

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**Caroline Castro Kuinchtner**

**MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS DE CEDRO E  
IPÊ-ROXO EXPOSTAS AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Santa Maria, RS  
2021

Caroline Castro Kuinchtner

**MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS DE CEDRO E  
IPÊ-ROXO EXPOSTAS AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Luciane Almeri Tabaldi

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Castro Kuinchtner, Caroline  
MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS DE CEDRO E  
IPÊ-ROXO EXPOSTAS AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO /  
Caroline Castro Kuinchtner.- 2021.  
81 p.; 30 cm

Orientador: Luciane Almeri Tabaldi  
Coorientador: Maristela Machado Araujo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2021

1. Cedrela fissilis 2. Espécies nativas 3.  
Handroanthus heptaphyllus 4. Metal 5. Toxidez. I. Almeri  
Tabaldi, Luciane II. Machado Araujo, Maristela III.  
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

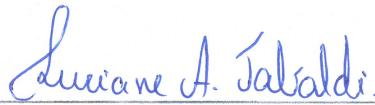
Declaro, CAROLINE CASTRO KUINCHTNER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Caroline Castro Kuinchtner

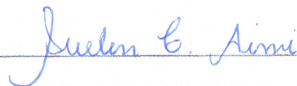
**MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS DE CEDRO E  
IPÊ-ROXO EXPOSTAS AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

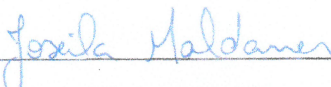
**Aprovada em 20 de agosto de 2021:**



\_\_\_\_\_  
**Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM) - VIDEOCONFERÊNCIA**  
(Presidente/Orientadora)



\_\_\_\_\_  
**Suelen Carpenedo Aimi, Dra. (UFSM) - VIDEOCONFERÊNCIA**



\_\_\_\_\_  
**Joseila Maldaner, Dra. (DDPA/SEAPDR) - VIDEOCONFERÊNCIA**

Santa Maria, RS  
2021

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que participaram de alguma forma, por todo incentivo e compreensão nos momentos mais difíceis que sempre estiveram ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pela vida. A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão do presente trabalho, e de forma especial agradeço:

A Luciane Almeri Tabaldi, minha orientadora que sempre esteve presente, se dedicando com toda paciência e com seu enorme carisma de sempre. Muito obrigada por todo teu empenho ao meu lado! Serei eternamente grata a ti, Prof!

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria, por ser uma instituição de ensino que preza pelo aprendizado de qualidade dos alunos e por proporcionar as ferramentas fundamentais para uma boa formação acadêmica.

Ao meu companheiro Guilherme Coffi Ribeiro, por todo apoio, carinho e compressão nos momentos mais difíceis e que sempre acreditou em mim! Muito obrigada, meu amor!

A minha família, em especial aos meus pais, Adelir José Kuinchtner e Julia Maria Castro Kuinchtner por todo incentivo!

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial a Claudia Costella, agradeço pelo companheirismo, pelos nossos famosos chimarrões e estudos de regressão e por toda amizade e parceria que construímos!

Aos meus colegas de laboratório FisiPlant: Daiane, Gerâne, Marcos, Charleston, Thalia, Franco, Luana, Flaiane, Thomas. Agradeço imensamente vocês pelas nossas parcerias, comilanças, risadas, a aturarem meu mau humor de vez em quando e o grande apoio nas horas mais difíceis. Muito obrigada!

Agradeço também o laboratório de análises de solos sob orientação do professor Gustavo Brunetto, e em especial a aluna de iniciação científica, Vanessa Marques que me ajudou nas análises de tecidos das minhas amostras.

Ao grupo do laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioquímica de Plantas do Departamento de Biologia da UFSM pela colaboração e realização das análises e empenho.

Agradeço a CAPES pelo incentivo financeiro por meio da bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.

Por fim agradeço a todos que fazem parte da minha vida, que sempre estiveram ao meu lado de forma direta ou indiretamente, torcendo e dizendo palavras motivadoras, e me transmitindo ânimo de seguir em frente. Meu muito obrigado a todos!

## RESUMO

# MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS DE CEDRO E IPÊ-ROXO EXPOSTAS AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO

AUTORA: Caroline Castro Kuinchtner  
ORIENTADORA: Luciane Almeri Tabaldi

*Cedrela fissilis* Vell. (Cedro) e *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Ipê-roxo) são espécies florestais nativas brasileiras que apresentam grande relevância florestal e ecológica. Assim, para se conhecer a silvicultura destas espécies, é de grande importância o conhecimento edáfico em que as mesmas se encontram, e também, as respostas das espécies às variações que ocorrem em diferentes locais. Nesse sentido, nos últimos anos, os solos brasileiros têm sofrido grandes perturbações, principalmente com contaminação por cobre (Cu), acarretando problemas ao desenvolvimento e crescimento as plantas. Desta maneira, a pesquisa objetivou caracterizar variáveis morfofisiológicas, bioquímicas e análise de tecidos em plantas de cedro e ipê-roxo expostas ao Cu em sistema hidropônico, em casa de vegetação, além de verificar a tolerância das espécies ao Cu. Após a emergência e crescimento inicial das mudas (cerca de 10 cm de altura), as mesmas foram retiradas do substrato e transferidas para o sistema hidropônico. Após uma semana de aclimatação, estas mudas foram submetidas a diferentes concentrações de Cu: 0 (solução nutritiva completa), 2, 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>, com quatro repetições por tratamento e 16 plantas por repetição. Após 21 dias de exposição aos tratamentos, realizaram-se as análises dos atributos morfofisiológicos incremento em número de folhas, altura e comprimento de raízes, biomassa seca, área foliar e variáveis fotossintéticas. Além disso, avaliou-se também as variáveis bioquímicas conteúdo de pigmentos fotossintéticos, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio e análise de Cu nos tecidos. Para as mudas de cedro, observou-se que as concentrações de Cu afetaram de forma negativa o incremento em parte aérea, em raízes, no número de folhas, taxa de assimilação líquida, condutância estomática, na taxa transpiratória e eficiência de carboxilação da rubisco, em comparação ao tratamento controle. De forma geral, o Cu promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e guaiacol peroxidase. A peroxidação lipídica nas raízes aumentou conforme os maiores índices Cu. Além disso, observou-se maior teor de Cu somente nas raízes de mudas de *C. fissilis* com o aumento da concentração de Cu no meio de crescimento. Para as variáveis incremento em parte aérea, massa seca da parte aérea, massa seca de raízes e pigmentos fotossintéticos de *H. heptaphyllus*, não houve diferença independente das concentrações de Cu testadas. Além disso, a taxa de assimilação líquida e taxa transpiratória foram afetadas negativamente somente na maior concentração de Cu (8 mg L<sup>-1</sup>), e esse promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes, principalmente no sistema radicular. Por outro lado, observou-se que a aplicação de Cu gerou maior conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica nas raízes. Portanto, a presença de Cu na solução nutritiva alterou negativamente as variáveis bioquímicas e fisiológicas das mudas de *C. fissilis*, sendo prejudiciais ao crescimento das mesmas, e com isso, observou-se comportamento sensível da espécie. Por outro lado, *H. heptaphyllus* em geral foi afetada pelo Cu apenas com 8 mg L<sup>-1</sup>, sendo acumulado principalmente nas raízes, sem registrar diminuição na biomassa radicular e da parte aérea, o que pode indicar tolerância da espécie a este metal. Devido a essas características, as plantas de *C. fissilis* podem ser utilizadas como sinalizadoras de áreas contaminadas com Cu, enquanto as mudas de *H. heptaphyllus* têm potencial para utilização na fitorremediação de solos contaminados por Cu.

**Palavras-chave:** *Cedrela fissilis*. Espécies nativas. *Handroanthus heptaphyllus*. Metal. Toxidez.

## ABSTRACT

# MORPHOPHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF CEDRO AND PURPLE IPE PLANTS EXPOSED TO COPPER IN HYDROPONIC SYSTEM

AUTHOR: Caroline Castro Kuinchtner

ADVISOR: Luciane Almeri Tabaldi

*Cedrela fissilis* Vell. (Cedar) and *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Ipê-roxo) are native Brazilian forest species that have great forestry and ecological relevance. Thus, to know the forestry of these species, the edaphic knowledge in which they are found is of great importance, as well as the species responses to the variations that occur in different places. In this sense, in recent years, Brazilian soils have suffered great disturbances, mainly with copper (Cu) contamination, causing problems for plant development and growth. Thus, the research aimed to characterize morphophysiological, biochemical and tissue analysis variables in cedar and Ipê-roxo seedlings exposed to Cu in a hydroponic system, in a greenhouse, in addition to verifying the tolerance of species to Cu. After emergence and initial growth of the seedlings (about 10 cm in height), they were removed from the substrate and transferred to the hydroponic system. After a week of acclimatization, these seedlings were subjected to different concentrations of Cu: 0 (complete nutrient solution), 2, 4, 6 and 8 mg L<sup>-1</sup>, with four replicates per treatment and 16 plants per repetition. After 21 days of exposure to the treatments, morphophysiological attributes were analyzed, such as increase in number of leaves, height and length of roots, dry biomass, leaf area, and photosynthetic variables. In addition, biochemical variables were also evaluated: photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and tissue Cu analysis. For cedar seedlings, it was observed that Cu concentrations negatively affected the increase in shoot, roots, number of leaves, net assimilation rate, stomatal conductance, transpiration rate and rubisco carboxylation efficiency, compared to the control treatment. In general, Cu promoted an increase in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and guaiacol peroxidase. The lipid peroxidation in the roots increased with the highest Cu indices. Furthermore, a higher Cu content was observed only in the roots of *C. fissilis* seedlings with the increase in the Cu concentration in the growth medium. For the variables increase in shoot, shoot dry mass, root dry mass and photosynthetic pigments of *H. heptaphyllus*, there was no difference independent of the tested Cu concentrations. Furthermore, the net assimilation rate and transpiration rate were negatively affected only in the highest Cu concentration (8 mg L<sup>-1</sup>), and this promoted an increase in the activity of antioxidant enzymes, mainly in the root system. On the other hand, it was observed that the application of Cu generated higher content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation in the roots. Therefore, the presence of Cu in the nutrient solution negatively altered the biochemical and physiological variables of *C. fissilis* seedlings, being harmful to their growth, and thus, a sensitive behavior of the species was observed. On the other hand, *H. heptaphyllus* in general was affected by Cu only with 8 mg L<sup>-1</sup>, being accumulated mainly in the roots, without registering a decrease in root and shoot biomass, which may indicate tolerance of the species to this metal. Due to these characteristics, *C. fissilis* plants can be used as markers of areas contaminated with Cu, while *H. heptaphyllus* seedlings have potential for use in phytoremediation of soils contaminated by Cu.

**Keywords:** *Cedrela fissilis*. Native species. *Handroanthus heptaphyllus*. Metal. Toxicity.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Valores médios de incremento em parte aérea (IPA) (A), incremento em raiz (IR) (B), incremento em número de folhas (C), área foliar (D), massa seca da parte aérea (E) e massa seca da raiz (F) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 38
- Figura 2- Valores médios de comprimento (A), área superficial (B), volume(C) e diâmetro de raízes (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 39
- Figura 3 - Valores médios da taxa de assimilação líquida (A) (A), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (Ci) (B), condutância estomática (Gs) (C), taxa transpiratória (E) (D), eficiência do uso da água (EUA) (E) e eficiência instantânea de carboxilação (pela Rubisco) (A/Ci) (F) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 41
- Figura 4 - Valores médios de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C), e carotenoides (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu... .... 42
- Figura 5 - Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A) e raízes (B), e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea (C) e raízes (D) de mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 42
- Figura 6 - Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em parte aérea (A) e raízes (B), e valores médios da peroxidação de lipídios de membrana na parte aérea (C) e raízes (D) de mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 43
- Figura 7 - Valores médios do conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea (A) e raízes (B) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu.....45

- Figura 8 - Valores médios de incremento em parte aérea (IPA) (A), incremento em raiz (IR) (B), incremento em número de folhas (C), área foliar (D), massa seca da parte aérea (E) e massa seca de raízes (F) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu.....65
- Figura 9 - Valores médios de comprimento (A), área superficial (B), volume(C) e diâmetro de raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 65
- Figura 10 - Valores médios da taxa de assimilação líquida (A) (A), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) (B), condutância estomática (G<sub>s</sub>) (C), taxa transpiratória (E) (D), eficiência do uso da água (EUA) (E) e eficiência instantânea de carboxilação (pela Rubisco) (A/C<sub>i</sub>) (F) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu..... 66
- Figura 11 - Valores médios de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 67
- Figura 12 - Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A) e raízes (B), e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu..... 68
- Figura 13 - Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em parte aérea (A) e raízes (B), e valores médios da peroxidação de lipídios de membrana na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu..... 70
- Figura 14 - Valores médios do conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea (A) e raízes (B) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu. .... 71

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Plantas de <i>Cedrela fissilis</i> (A) e <i>Handroanthus heptaphyllus</i> (B) durante o período de aclimação no sistema hidropônico em casa de vegetação. ....	80
APÊNDICE B - Procedimento de avaliação da fotossíntese em <i>Cedrela fissilis</i> (A) e <i>Handroanthus heptaphyllus</i> (B). ....	80
APÊNDICE C - Mudas de <i>Cedrela fissilis</i> (A) e <i>Handroanthus heptaphyllus</i> (B) após 21 dias de exposição a diferentes concentrações de Cu em sistema hidropônico.....	81

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
3.1 <i>Cedrela fissilis</i> .....	15
3.2 <i>Handroanthus heptaphyllus</i> .....	16
3.3 COBRE .....	17
3.3.1 Cobre no solo .....	17
3.3.2 Efeito do Cobre nas plantas.....	18
3.3.3. Fitorremediação.....	20
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>21</b>
<b>5 MANUSCRITOS .....</b>	<b>27</b>
<b>6 MANUSCRITO I - MUDAS DE <i>Cedrela fissilis</i> PODEM SER UTILIZADAS COMO SINALIZADORAS DE ÁREAS CONTAMINADAS POR COBRE.....</b>	<b>28</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	30
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6.2.1 Área de estudo .....	31
6.2.2. Condução do experimento .....	31
6.2.3 Variáveis fotossintéticas .....	32
6.2.4 Determinação das variáveis de crescimento .....	33
6.2.5 Determinação das variáveis bioquímicas.....	33
6.2.6 Conteúdo de pigmentos (clorofilas totais e carotenoides) .....	34
6.2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes .....	34
6.2.8 Conteúdo de peróxido de hidrogênio.....	35
6.2.9 Peroxidação de lipídeos de membrana.....	36
6.2.10 Análise de tecidos .....	36
6.2.11 Análise Estatística.....	36
6.3 RESULTADOS .....	37
6.4 DISCUSSÃO.....	44
6.5 CONCLUSÃO.....	49
6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
<b>7 MANUSCRITO II - <i>Handroanthus heptaphyllus</i> É UMA ESPÉCIE TOLERANTE AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO .....</b>	<b>54</b>
7.1 INTRODUÇÃO.....	56
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57

7.2.1 Área de estudo .....	57
7.2.2 Condução do experimento .....	57
7.2.3 Variáveis fotossintéticas .....	59
7.2.4 Determinação das variáveis de crescimento .....	59
7.2.5 Determinação das variáveis bioquímicas .....	60
7.2.6 Conteúdo de pigmentos (clorofilas totais e carotenoides) .....	60
7.2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes .....	60
7.2.8 Conteúdo de peróxido de hidrogênio .....	61
7.2.9 Peroxidação de lipídeos de membrana.....	62
7.2.10 Análise de tecidos .....	62
7.2.11 Análise Estatística.....	62
<b>7.3 RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>7.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de insumos químicos na agricultura e áreas de mineração tem trazido problemas pela contaminação do solo por metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A toxicidade destes metais pesados provoca perigosos impactos ao homem e ao meio ambiente, sendo necessário observar o nível da toxidez, pois este depende da movimentação dos metais pelo solo, da capacidade de retenção, da possibilidade ou não de atingir o lençol freático, além da solubilização na água e na cadeia alimentar, por meio da absorção pelas plantas (AUGUSTO et al., 2014). Os fertilizantes e fungicidas utilizados na agricultura são algumas das principais fontes de contaminação do solo por metais (CAMARGO et al., 2007).

O metal cobre (Cu) é essencial para as plantas em baixas concentrações, porém em excesso este elemento pode causar danos na produção e crescimento das plantas, além de afetar a saúde humana (SARWAR et al., 2017). Desse modo, cresce o interesse de estudos relacionados a adaptações das espécies nativas à locais com problemas de contaminação por metais, buscando alternativas para a recuperação de áreas degradadas, além da conscientização da conservação dos recursos florestais. Por isso, é importante entender o desenvolvimento das plantas e seus mecanismos para adequada escolha de espécies que sejam tolerantes e, assim, poder utilizá-las em áreas que sejam contaminadas por metais tóxicos (MILNER; KOCHIAN, 2008).

Nesse sentido, a espécie *Cedrela fissilis* Vell., conhecida popularmente como cedro, pertence à família Meliaceae e é uma espécie nativa do Brasil de grande interesse florestal. Possui madeira leve e macia ao corte, sendo empregada em diversas finalidades, como em compensados, molduras, esculturas, construção civil e utilizada como ornamental. É encontrada em praticamente todo o país, especialmente em florestas semidecíduas (CARVALHO, 2008).

Outra espécie importante é a *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos pertencente à família Bignoniaceae, cujo nome popular é ipê-roxo. A *H. heptaphyllus* é uma espécie de floresta estacional que pode ser encontrada em alguns biomas brasileiros. Seu tamanho pode atingir até 30 m de altura, suas flores são belas e vibrantes, tendo as abelhas como principais agentes polinizadores. A árvore é bastante empregada em reflorestamento de áreas degradadas (MAIA-SILVA et al., 2012). A madeira desta espécie apresenta alta densidade, por isso, resiste mais a ataque de pragas e doenças (SCHULZE et al., 2008). É uma espécie muito utilizada no paisagismo,

devido sua coloração rosa-violácea, sendo sua floração de grande importância ornamental, indicada para a arborização urbana. Além disso, o ipê-roxo é uma espécie que apresenta características fisiológicas importantes, sendo bastante utilizada para a recuperação de áreas degradadas (SAMPAIO; POLO; BARBOSA, 2012).

Assim, devido à importância destas espécies florestais nos ecossistemas e com grande potencial florestal, além da falta de estudos acerca da relação dessas espécies com o elemento Cu, a presente pesquisa buscou desenvolver estudos voltados a análises morfofisiológicas, bioquímicas e análise de tecidos relacionadas as espécies com tal elemento, além de verificar a sua tolerância em diferentes concentrações de Cu em sistema hidropônico. Com os resultados desta pesquisa será possível indicar ou não estas espécies para programas de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento em solos contaminados por este metal. Pelo fato das espécies *C. fissilis* e *H. heptaphyllus* serem nativas e adaptadas as condições locais, a hipótese é que as mesmas podem apresentar comportamento tolerante ao elemento cobre.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a morfofisiologia e bioquímica de plantas de cedro (*Cedrela fissilis*) e ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*) expostas ao Cu em sistema hidropônico em casa de vegetação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar variáveis morfofisiológicas de plantas de *Cedrela fissilis* e *Handroanthus heptaphyllus* expostas a diferentes concentrações de Cu;
- Verificar o comportamento sensível ou tolerante das plantas de *C. fissilis* e *H. heptaphyllus* em diferentes concentrações de Cu em sistema hidropônico;
- Avaliar os efeitos do Cu sobre o sistema antioxidante de plantas de *C. fissilis* e *H. heptaphyllus*;
- Determinar as concentrações de Cu nos tecidos de plantas de *C. fissilis* e *H. heptaphyllus* após exposição ao Cu.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Cedrela fissilis* Vell

*Cedrela fissilis* é uma espécie arbórea conhecida popularmente como cedro, nativa do Brasil, pertencente à família Meliaceae. Tem ocorrência em praticamente todo o país, principalmente em florestas semidecíduas, Floresta Ombrófila mista e em menor quantidade na Floresta Ombrófila Densa pluvial da Costa Atlântica. É uma espécie pioneira encontrada em capoeiras e tem preferência por solos profundos e úmidos, como vales e planícies (LORENZI, 2014). De acordo com o mesmo autor, a obtenção de sementes de cedro é através da colheita dos frutos diretamente da árvore, assim que estes abrirem espontaneamente. Após, deve-se expor os frutos ao sol (horário ambiente ventilado) para abrir totalmente e liberar a semente. A semente possui em média um ciclo de 4 meses e um quilo de frutos de cedro apresenta em torno de 21.000 unidades de sementes.

