Ni]	Sem EDTA				Com EDTA			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
T_C	6.4 Ab	0.7 Bc	2.2 Ab	10.1 Aa	1.2 Bc	1.2 Ac	2.2 Ac	12.7 Aa
T_{Ni}	26.2 Aa	14.3 Bb	20.0 Aa	12.1 Aa	27.9 Aa	27.9 Aa	6.0 Bb	11.8 Aa
T_{Zn}	1.1 Ac	0.51 Bc	2.5 Ab	11.5 Aa	1.0 Ac	1.0 Ac	2.1 Ac	9.8 Aa
T_{NiZn}	28.0 Aa	16.01Aa	24.0 Aa	12.7 Aa	17.5 Bb	17.5 Ab	13.3 Ba	10.7Aa
[Zn]	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
T_C	8.1Ab	6.2 Ab	13.8 Aa	17.1 Aa	7.4 Ab	3.6 Bc	11.2 Ba	17.6 Ab
T_{Ni}	6.8 Ab	3.3 Bb	3.8 Ab	14.9 Ab	6.4 Ab	11.1Ab	4.1 Ab	8.4 Bb
T_{Zn}	95.2 Aa	55.1 Aa	14.7 Aa	20.5 Aa	82.8 Aa	40.4 Ba	6.3 Bb	19.3Aa
T_{NiZn}	100.3 Aa	44.1 Aa	11.5 Aa	20.1Aa	89.1 Ba	49.4 Aa	11.5 Aa	8.2 Bb

As maiores concentrações de Ni e Zn em ambas as espécies foram verificadas nas frações 1 e 2 das amostras de solo das plantas submetidas aos tratamentos com os metais Zn e/ou Ni. A aplicação do EDTA no solo não influenciou a disponibilidade dos metais, os mesmos mostraram a disponibilidade seja no solo sem a adição quanto no solo com a adição de EDTA.

A figura 1 mostra as somatórias de concentração de Ni nas frações biodisponíveis do solo ($F1+F2+F3$) e o conteúdo absoluto dos metais nos diferentes órgãos das plantas da espécie pioneira (*S. granulosumlepersun*) e não pioneira (*E. leiocarpa*) crescidas nos 4 tratamentos de solo com e sem adição de EDTA. Verificou-se que as variações no conteúdo absoluto de Ni nas plantas entre os tratamentos foi similar às variações no nível de Ni biodisponível no solo tanto com e sem EDTA.

O conteúdo absoluto total de Ni foi mais alto nas espécies pioneiras do que nas espécies não pioneiras crescidas em todos os tratamentos tanto com e sem adição de EDTA.

Ainda o conteúdo absoluto de Ni foi significativamente mais alto nas plantas de *S. granulosumleprosum* (Pi) e *E. leiocarpa* (NPi), crescidas em solo com excesso de Ni (T_{Ni}) e de Ni + Zn (T_{NiZn}) do que nos tratamentos controle e com excesso de Zn (T_C e T_{Zn}) tanto com e sem adição de EDTA.