O cedro possui grande importância econômica, sendo usado em grande escala na indústria madeireira, devido a suas propriedades. O cedro está em quarto lugar dentre as espécies que são mais exportadas, perdendo apenas para o *Swietenia macrophylla* (mogno), *Hymenaea courbaril* (jatobá) e *Virola surinamensis* (virola), além de estar em crescente com o mercado internacional de madeiras (ANGELO et al., 2001).

O nome *Cedrela* deriva de *Cedrus*, a árvore que exala perfume parecido com o legítimo cedro. Cedro deriva do grego kedros, que significa purificar, perfumar, queimar o lenho do cedro que é utilizado para perfumar ambientes. Já a espécie *fissilis* vem do latim, que significa fácil de rachar (KLEIN, 1984).

Sua forma biológica é caracterizada por ser uma árvore decídua e na idade adulta apresenta altura de 200 a 300 cm de DAP. Quando esmagadas as partes da planta apresentam odor de alho (OLIVEIRA, 1991; RODRIGUES, 2001).

Seu tronco é cilíndrico, pouco tortuoso ou reto, não apresenta sapopemas, ou pouco desenvolvidas. Seu fuste é de até 15 m de comprimento. Sua ramificação é dicotômica com copa alta, múltipla e densa. Apresenta casca de até 40 mm de espessura. A casca externa apresenta cor marrom, bem típica com fissuras longitudinais largas e profundas e a casca interna é amarelada ou avermelhada, com cheiro agradável (IVANCHECHEN, 1988).

O gênero *Cedrela* sp. apresenta madeira considerada leve a moderadamente pesada, com densidade de 0,55 g/cm<sup>3</sup>, macia para o corte e relativamente durável em



ambiente seco. O alburno é caracterizado por possuir cor branca a rosado diferenciando do cerne (LORENZI, 1992). Sua madeira tem diversas finalidades como marcenaria, forros, molduras, esquadrias, construção aeronáutica e naval e instrumentos musicais (RIZZINI, 1981).

*Cedrela* sp. possui parênquima na qual se difere a olho nu, com faixas regulares, vasos médios a grandes predominantemente isolados. Os raios são pouco visíveis a olho nu (MAINIERI et al., 1983). Na forma de resíduo, o cedro é utilizado como lenha, considerada de boa qualidade (REITZ, 1984). Além disso, a casca do cedro é usada para fins medicinais, como combate à febre, tônica e adstringente (CARVALHO, 1994).

Em relação a fenologia, esta espécie floresce de agosto a setembro. Seus frutos estão totalmente maduros quando a árvore está completamente sem folhas, durante junho a agosto (LORENZI, 2014). O cedro é considerado uma espécie alógama, sendo polinizado por mariposas e abelhas devido suas flores possuírem um forte aroma (CARVALHO, 1994). O grupo ecológico ou sucessional da espécie é secundária inicial (VACCARO et al., 1999), secundária tardia (AGUIAR et al., 2001), aclímax (MOTTA et al., 1997) ou espécie clímax exigente de luz (PINTO, 1997). A dispersão dos frutos e sementes da espécie *C. fissilis* é pela queda das sementes no solo, dentro do fruto ou pela ação do vento (ALCÁNTARA et al., 1997; BRINA, 1998).

Os solos profundos, úmidos, bem drenados e com textura argilosa a arenoargilosa são as características mais favoráveis ao desenvolvimento da espécie. Solos pedregosos, rasos e áreas de lençol freático superficial não são os ideais (LORENZI, 2014).

A principal praga na cultura de cedro, seja em viveiros florestais, plantios em escala menor ou na regeneração natural, é o ataque às gemas apicais pela *Hypsipyla grandella* (broca-do-cedro) que pode em casos extremos levar à morte das plantas (CARVALHO, 2008).

### 3.2 *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos

*Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos é da família Bignoniaceae, cujo nome popular é ipê-roxo ou pau-d-arco-roxo. Sua altura pode atingir até 30m, apresenta inflorescências panículas de cor roxa e os frutos são do tipo deiscente do tipo Siliqua. Suas sementes são dispersas pelo vento (LORENZI, 2008).

É uma árvore nativa, porém não é endêmica do Brasil. Sua distribuição fitogeográfica é na Caatinga, biomas Amazônia, Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica. (LOHMANN, 2019).

A espécie apresenta exuberante florescimento nos meses de junho a agosto, por isso, têm um grande potencial paisagístico e também é recomendada para recuperação de áreas degradadas (SAMBUICHI et al., 2009). Os insetos polinizadores adoram suas flores, sendo uma grande fonte nos meses secos do ano (PEREIRA, 2012).

A árvore apresenta uma madeira de boa durabilidade e de alta densidade, resistindo ao intemperismo. É utilizada para diversos fins, como para a construção civil, aplicações externas e na fabricação de instrumentos musicais (LORENZI, 2008; SILVA et al., 2006). A espécie também apresenta várias aplicações na medicina, como relatam diversos autores, como a utilização da entrecasca nos tratamentos odontológicos caseiros, além de ser usado para melhorar o apetite, limpar o organismo, em alergias, inflamações e cicatrizações (BORBA; MACEDO, 2006; GONÇALVES; PASSA, 2015; SHANLEY; MEDINA, 2005). O Ipê-roxo foi a primeira árvore do Cerrado a ter o genoma sequenciado devido à grande importância ecológica no bioma. Com isso, no futuro é possível realizar o plantio comercial dessa espécie sem que ocorra a exploração predatória (EMBRAPA, 2019).

### 3.3 COBRE

#### 3.3.1 Cobre no solo

O solo contaminado por metal torna-se um problema não apenas ambiental, mas também social e econômico. Áreas de produção de uvas, como a serra gaúcha, por exemplo, utilizam muitos produtos fitossanitários com adubação a base de cobre (Cu), contribuindo para que haja o acúmulo deste metal no solo. Este metal, quando em excesso, pode se tornar um grave problema no desenvolvimento das plantas, interferindo nos mecanismos morfofisiológicos e bioquímicos, agindo diretamente na produção, podendo também causar toxidez aos microrganismos do solo, diminuindo assim os minerais de resíduos vegetais (MACKIE et al., 2012; MIOTTO et al., 2014). O teor de matéria orgânica, pH, e óxidos de Fe e Al afetam a concentração de Cu no solo (ALLEONI et al., 2005; MCGRATH et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016;

CHILESHE et al., 2019), sendo que o mesmo é absorvido na forma iônica ( $\text{Cu}^{+2}$ ) pelas plantas (MARSCHNER, 1995; YRUELA, 2009).

O sistema solo-planta do metal Cu se dá por um sistema dinâmico e complexo, afetando o fator do meio, e a pouca mobilidade no solo faz com que este metal fique na superfície, em área de agricultura, dificultando a absorção em perfil em pH acima de 6,0 da solução ocorre o favorecimento da sua retenção (OORTS, 2013). A faixa entre 5 a  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  na matéria seca de Cu é essencial para o pleno desenvolvimento da planta, contribuindo no processo de fotossíntese, como componente da plastocianina, do carregamento de elétrons e da parede celular lignificada, por exemplo. Porém, o limite do dano ao benefício depende do quanto cada espécie absorve (PRADO, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Na possibilidade de amenizar os efeitos do Cu acumulado no solo, há diversos estudos que citam a técnica de fitorremediação. Esta técnica proporciona a escolha de espécies adequadas para ajudar na ciclagem natural do elemento Cu. Portanto, as espécies vegetais selecionadas com potencial de extração ou diminuição do efeito poluente do metal em áreas contaminadas interferem diretamente em pesquisas que visem o aprimoramento da técnica de fitorremediação, de modo que seja viável ao meio ambiente.

### 3.3.2 Efeito do Cobre nas plantas

O elemento Cu é essencial a todos os seres vivos, incluindo os humanos, em razão de atuar como cofator de várias metaloenzimas participantes na formação da hemoglobina e metabolismo de carboidratos, xenobióticos e drogas, além de mecanismos de antioxição celular (ATSDR, 2004). O Cu age como cofator de várias enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), lacases, amino oxidase e plastocianinas. Também atua em atividades moleculares, na transcrição, mobilização de ferro e na fosforilação oxidativa. Contudo, quando estiver em excesso no solo, este elemento pode prejudicar severamente as plantas incorporando grupos sulfidríla nas proteínas e estimulando a peroxidação lipídica das membranas celulares (YRUELA, 2005). O Cu é um micronutriente essencial as plantas, porém é um metal pesado, pois sua alta concentração no solo pode ser danosa as plantas, animais, humanos e aos microrganismos. A quantidade natural de Cu em solos é variável, pois depende da rocha matriz e dos processos de formação do solo (físico-químico e

biológico) sobre a rocha e está principalmente associado à fase sólida do solo (CETESB, 2007).

O cobre atua como elemento estrutural de proteínas, envolvidas na cadeia transportadora de elétrons, cloroplastos e na mitocôndria e, também na resposta ao estresse oxidativo em plantas (GRATÃO et al., 2005; YRUELA, 2009). O Cu está presente em produtos e resíduos de muitas atividades agrícolas, industriais e urbanas. Com isso, pode ocorrer a contaminação da água e do solo. Entre as atividades poluidoras de Cu com grande potencial estão a mineração, lodo de esgoto, dejetos de suínos e áreas de viticultura (ARREDONDO; NÚÑEZ, 2005).

A toxicidade do Cu nas plantas pode restringir o desenvolvimento radicular, causar clorose nas folhas mais jovens, causando danos fisiológicos, nutricionais e hormonais (EMAM-VERDIAN et al., 2015). As plantas por sua vez, apresentam mecanismos de tolerância para reduzir os danos causados por essa contaminação de metal (BHARGAVA et al., 2012). A planta pode evitar o estresse causado pelo metal através da imobilização por meio da participação de micorrizas, sequestro ou complexação por exsudatos de raízes (CAMBROLLE et al., 2015; DE CONTI et al., 2019). Os metais são imobilizados nas paredes celulares e retidos nas raízes nos tecidos nas plantas, evitando que sejam alocados para a parte aérea (EMAMVERDIAN et al., 2015; SILVA et al., 2018). O Cu quando em excesso pode provocar a toxidez as plantas, e com isso pode causar o estresse oxidativo por meio da geração de espécies reativas ao oxigênio, como radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), com consequências ao DNA, por exemplo (DE VOS et al., 1992; SALISBURY; ROSS, 1992). As plantas podem apresentar efeitos negativos como na fisiologia e nos nutrientes em razão desses efeitos tóxicos, os quais acarretam dificuldades no desenvolvimento e estabelecimento quando estiverem sendo cultivadas em solos que apresentem alto teor de Cu disponível (MARSHNER, 1995; SANTOS et al., 2004). Apesar disso, a vegetação torna-se uma alternativa na recuperação de solos com altas doses desse elemento, ao mesmo tempo que o Cu pode atuar no ciclo biológico e desempenhar efeitos nocivos as mesmas (SALT et al., 1995; KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

Com isso, as espécies arbóreas podem diminuir a lixiviação, reduzir a erosão e acumular matéria orgânica ao solo, levando à complexação dos metais pesados. Em

contrapartida, as árvores podem acidificar o solo, produzindo assim matéria orgânica solúvel causando a lixiviação de metais.

### 3.3.3. Fitorremediação

A fitorremediação é uma estratégia bastante empregada quando o objetivo é restauração de cobertura vegetal em área contaminada de metais tóxicos. Esta técnica envolve a remoção ou retenção de metais tóxicos e redução da erosão do solo. As espécies arbóreas são escolhidas para tal finalidade, pois possuem alto acúmulo de biomassa e um sistema radicular denso e com isso imobilizam os metais nos tecidos da planta, retardando seu retorno ao solo (KANG et al., 2018).

As plantas são capazes de responder as modificações que acontecem no ambiente que habitam. Quando essas alterações excedem o limite de sua adaptação ou passam a ser limitantes a sua sobrevivência, estas criam mecanismos de respostas e apresentam características morfológicas incomuns, com isso possuem potencial como plantas indicadoras de riscos ambientais (JOANNA, 2006). As plantas podem indicar a qualidade do ar, solo e da água. Quando a qualidade do ar esta baixa, as plantas indicadoras apresentam sintomas visuais, essencialmente na perda da coloração verde das folhas (SCHREIBER et al., 2013). A qualidade do solo diz respeito a plantas mais adaptadas a algumas condições como umidade, pH, temperatura, salinidade e fertilidade. Na Amazônia, por exemplo, espécies como *Portulaca oleracea* L. e *Commelina erecta* L., indicam solos férteis (COSTA et al., 2011; TAMIOZZO et al., 2012; JUNQUEIRA et al., 2013). Já a qualidade da água pode ser indicada por plantas macrófitas, sendo que em rios ricos em nutrientes e pH neutros estas se desenvolvem em grande quantidade, entretanto quando houver poucos nutrientes e pH ácido, a população de plantas reduz, como em *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl. (LOPES et al., 2015).

A técnica de fitorremediação permite recuperar áreas contaminadas por metais com menor custo de gestão, além de manter a proteção ambiental e gerar retorno econômico por meio de produtos florestais (SHUKLA et al., 2011). Porém, quando há excesso de metais no solo pode ocorrer danos na fase inicial de crescimento e desenvolvimento das espécies arbóreas (SOUZA et al., 2012).

Aspectos como tolerância, acúmulo e a translocação de metais pesados para a parte aérea são características essenciais na seleção de espécies fitorremediadoras (FAN

et al., 2011), tornando assim a implementação da fitorremediação bem-sucedida (HUSSAIN et al., 2017).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, O. T. de; PASTORE, J. A.; ROCHA, F. T.; BAITELLO, J. B. Flora fanerogâmica de um trecho da floresta densa secundária no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Cunha/Indaiá – Cunha (SP). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2001.

ALCÁNTARA, J. M. et al. **Análise de la dispersión de semillas de *Cedrela fissilis* en el bosque nativo de Misiones**. Yvyrareta, Eldorado, n. 8, p. 16-21, 1997.

ALLEONI, L. R. F. et al. <b>Atributos do solo relacionados à adsorção de cádmio e cobre em solos tropicais</b>; - DOI: 10.4025/actasciagron. v27i4.1348. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 4, p. 729-737, 7 abr. 2008.

ANGELO, H.; BRASIL, A.A.; SANTOS, J. Madeiras tropicais: análise econômica das principais espécies florestais exportadas. **Acta Amazonica**, v.31, n.2, p.237-248, 2001.

ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M.T. Iron and copper metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, 26: 313-327, 2005.

ATSDR - Toxicological profile for copper. New York, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 314 p., 2004.

AUGUSTO, A. S. et al. Bioacumulação de Metais Pesados em *Brassica juncea*: Relação de Toxicidade com Elementos Essenciais. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.6, n. 5, p. 1221-1236, 2014.

BHARGAVA, A. et al. Abordagens para fitoextração aprimorada de metais pesados. **Journal of Environmental Management**. 105, 103-120. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.002>, 2012.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**. v. 20, n. 4, p. 771- 782. 2006.

BRINA, A. E. Aspectos da dinâmica da vegetação associada a afloramentos calcários na APA Carste de Lagoa Santa, MG. Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**, 1998. 105p. Dissertação Mestrado.

CAMARGO, F. A. O. et al. Uso de microrganismos para a remediação de metais. **Tópicos Especiais em Ciência do Solo**, Viçosa, v.5, p. 467 – 496, 2007.

CAMBROLLE, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, v.120, p.171-178.<https://doi.org/10.1016/j. Chemosphere.2014.06.044>, 2015.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. Colombo, PR Outubro, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa. 1994. 640 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. Colombo, PR Outubro, 2008.

CETESB [Centro Tecnológico de Saneamento Ambiental] (2007) - Variáveis de qualidade das águas (em linha). São Paulo, **Secretaria Estadual do Meio Ambiente**. (Acesso em 10.05.2021). Disponível em < <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/variaveis.asp> >.

CHILESHE, M. N. et al. 2019. **Características físico-químicas e concentrações de metais pesados de resíduos de minas de cobre na Zâmbia**: implicações para o risco de poluição e restauração. *Journal of Forestry Research*. 1-11 <https://doi.org/10.1007/s11676-019-00921-0>.

COSTA, R.S.C. et al. **Levantamento de plantas daninhas em cafezais, em solos com diferentes níveis de fertilidade em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2011. 4p. (Comunicado Técnico, 367).

DE CONTI, L. et al. Consórcio de videiras jovens com gramíneas nativas para fitorremediação de solos contaminados com Cu. **Chemosphere**, v.216, p.147-156. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.134>, 2019.

DE VOS, C. H. R.; VONK, M. J.; SCHAT, H. Glutathione depletion due to copper induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 98, n. 3, p. 853-858, Mar. 1992.

EMAMVERDIAN, A. et al. Stress de metais pesados e alguns mecanismos de resposta de defesa da planta. **The Scientific World Journal**. 756120. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>, 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. ampl. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2009. 627p.

FAN, K.C. et al. 2011. Acúmulo de cádmio e tolerância de mudas de mogno (*Swietenia macrophylla*) para aplicações de fitoextração. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p.2818–2822. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.032>.

GONÇALVES, DAM et al. Adsorção de cádmio e cobre em solos representativos da Amazônia Oriental. Brasil. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 37, p.3005. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3005>, 2016.

GRATÃO, P. L. et al. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HUSSAIN, S. et al. 2017. Tolerância ao arsênio e potencial de fitorremediação de *Conocarpus erectus* L. e *Populus deltoides* L. **International Journal of Phytoremediation**, v.19, p.985–991. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303815>.

IVANCHECHEN, S. L. **Estudo morfológico e terminológico do tronco e “casca” de 30 espécies arbóreas em floresta ombrófila mista**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1988. 221p. Tese Mestrado.

JOANNA, B. Bioindicators: types, development, and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v.1, n.1, p. 22-39, 2006.

JUNQUEIRA, A.C. et al. Sistemas agroflorestais e mudanças na qualidade do solo em assentamento de reforma agrária. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.1, n.8, p.102-115, 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer, 2007, 450 p.

KANG, K. Y., LEE, J. J., KIM, P. J., YOON, H. S., KIM, J. S. & LEE, B. H. AHSAN, N., LEE, D. G., LEE, S. H. 2018. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. **Chemosphere**, 67(6): 1182-1193.

KLEIN, R. M. Meliaceas. Itajai: **Herbario Barbosa Rodrigues**, 1984. 140p. (Flora Ilustrada Catarinense).

LOHMANN, L. G. **Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114086>>. Acesso em: 03 de junho 2021.

LOPES, A. et al. **Conhecendo as macrófitas aquáticas da Amazônia**. In: LOPES, A.; PIEDEDE, M.T.F. (Org.). Conhecendo as áreas úmidas amazônicas: uma viagem pelas várzeas e igapós. Manaus: Editora INPA p.53-62, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, p.368, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas Nativas do Brasil**. 5 ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008. 384 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6. ed. São Paulo: Editora Plantarum, v.1, 2014. p.266.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil** Nova Odessa: Plantarum, 1992.



MACKIE, K. A.; MÜLLER, T.; KANDELER, E. Remediation of copper in vineyards e A mini review. **Journal Environmental Pollution**, California, n. 167, p. 16-26. 2012. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.03.023.

MAIA-SILVA, C. et al. **Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga**. Editora Fundação Brasil Cidadão, Fortaleza-CE, 1ª Edição. 2012.

MAINIERI, C.; ANGYALOSSY ALFONSO, V. **Manual de identificação das principais madeiras comerciais brasileiras**. São Paulo: IPT, 1983.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MCGRATH, JM, SPARGO, J., PENN, CJ, 2014. Fertilidade do solo e nutrição das plantas. In: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, pp. 166-184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00249-7>.

MILNER, M. J.; KOCHIAN, L. V. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. **Annals of Botany**, v. 102, n.1, p. 3- 13, 2008.

MIOTTO, A. et al. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, p. 593-610, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1886-7

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLS, 2006. 625 p.

MOTTA, M. L. e; BENVENUTTI, R. D.; ANTUNES, E. C. **Aplicação dos estudos fitossociológicos ao reflorestamento ciliar do Vale do Rio Turvo-GO**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto.

OLIVEIRA, V. P. de. **Levantamento fitossociológico das espécies arbóreas nativas de uma comunidade da floresta estacional semidecidual do Município de Guapirama – Norte Pioneiro do Paraná**. 1991. 79 f. Tese (Especialista em Ecologia) Fundação Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Guarapuava – Guarapuava.

OORTS, K. **Copper**. In: ALLOWAY, B. J. (ed.) **Heavy Metals in Soils - trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**. 3th Edition Springer Environmental Pollution, v. 22. 2013. p. 367-394.

PEREIRA, WVS. et al. Fracionamento químico e bioacessibilidade de elementos potencialmente tóxicos na área de mineração artesanal de ouro no Amazonas. **J. Environ. Manag.**, v. 267, p. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.Jenvman.2020.110644>, 110644, 2020.

PEREIRA, M. S. **Manual técnico conhecendo e produzindo sementes e mudas da caatinga Fortaleza**. Associação Caatinga, 2012. 60 p.

PINTO, J. R. R. **Levantamento florístico, estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva e suas correlações com variáveis ambientais em uma floresta de vale no**

**Parque Nacional da Chapada dos Guimarães**, Mato Grosso. 1997. 85 p. Dissertação (Mestrado em Manejo Ambiental) - Universidade Federal de Lavras, Lavras

PRADO, R. M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: UNESP, 2008, 408p.

REITZ, R. **Meliaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. (Flora Ilustrada Catarinense).

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo, E. Blücher, 1981.296p.

RODRIGUES, L. A. **Estudo florístico e estrutural da comunidade arbustiva e arbórea de uma Floresta em Luminárias, MG, e informações etnobotânicas da população local**. 2001. 184 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. Califórnia: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.

SALT, D. E. et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1427-1433. 1995.

SAMBUICHI, R. H. R.; MIELKE, M. S.; PEREIRA, C. E. **Nossas árvores: conservação, uso e manejo de árvores nativas no sul da Bahia: conservação, uso e manejo de árvores nativas no sul da Bahia**. 1 ed. Ilhéus-BA : Editus , 2009. 296 p.

SAMPAIO, M. T. F.; POLO, M.; BARBOSA, W. Estudo do crescimento de espécies de árvores semidecíduas em uma área ciliar revegetada. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 879-885, 2012.

SANTOS, H. P. et al. Comportamento fisiológico de plantas de aveia (*Avena strigosa*) em solos com excesso de cobre. Bento Gonçalves: **EMBRAPA Uva e vinho**, 2004. 10 p. (Comunicado Técnico n. 49).

SARWAR, N. et al. Estratégias de fitorremediação para solos contaminados com metais pesados: modificações e perspectivas futuras. **Chemosphere**, v. 171, p. 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>, 2017.

SCHREIBER, F. et al. Plantas indicadoras de clomazone na fase vapor. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.43, n.10, p.1817-1823, 2013.

SCHULZE, M. et al. Evaluating ipê (*Tabebuia* Bignoniaceae) logging in Amazônia: sustainable management or catalyst for forest Degradation? **Biological Conservation**, v.141, p.2071-2085, 2008.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. 1 ed. Belém-PA: CIFOR, Imazon, 2005. 300 p.

SHUKLA, OP. et al. 2011. Respostas de crescimento e capacidades de acumulação de metal de plantas lenhosas durante a fitorremediação de lodo de curtume. **Waste Manag.**, v. 31, p.115–123.<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.08.022>.

SILVA, J. O. E.; PASTORE, T. C. M.; PASTORE JUNIOR, F. Resistência ao intemperismo artificial de cinco madeiras tropicais e de dois produtos de acabamento. **Ciência florestal**, Santa Maria-RS, v. 20, n. 1, p. 17-23, 2006.

SILVA, ICB. et al. Crescimento, resposta bioquímica e estado nutricional de Angico-Vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan) sob aplicação de corretivo de solo em solo contaminado com Cu. **Int. J. Phytoremediation**, v. 20, p. 1380–1388.<https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1474438>. 2018.

SOUZA, SCR. et al. Tolerância ao chumbo e potencial de fitorremediação de leguminosas arbóreas brasileiras na fase de plântula. **J. Environ. Manag.**, v. 110, p. 299-307.<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.015>, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848p.

TAMIOZZO, S.; LIMA, S.L.; THEODORO, V.C.A. Diagnóstico da qualidade do solo em agroecossistemas de pastagem por meio da ocorrência da vegetação espontânea como indicador biológico. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.10, n.2, p.183-192, 2012.

VACCARO, S.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma floresta estacional Decidual, no Município de Santa Tereza - RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p.1-18, 1999.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 145- 156, jan/mar. 2005.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

## 5 MANUSCRITOS

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados em dois manuscritos, como segue:

Manuscrito I: **POTENCIAL BIOINDICADOR DE MUDAS DE *Cedrela fissilis* EM ÁREAS CONTAMINADAS POR COBRE.**

Manuscrito II: ***Handroanthus heptaphyllus* É UMA ESPÉCIE TOLERANTE AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO.**

## 6 MANUSCRITO I - POTENCIAL BIOINDICADOR DE MUDAS DE *Cedrela fissilis* EM ÁREAS CONTAMINADAS POR COBRE.

### RESUMO

AUTORA: Caroline Castro Kuinchtner  
ORIENTADOR: Luciane Almeri Tabaldi

A contaminação por metais tóxicos ocasiona grandes consequências ambientais. Dentre estes elementos, o cobre (Cu) é danoso ao desenvolvimento das plantas quando atinge altos níveis de contaminação no solo, podendo ocorrer perdas ou supressão da vegetação, por isso a identificação de espécies resistentes a esta contaminação auxilia no processo de revegetação e descontaminação destes locais. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo caracterizar a morfofisiologia e bioquímica de plantas de *Cedrela fissilis* (cedro) expostas ao Cu, cultivadas em sistema hidropônico em casa de vegetação. As mudas com 10 cm de altura foram transferidas para o sistema hidropônico para aclimação em solução nutritiva completa. Após o período de aclimação (sete dias) foram adicionadas as seguintes concentrações de Cu à solução nutritiva: 0, 2, 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>. A espécie permaneceu exposta por 21 dias ao Cu, e, durante este período, foram realizadas medições de comprimento de raiz e parte aérea antes e depois da aplicação de Cu. Após os 21 dias avaliou-se as variáveis fotossintéticas e foram coletadas separadamente parte aérea e radicular das mudas para avaliação das análises dos atributos morfológicos (incremento no número de folhas, altura e comprimento de raízes, biomassa seca, variáveis morfológicas do sistema radicular e área foliar), bioquímicos (enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos) e concentração de Cu nos tecidos. Observou-se que as concentrações de Cu afetaram de forma negativa o incremento em parte aérea, em raízes, no número de folhas, na taxa de assimilação líquida (A), condutância estomática (Gs), taxa transpiratória (E), e eficiência de carboxilação da rubisco (A/Ci). De uma forma geral, o Cu promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e guaiacol peroxidase. A peroxidação lipídica nas raízes foi maior conforme o aumento das concentrações de Cu. Além disso, observou-se um maior teor de Cu somente nas raízes de mudas de *C. fissilis* com o aumento da concentração de Cu no meio de crescimento. Portanto, a presença de Cu na solução nutritiva alterou negativamente as variáveis bioquímicas e fisiológicas das mudas de *C. fissilis*, sendo prejudiciais ao crescimento das mesmas, e com isso, observou-se um comportamento sensível da espécie. Devido a essas características, as mudas de *C. fissilis* podem ser utilizadas como sinalizadoras de áreas contaminadas.

**Palavras-chave:** Cedro. Elemento essencial. Espécie nativa. Metal. Toxidez.

## ABSTRACT

### BIOINDICATOR POTENTIAL OF *Cedrela fissilis* SEEDLINGS IN COPPER CONTAMINATED AREAS.

AUTHOR: Caroline Castro Kuinchtner

ADVISOR: Luciane Almeri Tabaldi

Contamination by toxic metals has great environmental consequences. Among these elements, copper (Cu) is harmful to the development of plants, when it reaches high levels of contamination in the soil, with possible loss or suppression of vegetation, so the identification of resistant species to this contamination helps in the process of revegetation and decontamination of these locations. In this sense, the study aimed to characterize the morphophysiology and biochemistry of *Cedrela fissilis* (cedro) seedlings exposed to Cu, grown in a hydroponic system in a greenhouse. The 10 cm tall seedlings were transferred to the hydroponic system for acclimatization in a complete nutrient solution. After the acclimation period (seven days) the following Cu concentrations were added to the nutrient solution: 0, 2, 4, 6 and 8 mg L<sup>-1</sup>. The species remained exposed to Cu for 21 days, and during this period measurement of root and shoot length were performed before and after Cu application. After 21 days, photosynthetic variables were evaluated and shoot and roots of the seedlings were separately collected to evaluate the analysis of morphological attributes (increase in the number of leaves, height and length of roots, dry biomass, morphological variables of the root system and area foliar), biochemicals (antioxidant enzymes, lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and photosynthetic pigments) and tissue Cu concentration. It was observed that Cu concentrations negatively affected the increase in shoot, roots, number of leaves, net assimilation rate (A), stomatal conductance (Gs), transpiration rate (E), and efficiency of rubisco carboxylation (A/Ci). In general, Cu promoted an increase in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and guaiacol peroxidase. The lipid peroxidation in the roots was higher as the Cu concentrations increased. Furthermore, a higher Cu content was observed only in the roots of *C. fissilis* seedlings with an increase in the Cu concentration in the growth medium. Therefore, the presence of Cu in the nutrient solution negatively altered the biochemical and physiological variables of *C. fissilis* seedlings, being harmful to their growth, and thus, a sensitive behavior of the species was observed. Due to these characteristics, *C. fissilis* seedlings can be used as markers of contaminated areas.

**Keywords:** Cedro. essential element, native species. metal. toxicity

## 6.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, uma adversidade que está em ascensão, e está se tornando um grave problema ao meio ambiente é a poluição do solo com metais tóxicos, por meio das intensas atividades agrícolas, industriais e urbanas (MELO et al., 2014). Os metais tóxicos são elementos que afetam as características biológicas e fisiológicas das plantas, prejudicando, assim o desenvolvimento das mesmas. Os metais pesados estão associados ao caráter ácido da grande maioria dos solos brasileiros, e dentre esses metais pode-se citar como exemplo o cobre (Cu). A contaminação do solo por Cu se dá principalmente em atividades antrópicas, no uso de fertilizantes, esterco aviários, chorumes, fungicidas, bactericidas e rejeitos da mineração (DUČIĆ; POLLE, 2005).

A contaminação por Cu é um grande problema para a produtividade das plantas cultivadas, sendo este elemento um inibidor da absorção de nutrientes fundamentais, além de causar efeitos negativos sobre o desenvolvimento e o equilíbrio das plantas quando encontrado em excesso no ambiente (SARWAR et al., 2017). As plantas podem apresentar alteração na absorção, translocação e funções dos nutrientes (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002). Além disso, pode ocorrer alterações nos processos fisiológicos, como a fotossíntese, atividade enzimática, respiração e crescimento, influenciando a produtividade das plantas (KÄRENLAMPI et al., 2000). Desse modo, a fitorremediação pode ser uma alternativa viável, eficiente e de baixo custo para a recuperação destes locais contaminados por Cu, sendo necessário avaliar a utilização de plantas resistentes e/ou tolerantes (ANDREAZZA et al., 2011).

Uma espécie interessante para ser estudada na fitorremediação é a *Cedrela fissilis* Vell., pertencente à família Meliaceae, com nome popular de cedro, cedro-rosa ou cedro-vermelho. Sua dispersão é ampla, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, encontrada principalmente na Floresta Atlântica, que abrange Santa Catarina, sendo encontrada também no norte da Argentina, Panamá e Costa Rica (INOUE et al., 1984; REITZ et al., 1988). *C. fissilis* é conhecida como uma espécie arbórea de ampla dispersão de sementes, principalmente no estado do Paraná. É bastante apreciada por ser uma das principais espécies madeireiras da flora brasileira (LORENZI, 2014).

Tendo em vista a contaminação ambiental por Cu e seus riscos à saúde humana e ao ambiente, o presente estudo teve como objetivo avaliar variáveis morfofisiológicas e bioquímicas em plantas de *C. fissilis* (Cedro) expostas ao Cu em sistema hidropônico,

pois essa espécie tem potencial florestal e possui poucos estudos a respeito da sua relação com a exposição ao excesso de Cu.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - *Campus* Santa Maria - RS, com controle de temperatura a aproximadamente 25°C, e umidade do ar de 60% em média. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Nutrição de Plantas do Departamento de Biologia.

### 6.2.2 Condução do experimento

Para a produção das mudas utilizou-se sementes do subprograma Bolsa de Sementes, do Viveiro Florestal da UFSM – *Campus* Santa Maria, as quais foram semeadas em substrato comercial Carolina Soil® composto por turfa de *Sphagnum* e vermiculita. Foram utilizadas bandejas plásticas (38 cm x 56 cm) como recipientes de cultivo para germinação e crescimento inicial das mudas de cedro. Durante o período experimental, a irrigação do substrato foi realizada em média a cada dois dias.

As mudas de *Cedrela fissilis* foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado. Estas mudas foram submetidas a diferentes concentrações equidistantes de Cu: 0 (solução nutritiva completa), 2, 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>, com quatro repetições por tratamento e 16 plantas por repetição. A concentração 0 de Cu equivale a concentração padrão de Cu na solução nutritiva (concentração adequada de Cu). Nos demais tratamentos, foram acrescentadas as diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva completa.

A partir do 15º dia após a semeadura (DAS), as mudas receberam fertirrigação semanal, com solução nutritiva completa, com pH em 5,7±0,1. A solução nutritiva foi formada por (em µM) sendo: 6090,5 de Nitrogênio; 974,3 de Magnésio; 4986,76 de Cloro; 2679,2 de Potássio; 2436,2 de Cálcio; 359,9 de Enxofre; 243,592 de Fósforo;



0,47 de Cobre; 2,00 de Manganês; 1,99 de Zinco; 0,17 de Níquel; 24,97 de Boro; 0,52 de Molibdênio e 47,99 de Ferro ( $\text{FeSO}_4/\text{Na-EDTA}$ ) (HOAGLAND; ARNON, 1950).

Após aproximadamente 3 meses da semeadura nas bandejas, e quando as mudas estavam com altura homogênea aproximadamente de 10 cm, as mesmas foram retiradas cuidadosamente do substrato e transferidas para o sistema hidropônico. Em seguida, cada muda foi acondicionada em uma bandeja com capacidade de 16 L, contendo solução nutritiva completa de Hoagland; Arnon (1950). Na superfície de cada vaso foi adicionada uma lâmina de isopor, com quatro orifícios centrais, para permitir a passagem das plantas. A lâmina de isopor permitiu a fixação das plantas, e a diminuição da evaporação da solução contida em cada vaso.

As mudas foram aclimatadas durante sete dias em solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) com 100% da sua concentração original. A aeração da solução em cada bandeja foi feita por microtubos de PVC conectados a um compressor de ar. Os microtubos foram inseridos na solução por meio da lâmina de isopor presente em cada bandeja.

A solução nutritiva, na forma original, contém as seguintes concentrações em  $\text{mg L}^{-1}$ :  $\text{NO}_3^- = 196$ ;  $\text{NH}_4 = 14$ ;  $\text{P} = 31$ ;  $\text{K} = 234$ ;  $\text{Ca} = 160$ ;  $\text{Mg} = 48,6$ ;  $\text{S} = 70$ ;  $\text{Fe-EDTA} = 5$ ;  $\text{Cu} = 0,02$ ;  $\text{Zn} = 0,15$ ;  $\text{Mn} = 0,5$ ;  $\text{B} = 0,5$ ;  $\text{Mo} = 0,01$ .

Após a aclimação, procedeu-se a aplicação dos tratamentos, onde as mudas permaneceram por 14 dias nas diferentes condições de disponibilidade de Cu, totalizando 21 dias em sistema hidropônico. As plantas foram coletadas a partir do momento onde sintomas de toxicidade de Cu foram observados aos 21 dias, principalmente nas maiores concentrações de Cu. A solução nutritiva em cada bandeja foi substituída duas vezes por semana, e seu pH foi ajustado diariamente para  $5,7 \pm 0,1$ , com  $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$  ou  $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 6.2.3 Variáveis fotossintéticas

As avaliações das variáveis fotossintéticas foram realizadas na terceira folha completamente expandida, com a utilização de um analisador de gás por radiação infravermelho [infra red gás analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT] utilizando uma radiação fotossintética de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e concentração de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . As medições foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 10:00 horas, antes da coleta das plantas para as análises de crescimento. Nessa ocasião, foram

determinadas as seguintes variáveis: taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), taxa transpiratória (E), condutância estomática (Gs), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), eficiência de carboxilação instantânea da Rubisco (A/Ci - obtida pela razão entre a taxa fotossintética e a concentração intercelular de CO<sub>2</sub>), e eficiência de uso da água (EUA – obtida pela razão entre a taxa fotossintética e a taxa transpiratória).

#### 6.2.4 Determinação das variáveis de crescimento

Para as avaliações de crescimento coletou-se quatro plantas em cada unidade experimental. Após a coleta, as plantas foram seccionadas em parte aérea e raízes. Em seguida, as amostras já separadas foram encaminhadas para a determinação das variáveis de crescimento.

A mensuração da altura da parte aérea e comprimento das raízes das mudas foi realizada com o auxílio de uma régua milimétrica. As medidas foram executadas antes e depois da aplicação dos tratamentos, assim como a contagem do número de folhas, sendo considerado como incremento no crescimento nesse período.

Para a determinação da massa seca da parte aérea (MSPA; g planta<sup>-1</sup>), massa seca da raiz (MSR; g planta<sup>-1</sup>) e massa seca total (MST = MSPA + MSR; g planta<sup>-1</sup>), as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea e sistema radicular, lavadas em água corrente e secas em estufa com circulação forçada de ar a aproximadamente 65 °C, até peso constante para posterior determinação das variáveis supracitadas.

A caracterização morfológica das raízes foi obtida a partir de imagens digitalizadas, utilizando o software WinRhizo Pro 2013 acoplado ao scanner EPSON Expression 11000 equipado com luz adicional (TPU), com uma resolução de 600 DPI. Mensurou-se o comprimento de raízes (cm planta<sup>-1</sup>), diâmetro médio radicular (mm) e número de ramificações.

#### 6.2.5 Determinação das variáveis bioquímicas

Para as variáveis bioquímicas, foram coletadas 12 plantas de cada tratamento, tendo um total de 240 plantas. Em seguida, tais plantas foram seccionadas em parte aérea e raízes, lavadas com água destilada, colocadas em envelopes de papel alumínio, e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido para evitar a degradação da amostra.

As mesmas foram mantidas em ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o pré-preparo das amostras para as análises. O preparo das amostras foi realizado através do processo de maceração manual com nitrogênio líquido, sendo que cada amostra foi macerada até obter a forma de um pó fino. Posteriormente, foi pesada em balança digital de precisão a quantidade específica para cada análise realizada, sendo: 0,05 g de amostra fresca para a determinação de pigmentos das folhas, 0,5 g para enzimas antioxidantes, 0,3 g para peróxido de hidrogênio e 0,5 g para peroxidação lipídica.

#### 6.2.6 Conteúdo de pigmentos (clorofilas totais e carotenoides)

Para a extração das clorofilas totais e carotenoides utilizou-se o método de Hiscox; Israelstan (1979), e para estimá-las foi usada a equação de Lichtenthaler (1987). As amostras previamente pesadas em tubos falcon de 15 mL foram dispostas em grades, e 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado. Os tubos foram incubados a  $65^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente uma hora e meia, até que os pigmentos se soltassem por completo, resultando em uma solução de tonalidade verde escura. Posteriormente, essa solução foi separada em duas repetições de 2 mL cada. As absorvâncias da solução foram medidas em espectrofotômetro UV-visível (1105, Bel Photonics), nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm, respectivamente para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

#### 6.2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes foram determinadas por meio da adição de 0,5 g de amostra em 3 mL de tampão de extração de homogeneização (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a  $13.000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga (High-Speed Refrigerated Centrifuge – CR22 N), e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas e concentração de proteínas (ZHU et al., 2004).

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM) na cubeta de quartzo. Após homogeneização, foi

adicionado 50  $\mu\text{L}$  do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida através da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol pelo aumento na absorbância a 470 nm, em intervalos de leitura de 15 segundos. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína). Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de  $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis; Ries (1977). A mistura de reação (MIX) que foi mantida no escuro, continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, EDTA 0,1 Mm, nitrobluetetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$  e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ . A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm.

A reação foi realizada em tubos de ensaio (13 x 100 mm) a  $25^\circ\text{C}$ , contendo em cada tubo 2,8 mL de mistura de reação (MIX), e 200  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático das respectivas amostras. Após a pipetagem os tubos foram colocados em uma câmara de reação, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Desse modo, a reação teve início ligando-se a luz e após dois minutos de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz, e em seguida as amostras foram lidas no espectrofotômetro UV-visível (1105, BelPhotonics).

Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). No ensaio, a riboflavina fotoquimicamente excitada é reduzida pela metionina em semiquinona, que doa um elétron ao oxigênio, formando o radical superóxido que, por sua vez, converte NBT em formazana azul. A superóxido dismutase catalisa esta reação.

#### 6.2.8 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado de acordo com Loreto; Velikova (2001). Amostras (0,3 g) de raízes e folhas foram homogeneizadas em 3,0 mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas. Adicionou-se 0,5 mL do sobrenadante em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) e 1 mL de KI (1M), e foi realizada a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 390 nm. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  do sobrenadante foi avaliada comparando suas leituras com uma curva padrão de calibração. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi expressa como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso fresco.