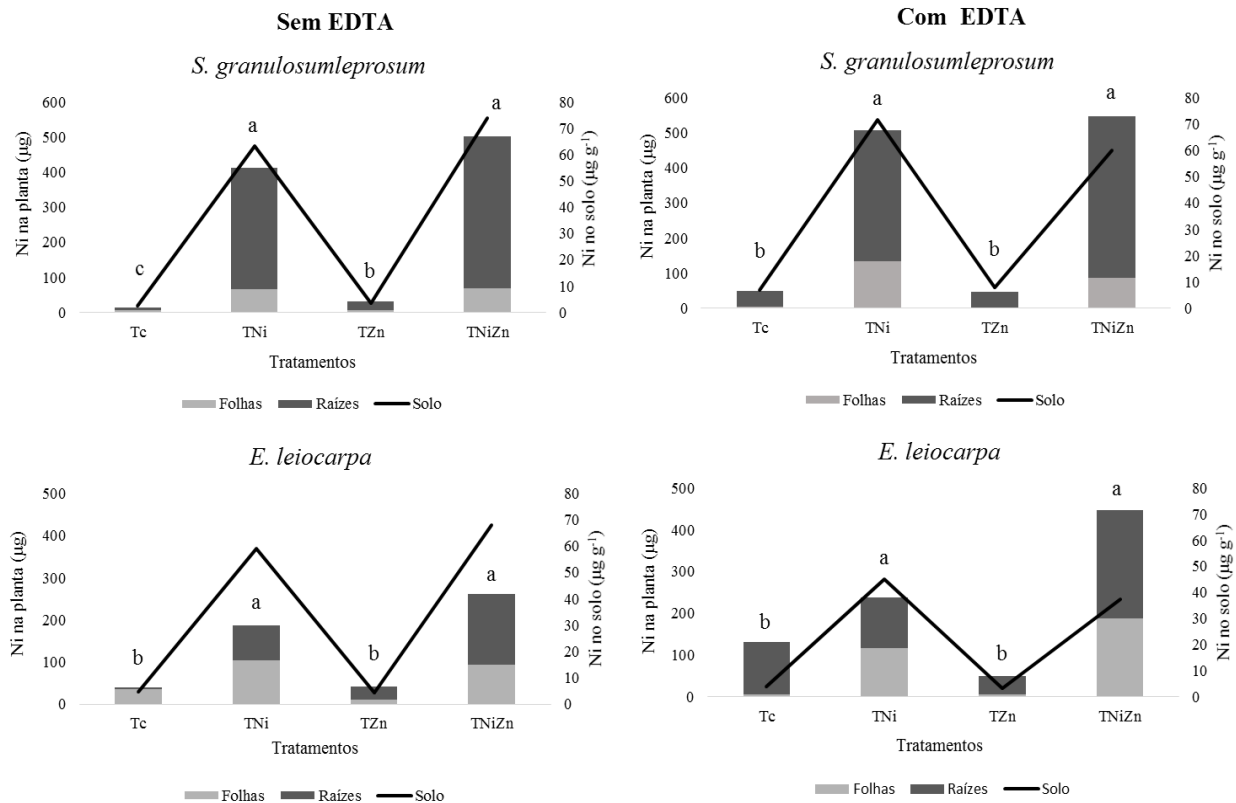


Figura 1. Somatória das concentrações de níquel ligado às frações biodisponíveis no solo solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e conteúdo absoluto (concentração*biomassa) de níquel em folhas e raízes de espécie pioneira e não pioneira crescidas nos tratamentos sem adição e com adição de EDTA controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco (T_{NiZn}). Letras minúsculas indicam diferenças significativas na somatória da concentração do metal nos diferentes órgãos das plantas, entre os tratamentos.

A figura 3 mostra as somatórias de concentração de Zn nas frações biodisponíveis do solo (F1+F2+F3 e o conteúdo absoluto dos metais nos diferentes órgãos das plantas da espécie pioneira (*S. granulosumleprosum*) e não pioneira (*E. leiocarpa*) crescidas nos 4 tratamentos de solo com e sem adição de EDTA.

Assim como ocorreu com Ni, o conteúdo absoluto de Zn nas plantas das espécies variou de forma similar aos níveis de Zn biodisponível no solo dos 4 tratamentos com e sem adição de EDTA. Verificou-se, também, que o conteúdo absoluto total de Zn foi pelo menos duas vezes maior na espécie pioneira do que na espécie não pioneira crescidas em todos os tratamentos, com e sem adição de EDTA. O conteúdo absoluto de Zn foi significativamente mais alto nas plantas das espécies arbóreas crescidas em solo com excesso de Zn (T_{Zn}) e de Ni + Zn ($T_{Ni\ Zn}$) do que nos tratamentos controle e com excesso de Zn (T_C e T_{Zn}) tanto com e sem adição de EDTA, exceto na espécie *S. granulosumleprosum* (Pi), com adição de EDTA no solo, onde no tratamento T_{Zn} foi menor quando comparado ao tratamento $T_{Ni\ Zn}$.