### 6.2.9 Peroxidação de lipídeos de membrana

A peroxidação lipídica foi determinada pela concentração de malondialdeído (MDA), seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993). Amostras de folhas e raízes (0,5 g) foram homogeneizadas em 4,0 mL de tampão citrato de sódio (pH 6,5) e centrifugadas. Um mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (w/v) contendo 0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 40 min e então resfriada em banho de gelo por 15 min, sendo centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 e 600 nm (para corrigir a turbidez não específica). A peroxidação lipídica foi expressa como nmol de MDA mg<sup>-1</sup> de proteína.

### 6.2.10 Análise de tecidos

Para a determinação do teor de cobre (Cu) nos tecidos das plantas de *Cedrella fissilis* foi utilizado a metodologia da EMPRAPA (2009) de Digestão nitro-perclórica (via úmida ácida). A solubilização das amostras foi feita com solução nitro-perclórica (ácidos nítrico -65% e perclórico -70%). A partir da digestão nitro-perclórica pode-se determinar, posteriormente alguns macro e microelementos, como o Cu, utilizado neste trabalho. Os cálculos de teor de Cu nos tecidos foram determinados conforme Tedesco et al. (1995) e expressos como mg kg<sup>-1</sup>.

### 6.2.11 Análise Estatística

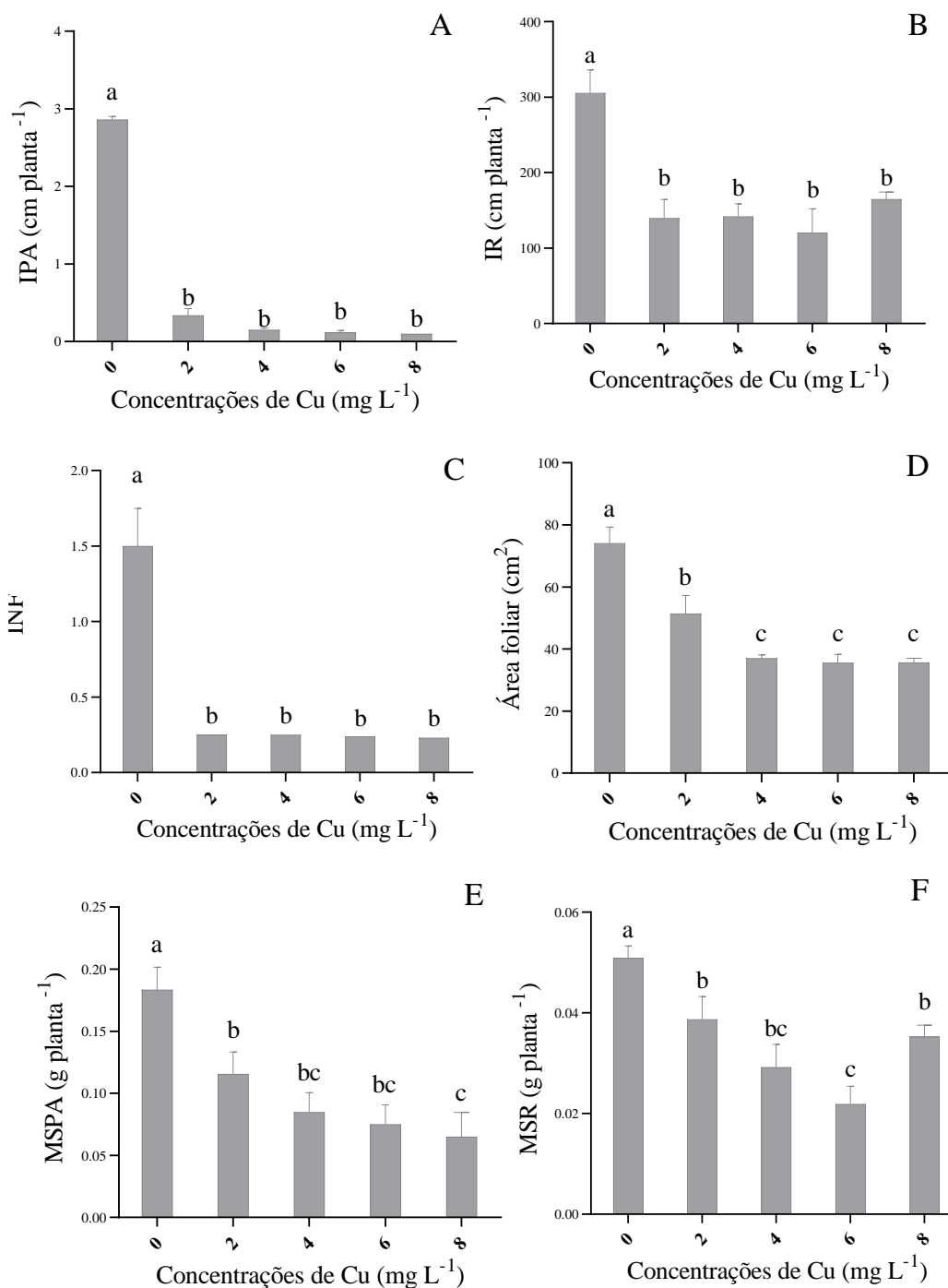
Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett (STORCK et al., 2016). Após atendimento dos pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias diferenciadas pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software estatístico SISVAR v 5.6 (FERREIRA, 2014).

### 6.3 RESULTADOS

Conforme o resultado da análise de variância verificou-se que houve efeito ( $p \leq 0,05$ ) para o fator avaliado (diferentes concentrações de Cu) para as variáveis morfológicas de crescimento.

Para as variáveis incremento em parte aérea (IPA) (Figura 1A), incremento em raízes (IR) (Figura 1B) e incremento em número de folhas (INF) (Figura 1C) pode-se observar que todas as concentrações de Cu afetaram de forma negativa essas variáveis, ou seja, as maiores médias foram evidenciadas no tratamento controle ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ), diferindo dos demais tratamentos. Para a área foliar (Figura 1D) e massa seca da parte aérea e das raízes (Figuras 1E e F) também se observou que as maiores médias foram evidenciadas no controle. Entretanto, pode-se observar que a menor média para a variável massa seca da parte aérea foi proporcionada pela maior concentração de Cu ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ), mas não diferiu das concentrações 4 e  $6 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 1E), ao passo, que o menor valor para a massa seca das raízes foi evidenciada na condição de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu, não diferindo da concentração de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  (Figuras 1F).

Figura 1 - Valores médios de incremento em parte aérea (IPA) (A), incremento em raiz (IR) (B), incremento em número de folhas (INF) (C), área foliar (D), massa seca da parte aérea (MSPA) (E) e massa seca da raiz (MSR) (F) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu



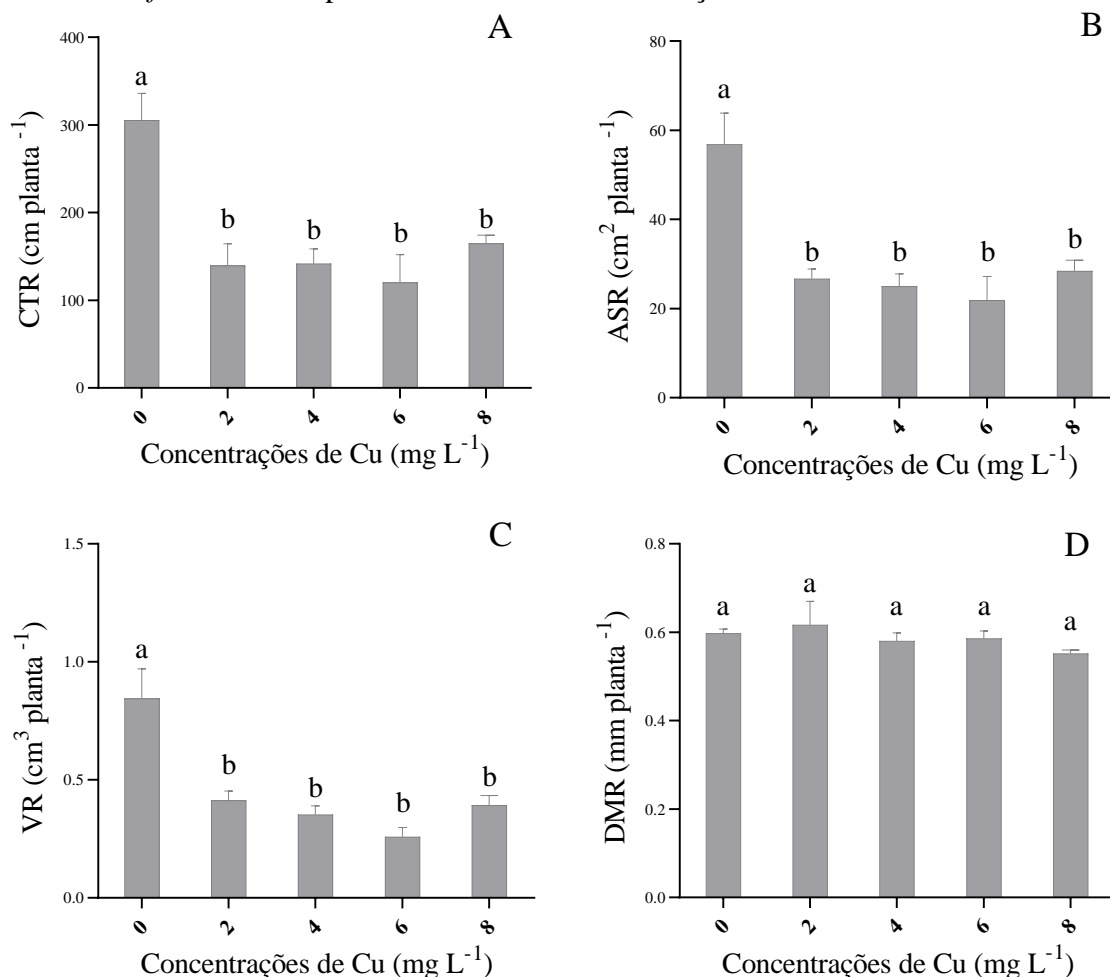
\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

A aplicação das diferentes concentrações de Cu resultou em efeitos negativos mais severos para o comprimento de raízes (Figura 2A), área superficial de raízes

(Figura 2B) e volume de raízes (Figura 2C), em relação ao tratamento controle. Por outro lado, não foi observada diferença para a variável diâmetro de raízes independente das concentrações de Cu testadas (Figura 2D).

Figura 2 - Valores médios de comprimento (CTR) (A), área superficial (ASR) (B), volume (VR) (C) e diâmetro de raízes (DMR) (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu



\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média ± desvio padrão.

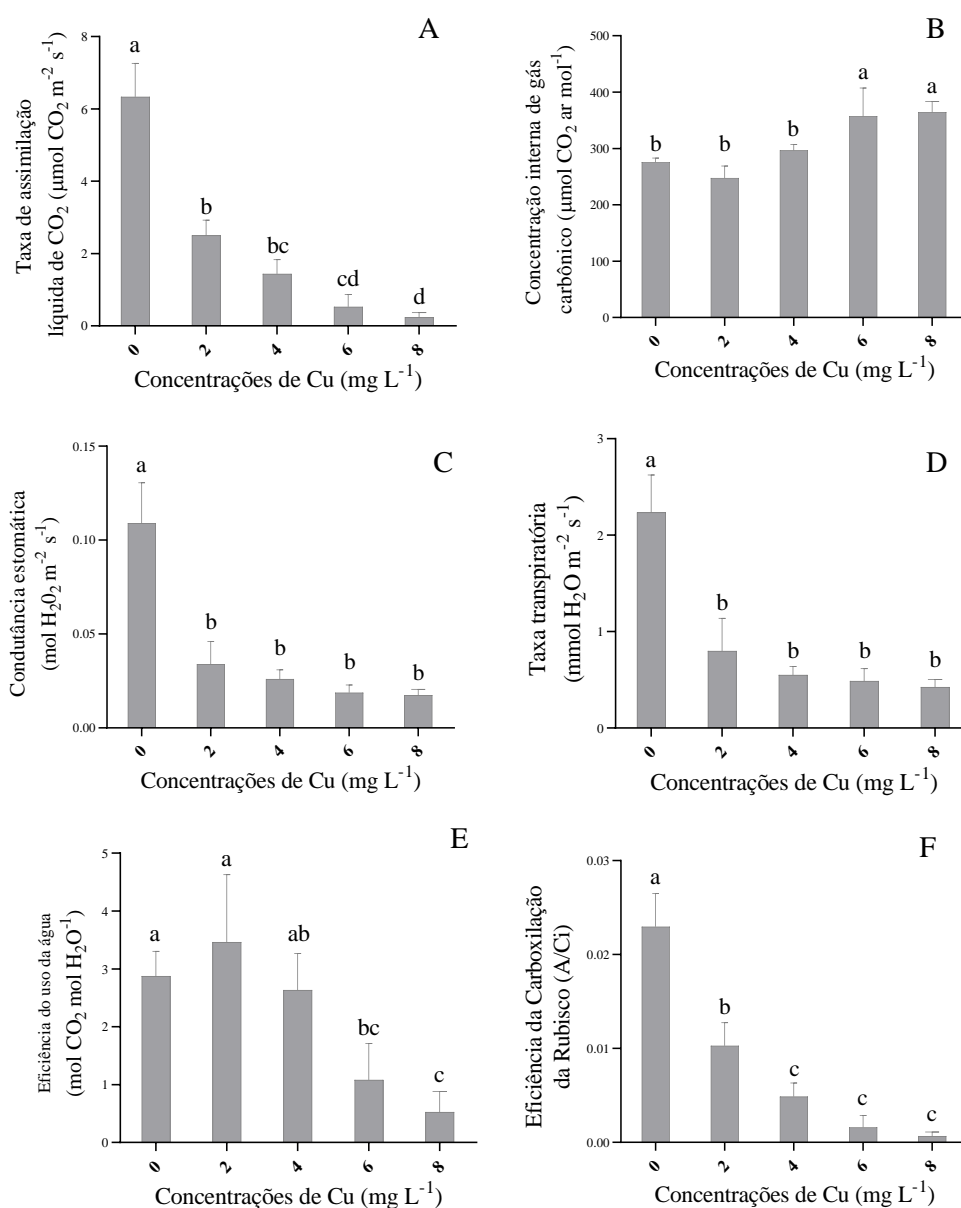
Fonte: A autora (2021).

Houve efeito ( $p \leq 0,05$ ) das diferentes concentrações de Cu para as variáveis fotossintéticas observadas no presente estudo. Observou-se que as concentrações de Cu afetaram de forma negativa a taxa de assimilação líquida (A) (Figura 3A), a condutância estomática (Gs) (Figura 3C), a taxa transpiratória (E) (Figura 3D) e a eficiência de carboxilação da rubisco (A/Ci) (Figura 3F), em comparação ao tratamento controle. Para a concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci), pode-se observar que as maiores médias foram



encontradas nas concentrações de 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 3B). Porém, observou-se que o maior valor para eficiência do uso da água (EUA) foi observado na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>, mas se igualou estatisticamente com o controle (Figura 3E), enquanto as concentrações de 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu promoveram uma redução nesta variável, comparado com o tratamento controle.

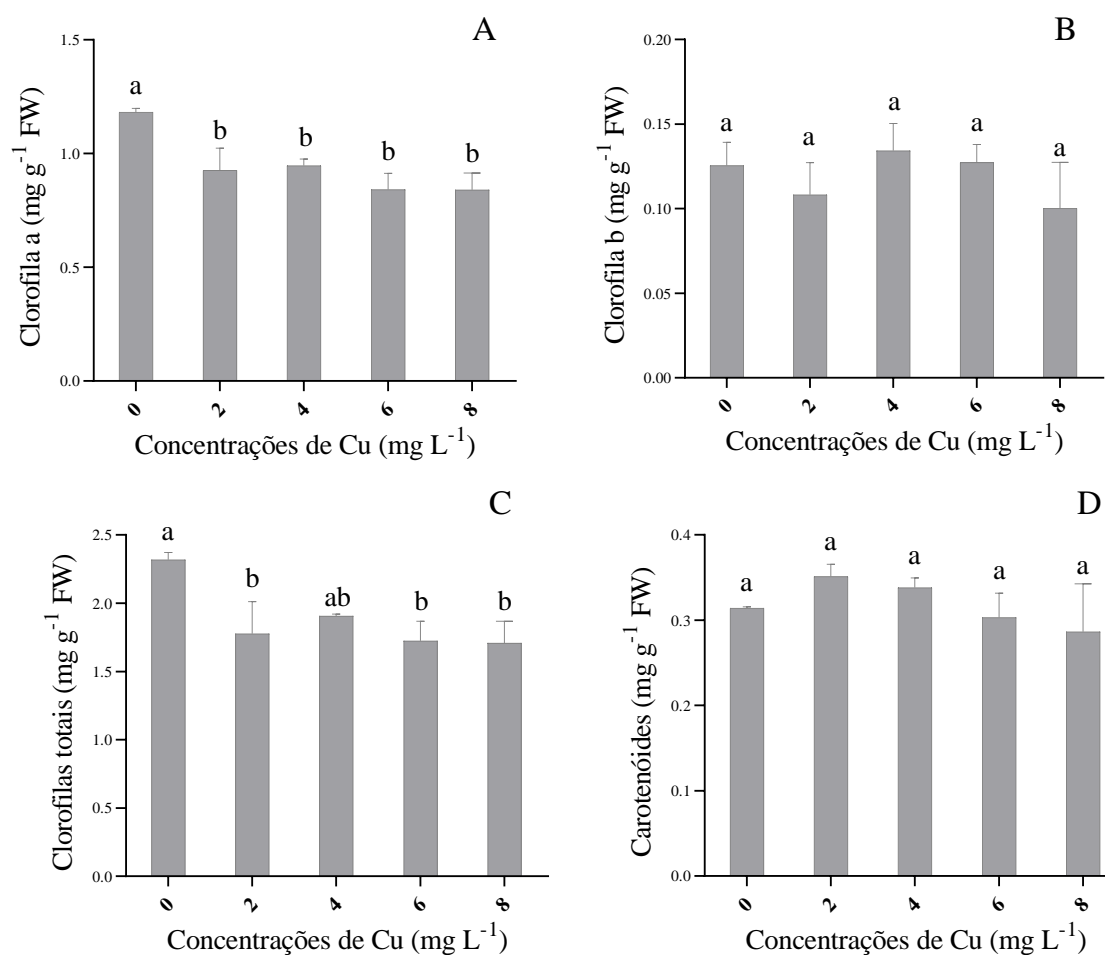
Figura 3- Valores médios da taxa de assimilação líquida (A) (A), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (Ci) (B), condutância estomática (Gs) (C), taxa transpiratória (E) (D), eficiência do uso da água (EUA) (E) e eficiência instantânea de carboxilação (pela Rubisco) (A/Ci) (F) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu



\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média ± desvio padrão. Fonte: A autora (2021).

O efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) das diferentes concentrações de Cu foi observado para a maioria das variáveis bioquímicas do presente estudo. Foi possível observar que as maiores médias para a clorofila *a* (Figura 4A) e clorofila total (Figura 4C) foram proporcionadas pelo tratamento testemunha. Porém, não ocorreu diferença entre o tratamento controle e a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de Cu para a variável clorofila total. Além disso, foi possível observar também que não ocorreu diferença para clorofila *b* e carotenóides, independente das concentrações de Cu testadas (Figuras 4 B e 4D).

Figura 4 - Valores médios de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu

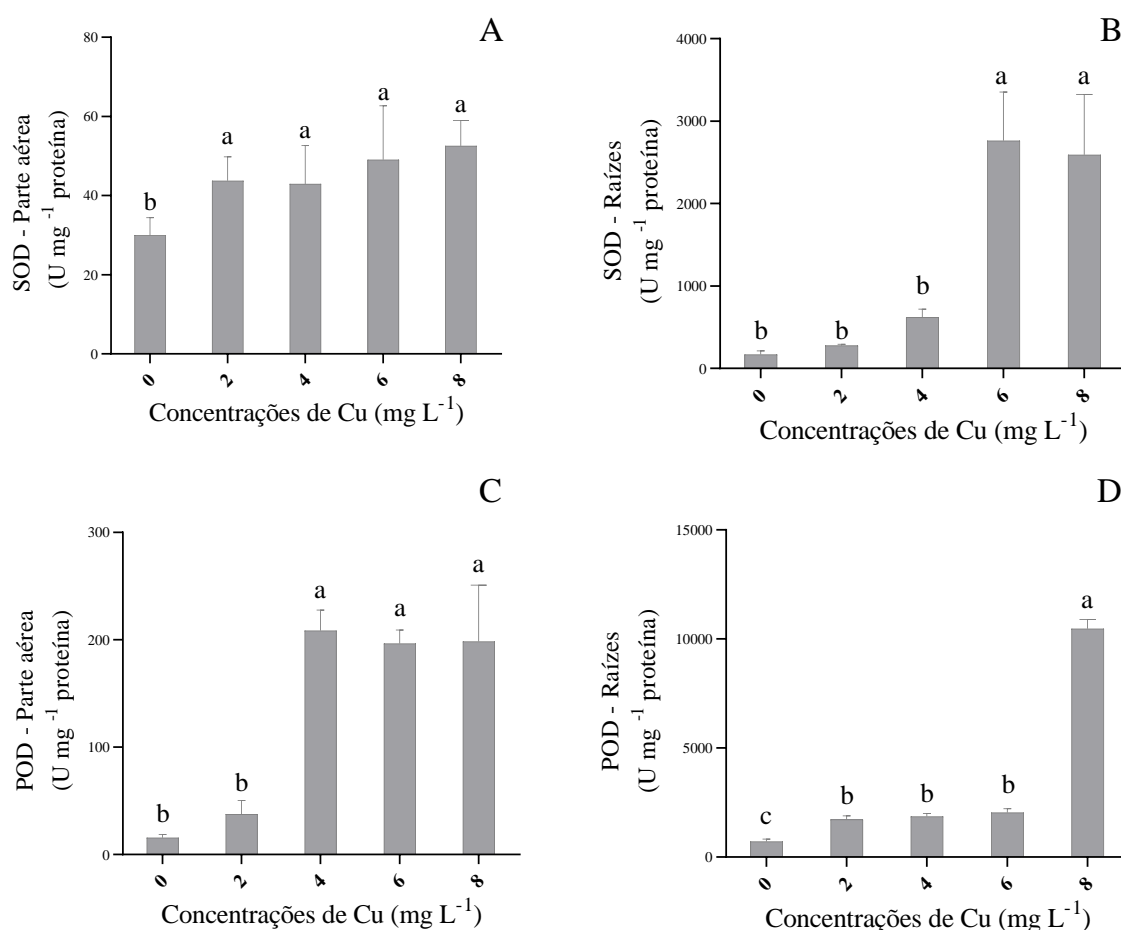


\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

De forma geral, o Cu promoveu um aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) (Figura 5). Para a SOD da parte aérea e POD em raízes, todas as concentrações de Cu promoveram aumento na atividade dessas enzimas (Figura 5A e 5D). Em contrapartida, observou-se que somente as maiores concentrações de Cu (6 e 8 mg L<sup>-1</sup>) estimularam o aumento da atividade da SOD nas raízes (Figura 5B). Além disso, foi observado o aumento da atividade da POD na parte aérea nas concentrações 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu.

Figura 5 - Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A) e raízes (B), e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta a diferentes concentrações de Cu

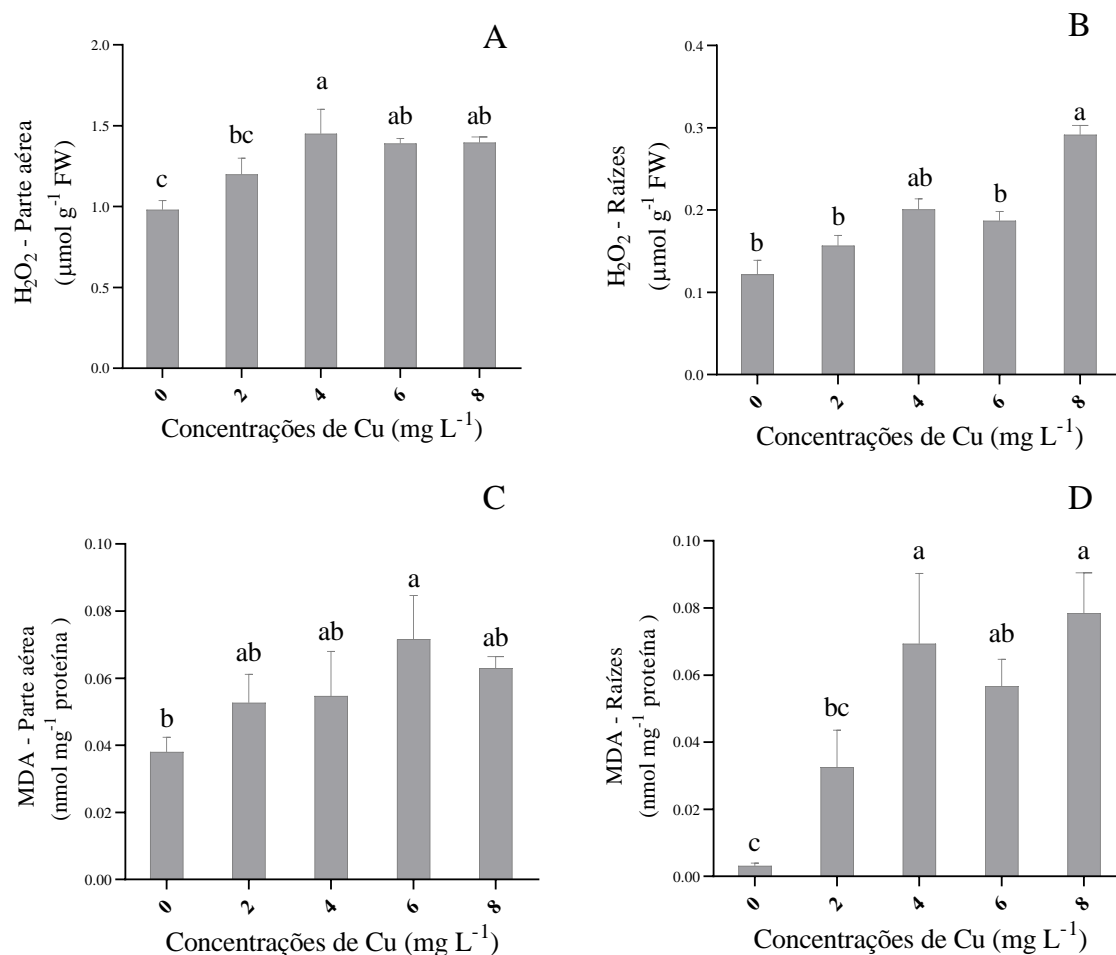


\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Para o conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) da parte aérea observou-se que as maiores médias foram encontradas nas concentrações de 4, 6 e 8  $\text{mg L}^{-1}$  de Cu (Figura 6A), comparado com o tratamento controle. Entretanto, para o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas raízes, foi possível observar que o maior valor foi encontrado na maior concentração de Cu (8  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Figura 6B). Para o conteúdo de MDA na parte aérea, somente a concentração de 6  $\text{mg L}^{-1}$  de Cu promoveu aumento nesta variável (Figura 6C), enquanto nas raízes houve maior peroxidação de lipídeos de membrana nas concentrações de 4, 6 e 8  $\text{mg L}^{-1}$  de Cu (Figura 6D).

Figura 6 - Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em parte aérea (A) e raízes (B), e valores médios da peroxidação de lipídios de membrana na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu

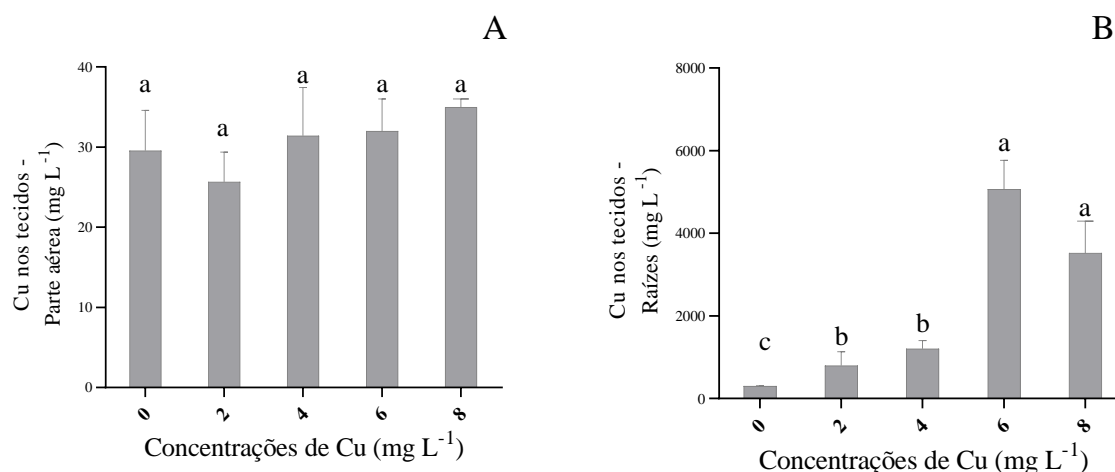


\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Não houve efeito para o conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea independente das concentrações de Cu testadas (Figura 7A). Entretanto, pode-se observar maior teor de Cu nos tecidos das raízes em todas as concentrações, com aumento significativo nas maiores concentrações de Cu (6 e 8 mg L<sup>-1</sup>), (Figura 7B).

Figura 7 - Valores médios do conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea (A) e raízes (B) em mudas de *Cedrela fissilis* em resposta as diferentes concentrações de Cu



\* Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

## 6.4 DISCUSSÃO

O excesso de cobre (Cu) causa impactos negativos para o crescimento das plantas, já que esse pode reduzir o alongamento das raízes e provocar alterações em sua anatomia, resultando em menor produção de matéria seca das raízes. Além disso, os efeitos negativos do Cu também costumam ser evidenciados na parte aérea, resultando em menor taxa fotossintética, e conseqüentemente menor produção de biomassa das folhas (AMBROSIN et al., 2018). Dessa forma, o excesso de Cu nos tecidos vegetais induz ao estresse oxidativo, e diminui o teor de clorofila foliar com conseqüentes efeitos no crescimento e desenvolvimento da planta (MARASTON et al., 2019).

Desse modo, pode-se observar que as diferentes concentrações de Cu promoveram uma redução severa no incremento em raízes das mudas de cedro (Figura 1 B). Essa resposta pode ser atribuída ao aumento do Cu em solução nutritiva e seu

contato direto com as raízes (FLORES-CÁCERES et al., 2015), implicando em maior absorção e acúmulo nesses tecidos (SCHMITT et al., 2020).

A maior retenção de Cu nas raízes pode ser uma estratégia de sobrevivência desenvolvida por algumas plantas, a fim de evitar maior translocação de metais para os órgãos fotossintéticos, mais sensíveis e metabolicamente mais ativos das plantas, como as folhas. Assim, as plantas armazenam a maior parte do excesso de metal em órgãos menos sensíveis, como as raízes (TIECHER et al., 2017).

A aplicação das diferentes concentrações de Cu resultou em efeitos mais severos para o comprimento de raízes (Figura 2A), área superficial de raízes (Figura 2B) e volume de raízes (Figura 2C). Isso pode ter ocorrido porque o excesso de Cu interfere principalmente na região de divisão celular, promovendo alterações em todo o restante do eixo radicular. Com isso, o Cu interage com ligantes duros, compostos de baixa polaridade e alta eletronegatividade na região de divisão celular (KOPITTKÉ et al., 2014), promovendo alterações nas células constituintes da coifa, bem como nas células que formam o restante do eixo da raiz (AMBROSIN et al., 2018).

Ainda que as mudas de cedro possam apresentar mecanismos em seus sistemas radiculares para prevenir ou reduzir a translocação do excedente de Cu absorvido, a parte aérea foi prejudicada, pois houve redução no incremento em parte aérea (Figura 1A) e na produção de massa seca da parte aérea (Figura 1E). Isso pode ter ocorrido devido aos danos severos provocados pelo Cu nas características morfológicas das raízes, interferindo na capacidade de absorção de água e nutrientes (BRUNETTO et al., 2016). Tal comportamento pode levar a desequilíbrios nutricionais e reduzir a atividade fotossintética, contribuindo para menor assimilação de carbono e, conseqüentemente, reduzindo a produção de matéria seca (HAMMERSCHMITT et al., 2020). Desse modo, também ocorreu menor área foliar por unidade de massa seca foliar, já que as concentrações de Cu podem ter inibido o metabolismo energético, a divisão e a expansão celular, refletindo na redução da área foliar das mudas (Figura 1D).

As plantas ajustam sua alocação e distribuição de biomassa relativa em seus órgãos quando estão sujeitas às condições de estresse, referido como plasticidade de alocação. Como os efeitos de estresse provocados por metais pesados afetam o crescimento, conseqüentemente, alteram também os processos básicos como fotossíntese e respiração (DHIR et al., 2011). Assim, alterações no crescimento de plantas sob contaminação por metais pesados podem ser atribuídas a danos na taxa fotossintética líquida (A) (Figura 4A) (AHMAD et al., 2011).

A capacidade fotossintética nas plantas é regulada principalmente por meio de reações fotoquímicas que facilitam a produção de energia, as trocas gasosas e a fixação e assimilação de CO<sub>2</sub> (YANG et al., 2015). Entretanto, o excesso de Cu pode causar distúrbios nos processos fotossintéticos (ZHANG et al., 2014) por impedir o fluxo de elétrons na fase fotoquímica da fotossíntese, alterar a composição das membranas do tilacoide e de pigmentos fotossintéticos, e inibindo a síntese ou atividade das enzimas do ciclo de Calvin (SCHWALBERT et al., 2019).

Dessa forma, observou-se redução na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) (Figura 4A). A diminuição da fotossíntese líquida pode ser atribuída aos diferentes efeitos do Cu na integridade ou função do aparato fotoquímico, bem como seu impacto no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (CAMBROLLÉ et al., 2015).

A toxicidade causada por metais pesados pode promover o fechamento estomático e redução da condutância estomática. Com isso, a toxicidade causada pelo Cu pode ter induzido o fechamento estomático, resultando em menores valores para condutância estomática (Figura 3C). Esse resultado de condutância estomática tem relação com a concentração interna de CO<sub>2</sub> e a taxa fotossintética, uma vez que o aumento na concentração interna de CO<sub>2</sub> pode induzir o fechamento estomático e como consequência ocorrer menor taxa fotossintética. Além disso, uma vez que o Cu afeta negativamente o aparato fotossintético, promovendo redução nas taxas fotossintéticas, a concentração interna de CO<sub>2</sub> tende a aumentar, como foi observado neste estudo (Figura 3B). Tal processo leva à redução da transpiração (Figura 3D), e diminuição da perda de água para a atmosfera em plantas submetidas à aplicação de altas doses de metais, devido à diminuição da condutância estomática (PAULA et al., 2015).

A determinação de pigmentos envolvidos na fotossíntese também permite observar o desempenho fotossintético das plantas, visto que os pigmentos são responsáveis pela captação da energia da luz necessária para a fotossíntese (TAIZ et al., 2017). Observou-se uma redução do conteúdo de clorofila *a* (Figura 4A) e clorofila total (Figura 4C) para as diferentes concentrações de Cu testadas. O efeito tóxico do Cu na concentração de pigmentos fotossintéticos pode ser atribuído à mudanças na composição dos tilacoides e mudanças na formação de complexos de metal-pigmento (BAZIHIZINA et al., 2015). A substituição do íon Magnésio (Mg) central por Cu na molécula de clorofila também pode ocorrer, prejudicando a síntese de clorofila (TIECHER et al., 2017).

Contudo, não ocorreu diferença para a concentração de clorofila *b* independente das concentrações de Cu testadas (Figura 4B). Esse fato pode ter ocorrido porque as folhas das mudas de Cedro já tinham atingido o estágio de maturação. Com isso, pode ter contribuído com o aumento do conteúdo de clorofila *b*, visto que as folhas nesse estágio de maturação apresentam essa estratégia adaptativa para expandir a faixa de comprimento de onda da luz absorvida pelos cloroplastos de sombra, que compõem e capturam a radiação no fotossistema II (SCHMITT et al., 2020).

A capacidade de fotossíntese em plantas sob excesso de Cu pode resultar em maior acúmulo de energia de fótons sob alta irradiância. O excesso de fótons causa aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como subprodutos da fotossíntese, incluindo ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (SCHWALBERT et al., 2019). Quando ocorre o aumento da formação de ERO, uma das possíveis estratégias utilizadas pelas plantas é a ativação do sistema de enzimas antioxidantes (TIECHER et al., 2016), como por exemplo a superóxido dismutase (SOD) e a guaiacol peroxidase (POD).

A SOD e a POD são consideradas as principais enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de ERO, e atuam na manutenção da homeostase nas células vegetais (ZHANG et al., 2019). Assim, as enzimas antioxidantes dismutam as ERO que são produzidas pelo excesso de luz, caso os carotenoides não consigam dissipar.

A SOD é um componente essencial do sistema de defesa antioxidante ao estresse em plantas, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (GIROTTO et al., 2016). Já a POD atua na conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio por dissociação de  $H_2O_2$ , desempenhando papel essencial no fornecimento de tolerância às condições desfavoráveis nas plantas (LI et al., 2014).

De uma forma geral, o Cu promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD (Figura 5). O aumento na atividade das enzimas antioxidantes, neste estudo, indica que o Cu causou estresse oxidativo, ocasionando a produção excessiva de ERO, o que pode ter promovido o aumento na atividade dessas enzimas. Este aumento da atividade da SOD pode ter ocorrido devido ao aumento na concentração do radical superóxido nas raízes, levando à síntese de novas unidades de enzima (GIROTTO et al., 2016). Além disso, a atividade da SOD teve correlação positiva com a concentração de Cu, porque a SOD, e outras enzimas antioxidantes, frequentemente apresentam atividade aumentada em altas concentrações de Cu (ZHANG et al., 2010).



O aumento da atividade da POD nas plantas indica a ativação de uma resposta enzimática para prevenir o dano oxidativo causado pela toxicidade de Cu (MIOTTO et al., 2014). Contudo, o aumento da atividade da POD na parte aérea e nas raízes não foi suficiente para evitar maior produção de  $H_2O_2$  nas mudas de cedro, já que o conteúdo de  $H_2O_2$ , tanto da parte aérea como nas raízes aumentou com a aplicação de Cu em solução nutritiva (Figuras 6A e 6B) (HUANG et al., 2017). Assim, as enzimas antioxidantes não conseguiram proteger suficientemente as plantas, ocorrendo o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  e possivelmente outras ERO, o que potencializou os danos oxidativos (TIECHER et al., 2016).

O  $H_2O_2$ , em baixas concentrações, é importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois regula processos fisiológicos como abertura estomática, fotossíntese, fortalecimento da parede celular e proteção ao estresse abiótico. Por outro lado, a alta concentração de  $H_2O_2$  nos tecidos pode ter efeitos prejudiciais (NIU; LIAO, 2016).

Os aumentos observados em  $H_2O_2$  sob estresse de Cu provavelmente são responsáveis pela peroxidação lipídica, que é indicada pelo acúmulo excessivo de malondialdeído (MDA). Assim, observou-se aumento dos níveis de MDA nas raízes e na parte aérea (Figura 6D e 6C). Esse aumento no conteúdo de MDA pode ser um efeito direto da toxicidade de Cu, indicando estresse oxidativo nas mudas de cedro, e como resultado pode causar dano irreversível ao desenvolvimento e função do tecido vegetal a longo prazo.

Portanto, altas concentrações desses elementos nos tecidos vegetais induzem mudanças nas propriedades da membrana, que afetam a função dos transportadores de membrana e dos canais iônicos. Esses efeitos causam aumento da permeabilidade da membrana, o que pode ser responsável pelo desequilíbrio na concentração de nutrientes, em plantas cultivadas em ambientes com altos níveis de metais pesados (CAMBROLLÉ et al., 2013).

Além disso, a geração de ERO pode ter sido responsável pela diminuição da biomassa seca nas plantas, devido à correlação negativa entre a concentração de  $H_2O_2$  (Figuras 6C e 6D) e a produção de massa seca nas diferentes concentrações de Cu (Figuras 1E e 1F). Este processo é baseado no princípio de que os organismos podem mobilizar suas reservas de energia para suportar condições de estresse, como o processo de desintoxicação influenciando os custos com funções biológicas como o crescimento (SCHWALBERT et al., 2019). Portanto, é possível inferir que a espécie *Cedrela fissilis*

teve suas variáveis fotossintéticas afetadas negativamente, assim como a morfologia do sistema radicular, incremento em crescimento, biomassa e teor de pigmentos reduzidos, bem como o aumento da peroxidação lipídica e estresse oxidativo mesmo em baixas concentrações de Cu.

## 6.5 CONCLUSÃO

A presença de Cu na solução nutritiva afetou negativamente as variáveis bioquímicas e fisiológicas das mudas de *Cedrela fissilis*, e com isso, a espécie é considerada sensível. Devido a essas características, as mudas de *C. fissilis* podem ser indicadas como sinalizadoras de áreas contaminadas com cobre.

## 6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. S. A. et al. Induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 144, n. 1-3, p. 1229–1239, 2011.