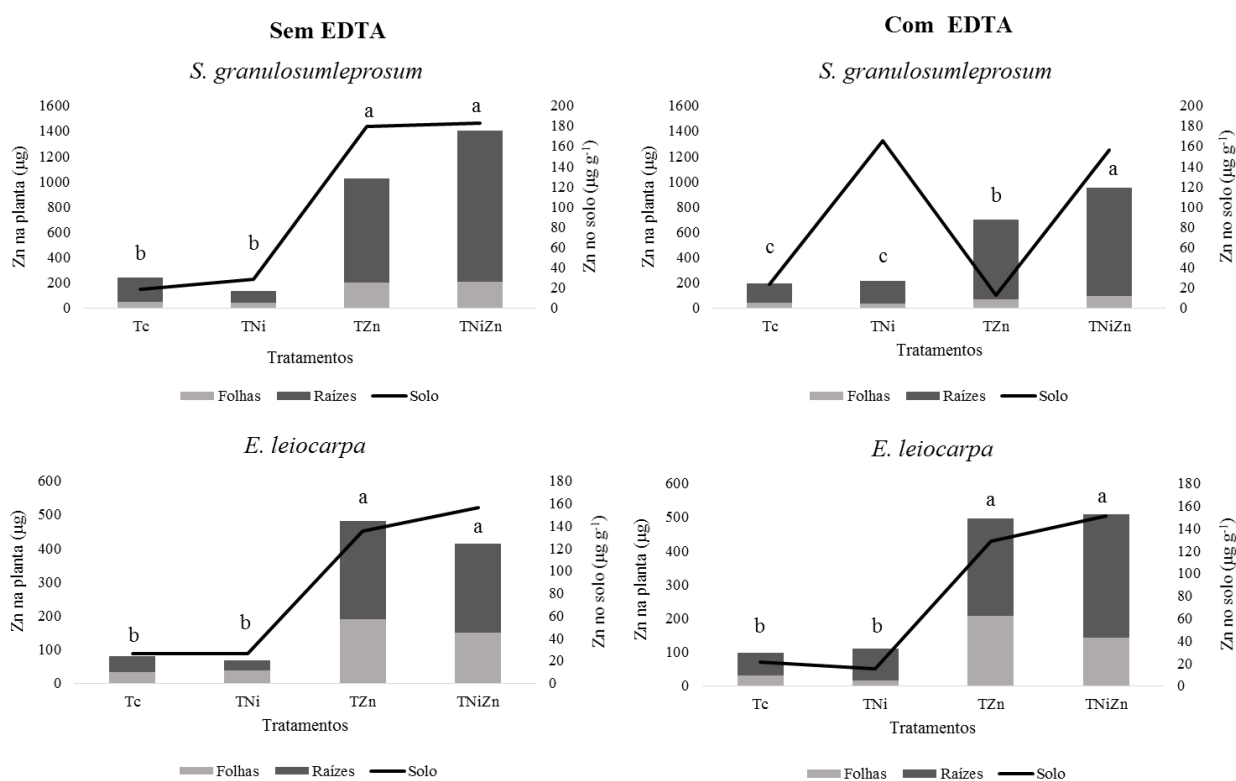


Figura 2. Somatória das concentrações de zinco ligado às frações biodisponíveis no solo solúvel, trocável e ligados a carbonatos (F1), ligados a óxidos/hidróxidos de ferro e manganês (F2), ligados a matéria orgânica (F3) e conteúdo absoluto (concentração*biomassa) de níquel em folhas e raízes de espécie pioneira e não pioneira crescidas nos tratamentos sem adição e com adição de EDTA controle (T_C), níquel (T_{Ni}), zinco (T_{Zn}) e níquel + zinco ($T_{Ni\ Zn}$). Letras minúsculas indicam diferenças significativas na somatória da concentração do metal nos diferentes órgãos das plantas, entre os tratamentos.

Estes resultados nos levaram a optar pela não utilização do quelante sintético (EDTA) na segunda etapa deste trabalho, pois as concentrações foliares de Ni e Zn foram mais altas nas mudas das espécies não pioneira e pioneira expostas nos tratamentos com a adição desses elementos em comparação aos controles, com e sem aplicação de EDTA.