AMBROSIN, V. G. et al. High copper content in vineyard soils promotes modifications in photosynthetic parameters and morphological changes in the root system of 'Red Niagara' plantlets. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 89-98, 2018.

ANDREAZZA, R. et al. Potential phytoextraction and phytostabilization of perennial peanut on copper contaminated vineyard soils and copper mining waste. **Biological Trace Element Research**, 143, 3: 1729-1739, 2011.

BAZIHIZINA, N. et al. Photosynthesizing on metal excess: Copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. populations. **Plant Science**, v. 232, p. 67-76, 2015.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p. 276-287, 1971.

BRUNETTO, G. et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.

CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, n. 120, p. 171-178, 2015.

CAMBROLLÉ, J. et al. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, p. 294-301, 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa. 1994. 640 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1. Colombo, PR Outubro, 2008.

DHIR, B. et al. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 6, p.1678–1684, 2011.

DUČIĆ, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 1, p. 103-112, 2005.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus. **Journal Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.43, n.15, p.109- 119, 1993.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. ampl. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2009. 627p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 02, 2014.

FLORES-CÁCERES, M. L. et al. Specific mechanisms of tolerance to copper and cadmium are compromised by a limited concentration of glutathione in alfalfa plants. **Plant Sci.**, v. 233, p.165-170, 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 59, p. 315-318, 1977.

GIROTTI, E. et al. Biochemical changes in black oat (*Avena strigosa* Schreb) cultivated in vineyard soils contaminated with copper. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p.199-207, 2016.

HAMMERSCHMITT, R. K. et al. Copper and zinc distribution and toxicity in ‘Jade’ / ‘Genovesa’ young peach tree. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 01-09, 2020.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p.1132-1334, 1979.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The waterculture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: **Agric. Exp. Stn.**, Univ. Of California.(Circ. 347). 1950.

HUANG, D. et al. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. **Planta**, v. 245, n. 5, p. 863-873, 2017.

INOUE, M.T.; CARLOS, V.R.; KUNIYOSHI, Y.S. Projeto madeira do Paraná. Curitiba: **Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná**, 1984. 260p.

KÄRENLAMPI, S. et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environment Pollution**, v. 107, n. 2, p. 225–231, 2000.

KOPITTKE, P. et al. The rhizotoxicity of metal cations is related to their strength of binding to hard ligands. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 33, p. 268-277, 2014.

LI, Z. et al. Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. **Molecules**, v.19, n. 11, p. 18003–18024, 2014

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER L, DOUCE R (eds). *Methods in Enzimology*, London: **Academic Press**. v. 148, p. 350-381, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. 6. ed. São Paulo: Editora Plantarum, v.1, 2014. p.266.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v.127, n.9, p.1781-1787, 2001

MARASTONI, L. et al. The potential of two different *Avena sativa* L. cultivars to alleviate Cu toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 01-09, 2019a.

MARASTONI, L. et al. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. Intercropping. **Chemosphere**, v. 214, p. 563-578, 2019b.

MELO, G.H.C. et al. Paragênese e evolução do depósito hidrotermal de óxido de ferro-cobre-ouro de Bacuri, Carajás Província (PA). **Brasileira J. Geol.**, v.44, p.73–90. <https://doi.org/10.5327/Z2317-4889201400010007>, 2014.

MIOTTO, A. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant Soil**, v. 374, p. 593-610, 2014.

NIU, L., LIAO, W. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. **Front. Plant Sci.**, v.7, p. 01-14, 2016.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 467-473, 2002.

PAULA, L. S. et al. Silicon (Si) ameliorates the gas exchange and reduces negative impacts on photosynthetic pigments in maize plants under Zinc (Zn) toxicity. **Aust. J. Crop. Sci.**, v. 9, p. 901-908, 2015.

REITZ, R.; KLEIN, L.M.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, 1988. 525p.

SARWAR, N. et al. Estratégias de fitorremediação para solos contaminados com metais pesados: modificações e perspectivas futuras. **Chemosphere**, v.171, p.710–721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>, 2017.

SCHMITT, O. J. et al. Impact of Cu concentrations in nutrient solution on growth and physiological and biochemical parameters of beet and cabbage and human health risk assessment. **Scientia Horticulturae**, n. 272, p.01-09, 2020.

SCHWALBERT, R. et al. Physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars to copper excess. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 91, n. 04, 2019.

STORCK, L. et al. **Experimentação vegetal**. 3. ed. Santa Maria, RS: Editora da UFSM. 2016. 198p.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6.ed. 2017. 858p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C. & BIASSANI, C. A. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, 5).

TIECHER. T. L. et al. Effects of zinc addition to a copper-contaminated vineyard soil on sorption of Zn by soil and plant physiological responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p.109-119, 2016.

TIECHER. T. L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017.

YANG. et al. Comparative Physiological and Proteomic Analysis Reveals the Leaf Response to Cadmium-Induced Stress in Poplar (*Populus yunnanensis*). **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-20, 2015.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, p.731-734, 2008.

ZHANG, H. et al. 2-Cys Prx plays a critical role in scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protecting photosynthetic function in leaves of tobacco seedlings under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 14, n.1, p.119-128, 2019.

ZHANG, H. et al. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase. **J. Hazard Mater**, v. 178, p. 834-843, 2010.

ZHANG, L. et al. Physiological responses of biomass allocation, root architecture, and invertase activity to copper stress in young seedlings from two populations of *Kummerowia stipulacea* (maxim.) Makino. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 104, p. 278-284, 2014.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v.167, p.527-533, 2004.

## 7 MANUSCRITO II -*Handroanthus heptaphyllus* É UMA ESPÉCIE TOLERANTE AO COBRE EM SISTEMA HIDROPÔNICO

### RESUMO

AUTOR: Caroline Castro Kuinchtner  
ORIENTADOR: Luciane Almeri Tabaldi

Solos contaminados por cobre (Cu) são um problema crescente, principalmente em áreas de vinícolas, e, na possibilidade de reduzir os efeitos prejudiciais desse elemento nos solos, a utilização da fitorremediação vêm trazendo resultados positivos. Níveis tóxicos de Cu causam efeitos negativos nas plantas e ao homem. Com isso, o uso de espécies arbóreas tem sido bastante empregado para tal técnica, servindo como barreiras a esta contaminação. Desse modo, é preciso avaliar os limites de tolerância/toxidez, e os danos que este metal pode causar às plantas. Assim, este estudo teve como objetivo verificar os atributos morfofisiológicos e bioquímicos de plantas de *Handroanthus heptaphyllus* (ipê-roxo) expostas ao Cu, cultivadas em sistema hidropônico em casa de vegetação. Após emergência e crescimento inicial das mudas (com cerca de 10 cm de altura), as mesmas foram retiradas do substrato e transferidas para o sistema hidropônico. Após uma semana de aclimação, estas mudas foram submetidas a diferentes concentrações de Cu: 0 (solução nutritiva completa), 2, 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>, com quatro repetições por tratamento e 16 plantas por repetição. Posteriormente 21 dias de exposição aos tratamentos, realizou-se as análises dos atributos morfofisiológicos, como incremento em número de folhas, altura e comprimento de raízes, biomassa seca, variáveis morfológicas do sistema radicular, área foliar e variáveis fotossintéticas. Além disso, avaliou-se também as variáveis bioquímicas, como pigmentos fotossintéticos, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio e análise de Cu nos tecidos. Para as variáveis incremento em parte aérea, massa seca da parte aérea, massa seca de raízes e pigmentos fotossintéticos, não houve diferença independente das concentrações de Cu testadas. Além disso, a taxa de assimilação líquida (A) e taxa transpiratória foram afetadas negativamente somente na maior concentração de Cu (8 mg L<sup>-1</sup>) e o Cu promoveu aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes principalmente no sistema radicular. Por outro lado, observou-se que a aplicação de Cu gerou aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na peroxidação lipídica nas raízes. Assim, a espécie *Handroanthus heptaphyllus* em geral foi afetada pelo excesso de Cu apenas na concentração de 8 mg L<sup>-1</sup>, e esse foi acumulado principalmente nas raízes, sem registrar diminuição na biomassa radicular e da parte aérea, o que pode indicar uma tolerância da espécie a este metal, com grande potencial para utilização na fitorremediação de solos contaminados por Cu.

**Palavras-chave:** *Handroanthus heptaphyllus*. Metal. Toxidez. Espécie nativa.

## ABSTRACT

### *Handroanthus heptaphyllus* IS A COPPER TOLERANT SPECIES IN HYDROPONIC SYSTEM

AUTHOR: Caroline Castro Kuinchtner

ADVISOR: Luciane Almeri Tabaldi

Soils contaminated by copper (Cu) are a growing problem, especially in winery areas, and, considering the possibility of reducing the harmful effects of this element on soils, the use of phytoremediation has brought positive results. Toxic levels of Cu cause negative effects on plants and humans. Thus, the use of tree species has been widely used for this technique, serving as barriers to this contamination. Thus, it is necessary to assess the tolerance/toxicity limits, and the damage that this metal can cause to plants. Thus, this study aimed to verify the morphophysiological and biochemical attributes of *Handroanthus heptaphyllus* (purple ipe) seedlings exposed to Cu, grown in a hydroponic system in a greenhouse. After emergence and initial growth of seedlings (about 10 cm high), they were removed from the substrate and transferred to the hydroponic system. After a week of acclimatization, these seedlings were subjected to different concentrations of Cu: 0 (complete nutrient solution), 2, 4, 6 and 8 mg L<sup>-1</sup>, with four replicates per treatment and 16 plants per repetition. After 21 days of exposure to the treatments, the analysis of morphophysiological attributes was performed, such as increase in number of leaves, height and length of roots, dry biomass, morphological variables of the root system, leaf area and photosynthetic variables. Furthermore, biochemical variables such as photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and tissue Cu analysis were also evaluated. For the variables increase in shoot, shoot dry mass, root dry mass and photosynthetic pigments, there was no difference regardless of the tested Cu concentrations. In addition, the net assimilation rate (A) and transpiration rate were negatively affected only in the highest Cu concentration (8 mg L<sup>-1</sup>) and Cu promoted a significant increase in the activity of antioxidant enzymes mainly in the root system. On the other hand, it was observed that the application of Cu generated an increase in the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation in the roots. Thus, the species *Handroanthus heptaphyllus* in general was affected by excess Cu only at a concentration of 8 mg L<sup>-1</sup>, and this was accumulated mainly in the roots, without recording a decrease in root and shoot biomass, which may indicate a tolerance of the species to this metal, with great potential for use in phytoremediation of soils contaminated by Cu.

**Keywords:** *Handroanthus heptaphyllus*. Metal.Toxicity. Native species.



## 7.1 INTRODUÇÃO

A utilização intensiva de fungicidas na agricultura é uma das principais fontes para o aumento significativo de teores de cobre (Cu) nos solos (PIETRZAK; MCPHAIL, 2004; MIRLEAN et al., 2007). A contaminação por metais tem sido um problema recorrente nos últimos anos e com isso, há necessidade de se criar estratégias de minimização dos impactos ao meio ambiente ou recuperar estes locais provenientes da contaminação.

Na atmosfera, os metais podem ser liberados de várias formas, seja por meio de poeira e gases procedentes de automóveis das ruas e na produção de materiais e energia. Esses metais quando estão na atmosfera podem ser precipitados e como consequência serem depositados no solo. Contudo, os solos contaminados por metais, na sua maioria, têm origem de produtos agrícolas, como fertilizantes, herbicidas e pesticidas, além de ações antrópicas como rejeitos de mineração, chorume produzido pela decomposição do lixo e resíduos industriais (AKSU, 2015; NADERIZADEH et al., 2016; SUVARAPU; BAEK et al., 2017). Dentre esses metais está o Cu, o qual é um micronutriente que atua como componente de várias enzimas e coenzimas, participa da respiração, da fotossíntese, do metabolismo de carboidratos e nitrogênio. Porém, em altas concentrações no solo, este micronutriente afeta de forma negativa o crescimento e produtividade de plantas (SONMEZ et al., 2006).

*Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, conhecida popularmente como ipê-roxo, pertence à família Bignoniaceae. Sua distribuição é extensa, ocupando quase todo o território brasileiro, sendo encontrada na Floresta Amazônica, Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado. Sua disseminação vai desde o México até o norte Argentino. Seus frutos são em formato de cápsulas, de comprimento de 25 a 30 cm, com várias sementes aladas (GROSE; OLMSTEAD, 2007; LORENZI, 2008).

As sementes desta espécie podem ser classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes, com relação à sensibilidade à dessecação e ao armazenamento (ROBERTS, 1973), apresentando cor acastanhada e são produzidas em grande número, sendo assim propagadas a longas distâncias (LONGUI, 1995). A espécie pode atingir até 35 metros de altura e seu diâmetro alcançando cerca de 150 centímetros (CARVALHO, 1994). Segundo Lorenzi (2002), esta espécie apresenta florescimento amplo e flores vistosas, com queda de folhas, propiciando um efeito paisagístico bonito, além de ser bastante usada para recompor matas ciliares em locais com inundações. Sua

floração apresenta grande beleza ornamental, e com isso pode ser utilizada na arborização urbana.

A espécie é bastante utilizada para recuperar áreas degradadas, devido apresentar importantes características fisiológicas de adaptação em diferentes condições ambientais e ecossistemas, propriedades vindas do gênero a qual pertence (SAMPAIO; POLO; BARBOSA, 2012).

Levando em consideração as informações sobre a espécie e a problemática da contaminação por Cu, o objetivo deste estudo foi avaliar as análises morfofisiológicas, bioquímicas e concentração de Cu nos tecidos de plantas de Ipê-roxo (*H. heptaphyllus*) expostas ao Cu e contribuir com informações importantes na busca por estratégias de descontaminação de solos.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - *Campus* Santa Maria - RS, com controle de temperatura a aproximadamente 25°C, e umidade do ar de 60% em média. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Nutrição de Plantas do Departamento de Biologia.

### 7.2.2 Condução do experimento

As mudas de *Handroanthus heptaphyllus* foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado. Estas mudas foram submetidas a diferentes concentrações de Cu: 0 (solução nutritiva completa), 2, 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup>, com quatro repetições por tratamento e 16 plantas por repetição. A concentração 0 de Cu equivale a concentração padrão de Cu na solução nutritiva (concentração adequada de Cu). Nos demais tratamentos, foram acrescentadas as diferentes concentrações na solução nutritiva completa.

Para a produção das mudas de Ipê-roxo utilizou-se sementes do subprograma Bolsa de Sementes do Viveiro Florestal da UFSM – *Campus* Santa Maria, as quais

foram semeadas em substrato comercial Carolina Soil® composto por turfa de *Sphagnum* e vermiculita. Foram utilizadas bandejas plásticas (38 cm x 56 cm) como recipientes de cultivo para germinação e crescimento inicial das mudas de Ipê-roxo. Durante o período experimental, a umidade do substrato foi mantida próxima de 60% da capacidade de campo procedendo-se o monitoramento diário para esse controle.

A partir do 15º dia após a semeadura (DAS), as mudas receberam fertirrigação semanal, com solução nutritiva completa, com pH em  $5,7 \pm 0,1$ . A solução nutritiva foi formada por (em  $\mu\text{M}$ ) sendo: 6090,5 de Nitrogênio; 974,3 de Magnésio; 4986,76 de Cloro; 2679,2 de Potássio; 2436,2 de Cálcio; 359,9 de Enxofre; 243,592 de Fósforo; 0,47 de Cobre; 2,00 de Manganês; 1,99 de Zinco; 0,17 de Níquel; 24,97 de Boro; 0,52 de Molibdênio e 47,99 de Ferro ( $\text{FeSO}_4/\text{Na-EDTA}$ ) (HOAGLAND; ARNON, 1950).

Após aproximadamente 3 meses da semeadura nas bandejas, e quando as mudas estavam com altura homogênea aproximadamente de 10 cm, as mesmas foram retiradas cuidadosamente do substrato e transferidas para o sistema hidropônico. Em seguida, cada muda foi acondicionada em uma bandeja com capacidade de 16 L, contendo solução nutritiva completa de Hoagland; Arnon (1950). Na superfície de cada vaso foi adicionada uma lâmina de isopor, com quatro orifícios centrais, para permitir a passagem das plantas. A lâmina de isopor permitiu a fixação das plantas, e a diminuição da evaporação da solução contida em cada vaso.

As mudas foram aclimatadas durante sete dias em solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950), com 100% da sua concentração original. A aeração da solução em cada vaso foi feita por microtubos de PVC conectados a um compressor de ar. Os microtubos foram inseridos na solução por meio da lâmina de isopor presente em cada vaso. A solução nutritiva, na forma original, contém as seguintes concentrações em  $\text{mg L}^{-1}$ :  $\text{NO}_3^- = 196$ ;  $\text{NH}_4 = 14$ ;  $\text{P} = 31$ ;  $\text{K} = 234$ ;  $\text{Ca} = 160$ ;  $\text{Mg} = 48,6$ ;  $\text{S} = 70$ ;  $\text{Fe-EDTA} = 5$ ;  $\text{Cu} = 0,02$ ;  $\text{Zn} = 0,15$ ;  $\text{Mn} = 0,5$ ;  $\text{B} = 0,5$ ;  $\text{Mo} = 0,01$ .

Após a aclimação, procedeu-se a aplicação dos tratamentos, onde as mudas permaneceram por 14 dias nas diferentes condições de disponibilidade de Cu, as plantas foram coletadas a partir do momento onde sintomas de toxicidade de Cu foram observados, totalizando 21 dias em sistema hidropônico. principalmente nas maiores concentrações de Cu. A solução nutritiva em cada vaso foi substituída duas vezes por semana, e seu pH foi ajustado diariamente para  $5,7 \pm 0,1$ , com  $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$  ou  $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 7.2.3 Variáveis fotossintéticas

As avaliações das variáveis fotossintéticas foram realizadas na terceira folha completamente expandida, com a utilização de um analisador de gás por radiação infravermelho [infra red gás analyser (IRGA), Mod. Li-COR® 6400 XT] utilizando uma radiação fotossintética de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . As medições foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 10:00 horas, antes da coleta das plantas para as análises de crescimento. Nessa ocasião, foram determinadas as seguintes variáveis: taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  (A), taxa transpiratória (E), condutância estomática (Gs), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  (Ci), eficiência de carboxilação instantânea da Rubisco (A/Ci - obtida pela razão entre a taxa fotossintética e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$ ), e eficiência de uso da água (EUA – obtida pela razão entre a taxa fotossintética e a taxa transpiratória).

### 7.2.4 Determinação das variáveis de crescimento

Para as avaliações de crescimento coletou-se quatro plantas em cada unidade experimental. Após a coleta, as plantas foram seccionadas em parte aérea e radicular. Em seguida, as amostras já separadas foram encaminhadas para a determinação das variáveis de crescimento.

A mensuração da altura da parte aérea e comprimento das raízes das mudas foi realizada com o auxílio de uma régua milimétrica. As medidas foram executadas antes e depois da aplicação dos tratamentos, sendo considerado como incremento no crescimento nesse período.

Para a determinação da massa seca da parte aérea (MSPA;  $\text{g planta}^{-1}$ ), massa seca da raiz (MSR;  $\text{g planta}^{-1}$ ) e massa seca total (MST = MSPA + MSR;  $\text{g planta}^{-1}$ ), as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea e sistema radicular, lavadas em água corrente e secas em estufa com circulação forçada de ar a aproximadamente  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , até massa constante para posterior determinação das variáveis supracitadas.

A caracterização morfológica das raízes foi obtida a partir de imagens digitalizadas, utilizando o software WinRhizo Pro 2013 acoplado ao scanner EPSON Expression 11000 equipado com luz adicional (TPU), com uma resolução de 600 DPI. Mensurou-se o comprimento de raízes ( $\text{cm planta}^{-1}$ ), diâmetro médio radicular (mm) e número de ramificações.

### 7.2.5 Determinação das variáveis bioquímicas

Para as variáveis bioquímicas, foram coletadas 12 plantas de cada tratamento, totalizando 240 plantas. Em seguida, tais plantas foram seccionadas em parte aérea e raízes, lavadas com água destilada, colocadas em envelopes de papel alumínio, e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido para evitar a degradação da amostra. As mesmas foram mantidas em ultrafreezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o pré-preparo das amostras para as análises. O preparo das amostras foi realizado por meio do processo de maceração manual com nitrogênio líquido, sendo que cada amostra foi macerada até obter a forma de um pó fino. Posteriormente, foi pesada em balança digital de precisão a quantidade específica para cada análise realizada, sendo: 0,05 g de amostra fresca para a determinação de pigmentos das folhas, 0,5 g para enzimas antioxidantes, 0,3 g para peróxido de hidrogênio e 0,5 g para peroxidação lipídica.

### 7.2.6 Conteúdo de pigmentos (clorofilas totais e carotenoides)

Para a extração das clorofilas totais e carotenoides utilizou-se o método de Hiscox; Israelstan (1979), e para estimá-las foi usada a equação de Lichtenthaler (1987). As amostras previamente pesadas em tubos falcon de 15 mL foram dispostas em grades, e 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado. Os tubos foram incubados a  $65^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente uma hora e meia, até que os pigmentos se soltassem por completo, resultando em uma solução de tonalidade verde escura. Posteriormente, essa solução foi separada em duas repetições de 2 mL cada. As absorvâncias da solução foram medidas em espectrofotômetro UV-visível (1105, Bel Photonics), nos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm, respectivamente para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

### 7.2.7 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes foram determinadas por meio da adição de 0,5 g de amostra em 3 mL de tampão de extração de homogeneização (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a  $13.000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga (High-

SpeedRefrigeratedCentrifuge – CR22 N), e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas e concentração de proteínas (ZHU et al., 2004).

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) na cubeta de quartzo. Após homogeneização, foi adicionado 50 µL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida por meio da oxidação do guaiacol a tetraguaiacol com o do aumento na absorbância a 470 nm, em intervalos de leitura de 15 segundos. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína (U mg<sup>-1</sup> proteína). Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis; Ries (1977). A mistura de reação (MIX) que foi mantida no escuro, continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, EDTA 0,1 Mm, nitrobluetetrazólio (NBT) 75 µM e riboflavina 2 µM. A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm.

A reação foi realizada em tubos de ensaio (13 x 100 mm) a 25°C, contendo em cada tubo 2,8 mL de mistura de reação (MIX), e 200 µL de extrato enzimático das respectivas amostras. Após a pipetagem os tubos foram colocados em uma câmara de reação, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Desse modo, a reação teve início ligando-se a luz e após dois minutos de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz, e em seguida as amostras foram lidas no espectrofotômetro UV-visível (1105, BelPhotonics).

Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). No ensaio, a riboflavina fotoquimicamente excitada é reduzida pela metionina em semiquinona, que doa um elétron ao oxigênio, formando o radical superóxido que, por sua vez, converte NBT em formazana azul. A superóxido dismutase catalisa esta reação.

### 7.2.8 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado de acordo com Loreto; Velikova (2001). Amostras (0,3 g) de raízes e folhas foram homogeneizadas em 3,0 mL

de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas. Adicionou-se 0,5 mL do sobrenadante em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (10 mM) e 1 mL de KI (1M), e foi realizada a absorvância das amostras em espectrofotômetro a 390 nm. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do sobrenadante foi avaliada comparando suas leituras com uma curva padrão de calibração. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi expressa como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso fresco.

#### 7.2.9 Peroxidação de lipídeos de membrana

A peroxidação lipídica foi determinada pela concentração de malondialdeído (MDA), seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993). Amostras de folhas e raízes (0,5 g) foram homogeneizadas em 4,0 mL de tampão citrato de sódio (pH 6,5) e centrifugadas. Um mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (w/v) contendo 0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida a 95°C por 40 min e então resfriada em banho de gelo por 15 min, sendo centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 e 600 nm (para corrigir a turbidez não específica). A peroxidação lipídica foi expressa como nmol de MDA  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 7.2.10 Análise de tecidos

Para a determinação do teor de cobre (Cu) nos tecidos das plantas de *Handroanthus heptaphyllus* foi utilizado a metodologia da EMPRAPA (2009) de digestão nitro-perclórica (via úmida ácida). A solubilização das amostras é feita com uma solução nitro-perclórica (ácido nítrico -65% e perclórico -70%). A partir da digestão nitro-perclórica pode-se determinar o teor de Cu nos tecidos. Os cálculos de teor de Cu nos tecidos foram determinados conforme Tedesco et al. (1995) e expressos como  $\text{mg kg}^{-1}$ .

#### 7.2.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett (STORCK et al., 2016). Após atendimento dos pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância e a médias comparadas pelo teste de Tukey em 5% de

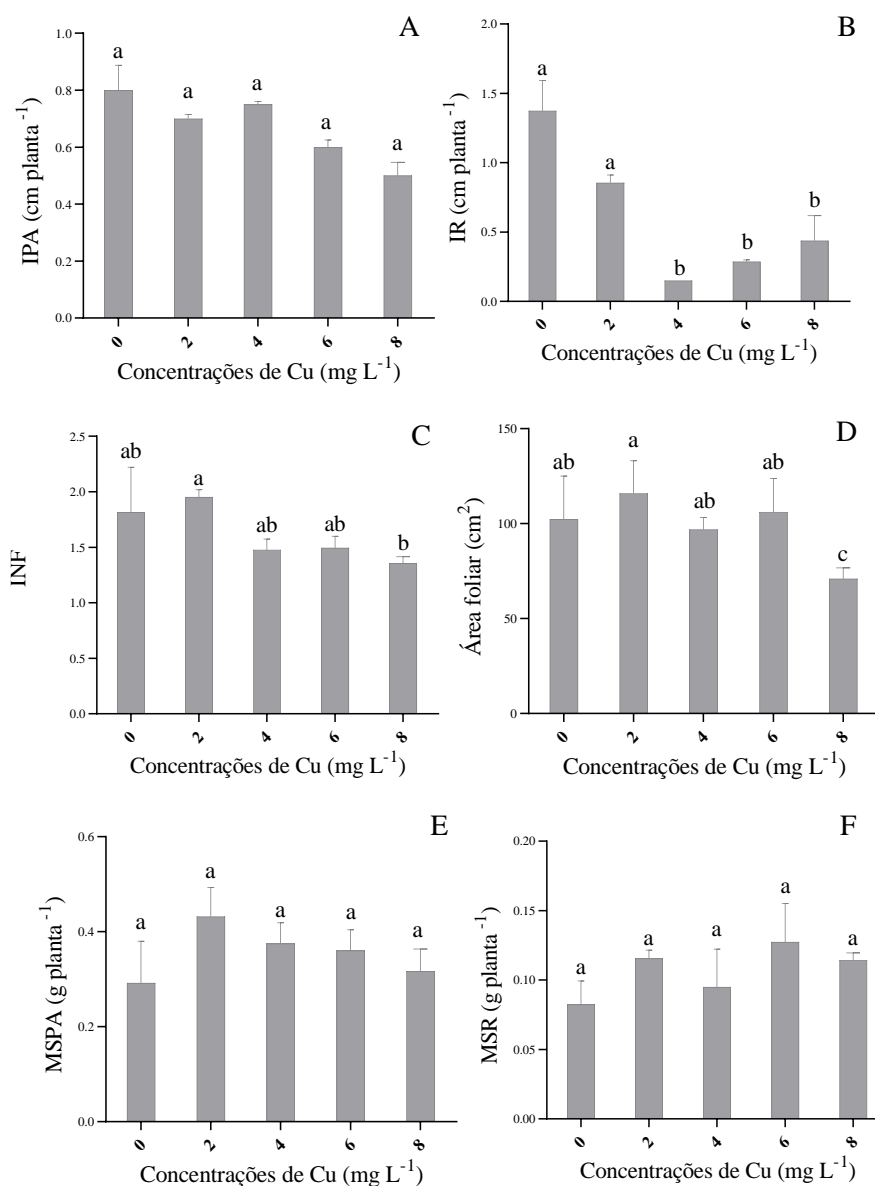
probabilidade de erro, utilizando-se o software estatístico SISVAR v 5.6 (FERREIRA, 2014).

### 7.3 RESULTADOS

Houve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para o fator avaliado (diferentes concentrações de Cu) para as variáveis morfológicas de crescimento. Para as variáveis incremento em parte aérea (IPA) (Figura 8A), massa seca da parte aérea (MSPA) (Figura 8E) e massa seca de raízes (MSR) (Figura 8F) não houve diferença independente das concentrações de Cu testadas. Para as variáveis incremento em número de folhas (INF) (Figura 8C) e área foliar (Figura 8D) o Cu promoveu uma redução significativa nessas variáveis somente com 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu. Para o incremento em raízes (IR) (Figura 8B) pode-se observar que o Cu promoveu uma redução nesta variável nas concentrações de 4, 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu.



Figura 8 - Valores médios de incremento em parte aérea (IPA) (A), incremento em raiz (IR) (B), incremento em número de folhas (C), área foliar (D), massa seca da parte aérea (E) e massa seca de raízes (F) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu



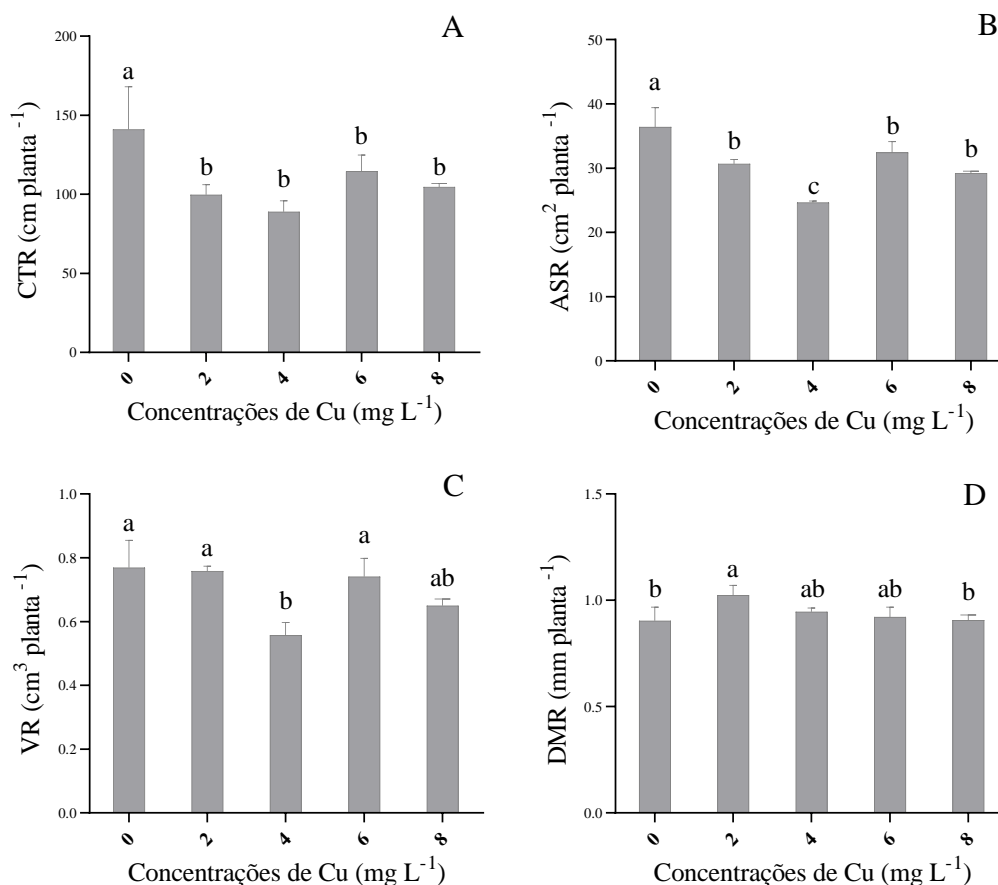
\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média ± desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Para o comprimento de raízes (Figura 9A) e área superficial de raízes (Figura 9B) observou-se que todas as concentrações de Cu promoveram uma redução nessas variáveis. Contudo, para o volume de raízes pode-se observar que o menor valor foi encontrado na concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de Cu, comparado com o controle (Figura 9C).

Além disso, foi possível observar que o diâmetro de raízes apresentou a maior média com a aplicação de 2 mg L<sup>-1</sup> de Cu, comparado com o tratamento controle (Figura 9D).

Figura 9 - Valores médios de comprimento (A), área superficial (B), volume (C) e diâmetro de raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu



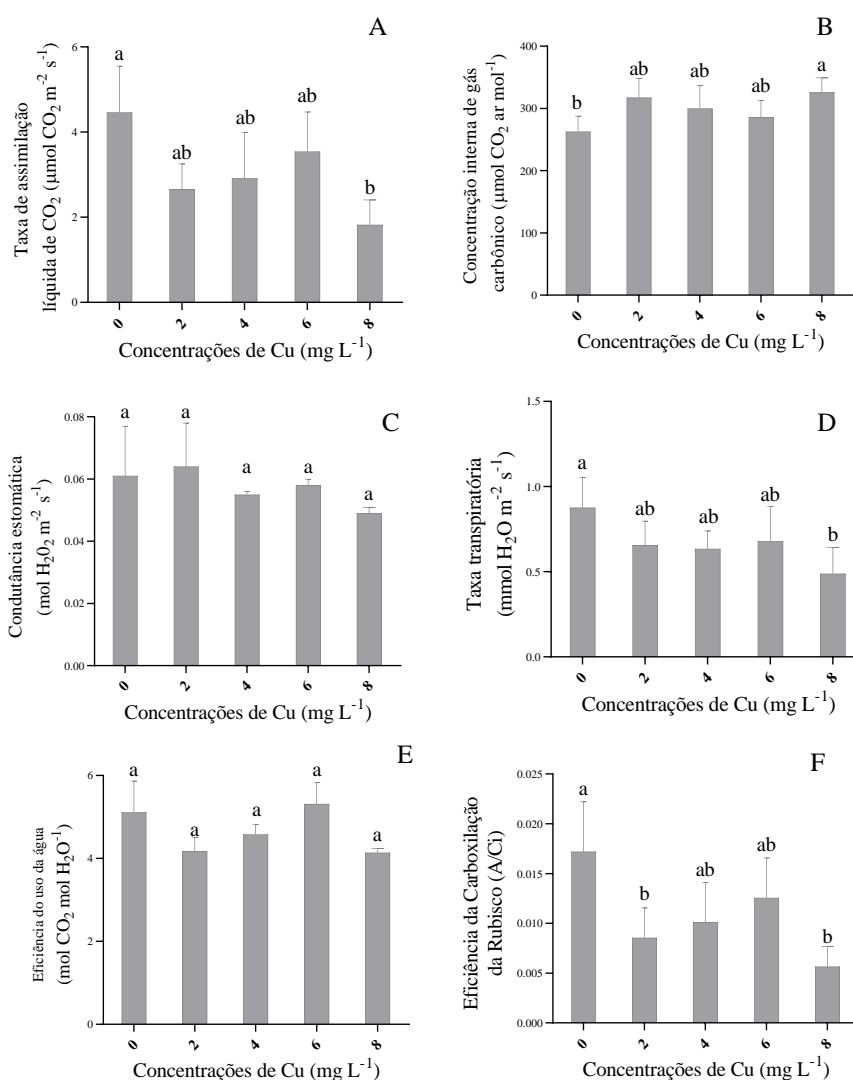
\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Houve efeito ( $p \leq 0,05$ ) das diferentes concentrações de Cu para as variáveis fotossintéticas analisadas no presente estudo. Foi possível observar que a aplicação da maior concentração de Cu (8 mg L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva proporcionou os efeitos mais negativos para a taxa de assimilação líquida (A) (Figura 10A) e taxa transpiratória (Figura 10D), diferindo do tratamento controle. Dessa forma, observou-se na concentração de 8 mg L<sup>-1</sup> um decréscimo de 59,2% para taxa de assimilação líquida, e 44,83% para taxa transpiratória, em relação ao tratamento controle. A eficiência de carboxilação da rubisco (A/Ci) também apresentou sua menor média com 8 mg L<sup>-1</sup> de

Cu, mas se igualou estatisticamente com a concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> (Figura 10F). A concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) apresentou o maior valor em 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu (Figura 10B). Por outro lado, não houve efeito das concentrações de Cu para a condutância estomática (Gs) (Figura 10C) e eficiência do uso da água (EUA) (Figura 10E).

Figura 10 - Valores médios da taxa de assimilação líquida (A) (A), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (Ci) (B), condutância estomática (Gs) (C), taxa transpiratória (E) (D), eficiência do uso da água (EUA) (E) e eficiência instantânea de carboxilação (pela Rubisco) (A/Ci) (F) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu

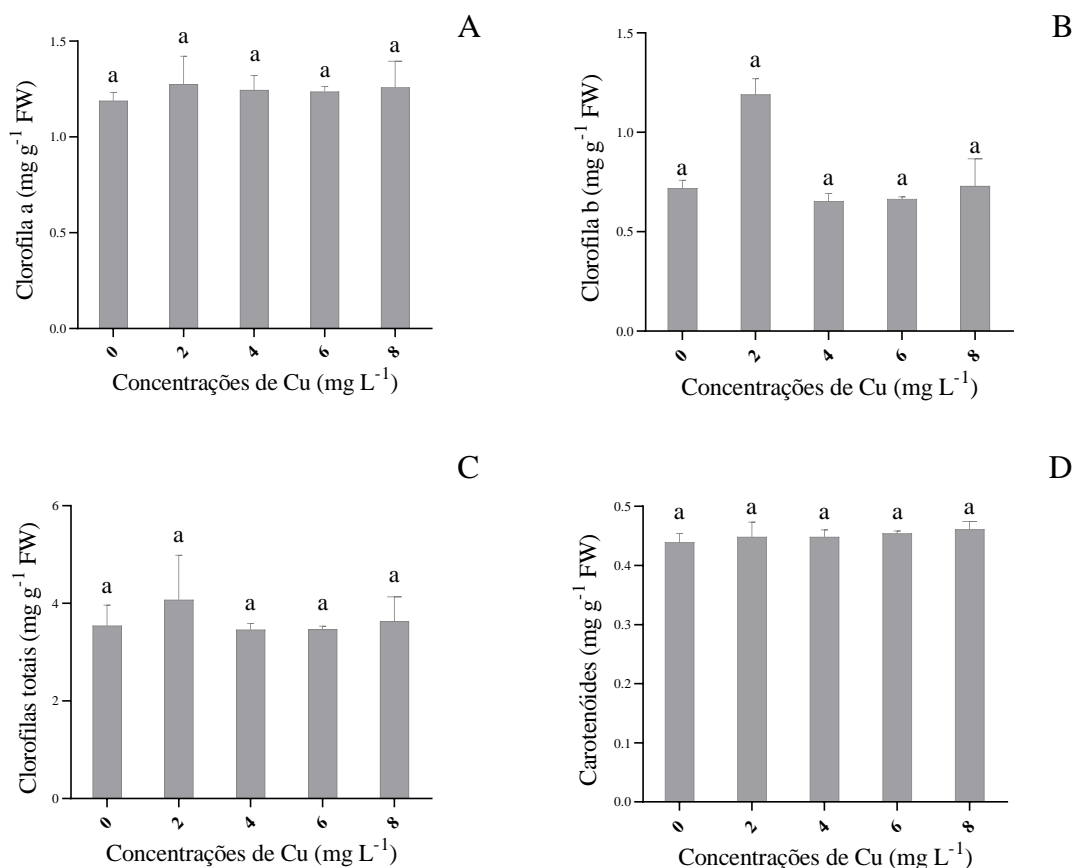


\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média ± desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

O efeito ( $p \leq 0,05$ ) das diferentes concentrações de Cu foi observada para as variáveis bioquímicas do presente estudo, exceto para o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Figura 11), já que não observou-se diferença para os pigmentos fotossintéticos independente das aplicações de Cu (Figura 11).

Figura 11 - Valores médios de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta a diferentes concentrações de Cu

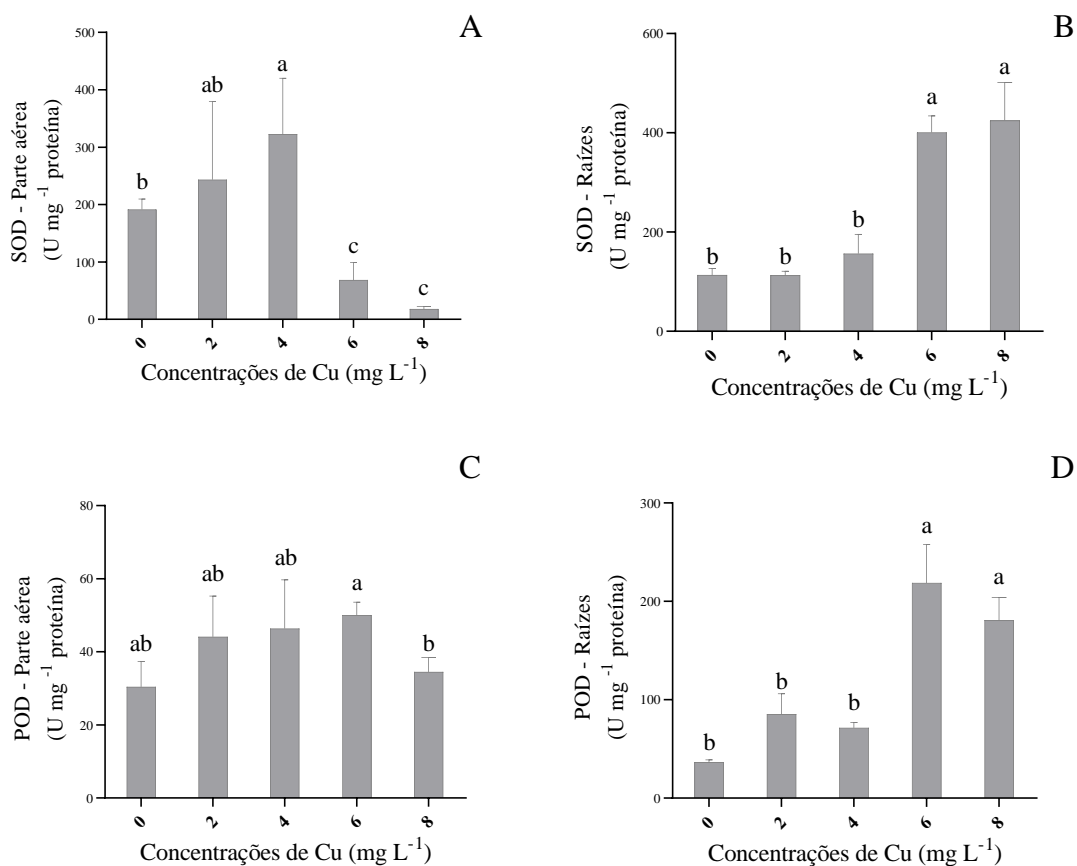


\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Para atividade da superóxido dismutase (SOD) (Figura 12A) da parte aérea foi possível observar um aumento na atividade em 4 mg L<sup>-1</sup> de Cu e uma redução na atividade da SOD em 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu. Observou-se que a atividade da SOD (Figura 12B) e da guaiacol peroxidase (POD) (Figura 12D) nas raízes aumentou quando as plantas foram expostas a 6 e 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu, enquanto não houve efeito do Cu para a atividade da POD na parte aérea (Figura 12C).

Figura 12 - Valores médios da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na parte aérea (A) e raízes (B), e atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu



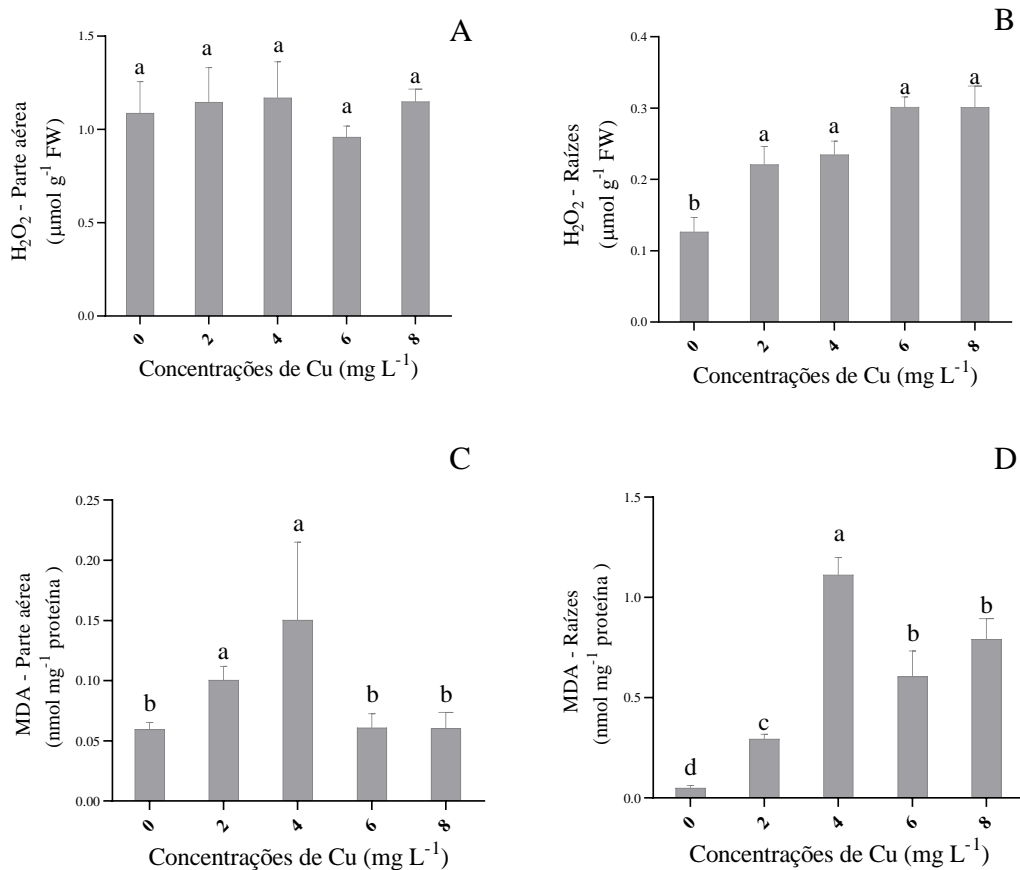
\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Para o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) da parte aérea não foi observada diferença independente das concentrações de Cu aplicadas em solução nutritiva (Figura 13A). Entretanto, observou-se que a aplicação do Cu gerou aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas raízes, já que a menor média foi encontrada apenas no controle (Figura 13B).

Para a peroxidação de lipídeos de membrana (MDA) (Figura 13C) observou-se que houve um aumento na peroxidação lipídica em 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> de Cu na parte aérea e em todas as concentrações de Cu nas raízes, comparado com o tratamento controle (Figura 13D).

Figura 13 - Valores médios do conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em parte aérea (A) e raízes (B), e valores médios da peroxidação de lipídios de membrana (MDA) na parte aérea (C) e raízes (D) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu.

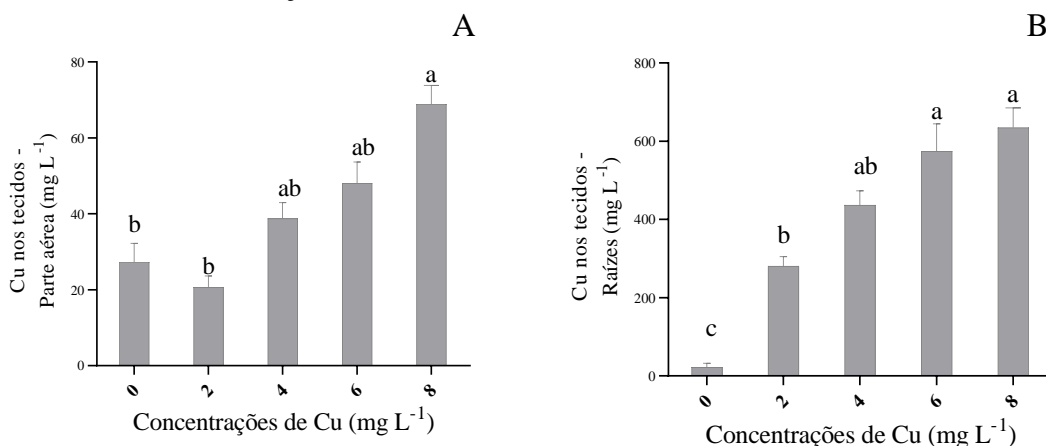


\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

Observou-se que o conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea (Figura 14A) apresentou o maior valor com a aplicação de  $8 mg L^{-1}$ , comparado com o tratamento controle. Por outro lado, foi possível observar que nas raízes houve aumento no conteúdo de Cu em todas as concentrações testadas (Figura 14B).

Figura 14 - Valores médios do conteúdo de Cu nos tecidos da parte aérea (A) e raízes (B) em mudas de *Handroanthus heptaphyllus* em resposta as diferentes concentrações de Cu



\*Letras diferentes entre os tratamentos representam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Fonte: A autora (2021).

## 7.4 DISCUSSÃO

A aplicação excessiva de Cu pode comprometer gravemente o crescimento e a produtividade da planta, induzindo mudanças na arquitetura do sistema radicular e desequilíbrios nutricionais (MARASTONI et al., 2019a). Assim, os metais pesados podem provocar a inibição dos incrementos em parte aérea e raízes, e conseqüentemente diminuir a produção de biomassa das plantas de diversas espécies (DENG et al., 2014).

Entretanto, observou-se no presente estudo que o incremento em parte aérea (IPA) (Figura 8A) foi menos afetado, em comparação ao incremento em raízes (Figura 8B) mediante ao acréscimo de Cu na solução nutritiva. Isso pode ter ocorrido porque a redução do crescimento da raiz é a resposta fisiológica mais evidente das plantas ao estresse por metais pesados, já que as raízes estão em contato direto com os contaminantes (HUANG et al., 2017). Desse modo, o alto teor de Cu provocou redução do alongamento da raiz, causando uma diminuição na divisão celular, e com isso pode ter ocorrido uma menor formação de raízes laterais e mudanças na organização celular do córtex e da epiderme (ROSA et al., 2020).

Além disso, observou-se que os altos níveis de Cu também limitaram o comprimento (Figura 9A) e a área de superfície do sistema radicular (Figura 9B). Resultados semelhantes foram observados por De Conti et al. (2020) em estudo com fertilização de ferro para aumentar os mecanismos de tolerância à toxicidade do Cu em

plantas de *Lolium multiflorum* (azevém). Essas mudanças morfológicas nas raízes podem ser parte de uma resposta ao desequilíbrio hormonal induzido por níveis excessivos de Cu, modificando ou inibindo a multiplicação celular, especialmente nas regiões meristemáticas (DE CONTI et al., 2020).

Entretanto, não houve diferença entre o controle e a maior concentração de Cu ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) para as variáveis volume (Figura 9C) e diâmetro de raízes (Figura 9D). O aumento do diâmetro das raízes observado nas concentrações 2 e  $6 \text{ mg L}^{-1}$  pode estar relacionado a inibição do comprimento da raiz, que está associada a distúrbios na divisão celular. Além disso, a forma iônica livre do metal ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pode se ligar aos grupos carboxílicos ( $-\text{COO}^-$ ) da parede celular, afetando a divisão e organização das células corticais. Por este motivo, a área do córtex e seu diâmetro podem ser aumentados (AMBROSIN et al., 2015), levando, por sua vez, a uma diminuição do comprimento das raízes.

Portanto, essas alterações observadas no volume e diâmetro de raízes (Figuras 9C e 9D) podem ter contribuído para que não ocorresse diferença na massa seca das raízes (Figura 8F), mesmo com a redução do incremento em raízes (Figura 8B). Esses resultados apóiam pesquisas recentes de que as alterações nas variáveis morfológicas das raízes, ao invés da alocação para a biomassa das raízes são alguns dos métodos que as plantas utilizam para se aclimatar e adaptar em condições de estresse (CHEN et al., 2020).

Para a massa seca da parte aérea também não foi observada diferença independente das concentrações de Cu aplicadas (Figura 8E), ao passo que a variável incremento em número de folhas (INF) foi reduzida na presença de  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu, em relação ao controle (Figura 8C). Isso pode ter ocorrido porque a maior parte do Cu acumulado nas plantas encontra-se no nível das raízes (Figura 14B), fato que reduz a fração alocada na parte aérea (Figura 14A) (DE CONTI et al., 2020). Esse fenômeno é descrito em várias espécies de plantas, como um mecanismo de tolerância acionado para prevenir ou limitar o aparecimento de sintomas tóxicos no nível do caule (BALDI et al., 2018). Com isso, é possível inferir que as mudas de ipê-roxo adotaram a estratégia de exclusão por acumular a maior parte do Cu nas raízes para evitar os efeitos de toxicidade do Cu.

Ainda que os teores de Cu na parte aérea (Figura 14A) foram menores do que os valores de Cu nos tecidos das raízes (Figura 14B), foi possível observar um efeito negativo do Cu nas variáveis fotossintéticas (Figura 10), principalmente na maior



concentração de Cu ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ). Desse modo, observou-se redução na taxa fotossintética líquida (Figura 10A) com a aplicação de  $8 \text{ mg L}^{-1}$  em solução nutritiva, visto que nessa concentração foi observado o valor de  $68,87 \text{ mg kg}^{-1}$  nos tecidos da parte aérea. Estudos anteriores mostraram que concentrações de Cu maiores que  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  em tecidos do caule inibem a taxa fotossintética (TRENTIN et al., 2019). A alta concentração de Cu no tecido foliar pode causar a degradação da estrutura interna dos cloroplastos ao substituir o íon Mg central por Cu nas moléculas de clorofila. Isso pode gerar redução da síntese e do conteúdo de pigmento nas folhas (TRENTIN et al., 2019).

A menor taxa transpiratória (Figura 10D) induzida pelas diferentes concentrações de Cu pode estar associada a menor absorção de nutrientes pelas raízes, como consequência da diminuição do desenvolvimento radicular pelo efeito tóxico do Cu (AMBROSIN et al., 2018). No entanto, não houve relação direta entre a taxa fotossintética líquida (Figura 10A) e a condutância estomática (Figura 10C), pois não foi observada uma diminuição da concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular (Figura 10B) associada ao excesso de Cu.

O Cu pode causar danos ao aparato fotossintético da planta (TIECHER et al., 2018), e provocar estresse oxidativo nas mesmas ao gerar desequilíbrio entre as respostas antioxidantes, e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GIROTTO et al., 2013). As ERO, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) são formadas naturalmente dentro das células, especialmente em cloroplastos e mitocôndrias (FERREIRA et al., 2015), como resultado do transporte de elétrons e da respiração celular, respectivamente. No entanto, a produção de ERO é drasticamente aumentada em condições de toxicidade, como em altos níveis de Cu.

A ativação do sistema antioxidante enzimático sob a formação de ERO é uma estratégia comum usada por plantas expostas ao excesso de Cu (BRUNETTO et al., 2019). Ainda nessa visão, a atividade da superóxido dismutase (SOD), que faz parte do sistema de defesa primário das plantas para a eliminação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) é frequentemente relatada (TIECHER et al., 2017).

Assim, observou-se que a atividade da SOD nas raízes apresentou aumento nas maiores concentrações de Cu ( $6$  e  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 12B). A possível razão pode estar associada ao aumento da produção de radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nesse órgão, levando à ativação do estoque de enzima existente (HASSAN et al., 2020). O aumento da atividade da SOD

nas raízes indica que os radicais livres gerados devido ao estresse estão sendo neutralizados, resultando em alto acúmulo de  $H_2O_2$ , já que a SOD está envolvida na dismutação do radical livre superóxido em  $H_2O_2$ , sendo eficaz na prevenção de danos celulares (SCHWALBERT et al., 2019). Nas raízes foi também observada ativação da enzima guaicol peroxidase (POD) nas mesmas concentrações de Cu, indicando que o  $H_2O_2$  produzido pela atividade da SOD está sendo dismutado pela POD. Com isso, verificou-se nas raízes a ocorrência de correlação positiva entre a atividade da SOD e da POD nas raízes (Figuras 12B e 12D), concentração de  $H_2O_2$  (Figura 13B), e conteúdo de Cu nos tecidos das raízes (Figura 14B).

Entretanto, não foi observado o aumento do conteúdo de  $H_2O_2$  na parte aérea das mudas de ipê-roxo (Figura 13C). Esse resultado indica que a presença de antioxidantes nas raízes se fez mais necessária do que na parte aérea, já que houve menor atividade da SOD e POD nesse órgão, e conseqüentemente resultou em menor acúmulo de  $H_2O_2$  na parte aérea. Isso pode estar relacionado com um menor estresse que estaria sendo ocasionado pelo Cu na parte aérea, ao contrário das raízes que são o alvo inicial, e que mais sofrem com os danos ocasionados pelo Cu, sendo necessária uma resposta maior pelo sistema antioxidante.

O acúmulo de  $H_2O_2$  em grande quantidade é extremamente prejudicial para o metabolismo celular. Dessa forma, a POD atua na conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio por dissociação de  $H_2O_2$ , desempenhando papel essencial no fornecimento de tolerância às condições desfavoráveis nas plantas (LI et al., 2014).

Contudo, não foi observada diferença entre o tratamento controle e as demais concentrações de Cu para a atividade da POD na parte aérea (Figura 12C). Estudos demonstraram que tanto aumentos, como reduções nas atividades enzimáticas são comumente observados em resposta à exposição aos metais pesados (LIU et al., 2018). O aumento da atividade da POD nas raízes (Figura 12D) pode ser resultado tanto da estimulação por estresse de Cu, quanto do aumento nos teores de substrato, uma vez que a SOD foi ativada nas raízes, liberando mais  $H_2O_2$  (Figura 13A).

Entretanto, o aumento da atividade da POD nas raízes (Figura 12D) não foi suficiente para evitar uma maior produção de  $H_2O_2$  nesses órgãos (Figura 13B), já que o conteúdo de  $H_2O_2$  das raízes aumentou significativamente com a aplicação de Cu em solução nutritiva. Os aumentos observados em  $H_2O_2$  sob estresse de Cu provavelmente são responsáveis pela peroxidação lipídica, que é indicada pelo acúmulo excessivo de MDA.

O conteúdo de peroxidação de lipídeos de membrana (MDA) nas raízes aumentou significativamente conforme o aumento de Cu em solução nutritiva (Figura 13D). Esse aumento do MDA pode ser um efeito direto da toxicidade do Cu, indicando estresse oxidativo nas mudas de Ipê-roxo, e como resultado pode causar dano irreversível ao desenvolvimento e função do tecido vegetal a longo prazo.

A disponibilidade excessiva de Cu pode não apenas afetar a funcionalidade de transportadores transmembrana e canais iônicos (MARASTONI et al., 2019a), mas também alterar consideravelmente a permeabilidade da membrana induzindo desequilíbrio nutricional em ambientes contaminados com metais pesados ( DECONTI et al., 2019). Assim, é possível inferir que as diferentes concentrações de Cu podem alterar o equilíbrio original da permeabilidade da membrana plasmática, bem como aumentar a produção de ERRO e induzir a expressão de proteínas antioxidantes como resposta adaptativa para neutralizar o excesso de ERRO e minimizar os danos.

Portanto, observou-se que as variáveis massa seca da parte aérea e raízes, incremento em número de folhas e pigmentos fotossintéticos não foram afetadas negativamente pelo Cu. Por outro lado, essa espécie teve a taxa de assimilação líquida e taxa transpiratória reduzida somente a partir de 8 mg L<sup>-1</sup> de Cu.

## 7.5 CONCLUSÃO

A espécie *Handroanthus heptaphyllus*, em geral, foi afetada pelo excesso de Cu apenas na concentração de 8 mg L<sup>-1</sup>, e o Cu foi acumulado principalmente nas raízes, sem registrar diminuição na biomassa radicular e da parte aérea, o que pode indicar tolerância da espécie a este metal, com grande potencial para utilização na fitorremediação de solos contaminados por Cu.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, A. Sources of metal pollution in the urban atmosphere (A case study: tuzla, Istanbul). **J. Environ. Health Sci. Eng.**, v.13, n.1, p.1–10, 2015.

AMBROSINI, V. G. et al. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiol. Biochem.**, v. 96, p. 270-280, 2015.

AMBROSIN, V. G. et al. High copper content in vineyard soils promotes modifications in photosynthetic parameters and morphological changes in the root system of 'Red Niagara' plantlets. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 89-98, 2018.

BALDI, E. et al. Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 102-111, 2018.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p. 276-287, 1971.

BRUNETTO, G. et al. Use of phosphorus fertilization and mycorrhization as strategies for reducing copper toxicity in young grapevines. **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 176-183, 2019.

CAMBROLLÉ, J. et al. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, p. 294-301, 2013.

CAMBROLLÉ, J. et al. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, n. 120, p. 171-178, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. EMBRAPA, SPI, p.640, 1994.

CHEN, Z. et al. Water-nutrient management enhances root morpho-physiological functioning, phosphorus absorption, transportation and utilization of cotton in arid region. **Industrial Crops & Products**, v. 143, p. 02-09, 2020.

DE CONTI, L. et al. Iron fertilization to enhance tolerance mechanisms to copper toxicity of ryegrass plants used as cover crop in vineyards. **Chemosphere**, v. 243, p. 01-12, 2020.

DE CONTI, L. et al. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 216, p. 147-156, 2019.

DENG, G. et al. Exposure to cadmium causes declines in growth and photosynthesis in the endangered aquatic fern (*Ceratopteris pteridoides*). **Aquatic Botany**, v. 112, p. 23-32, 2014.

EL-MOSHATY, F. I. B. et al. Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus. **Journal Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.43, n.15, p.109- 119, 1993.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. ampl. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2009. 627p.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 02, 2014.
- FERREIRA, P. A. A. et al. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. **Appl. Soil Ecol.**, v. 91, p. 37-47, 2015.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 59, p. 315-318, 1977.
- GIROTTI, E. et al. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 93, p. 145-155, 2013.
- GONÇALVES, P. J. R. O. et al. Tolerance of tree reforestation species (*Schizolobium parahyba*, *Mimosa scabrella* and *Enterolobium contortisiliquum*) to Gasoline and Diesel Phytotoxicity Assays. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, S7:004, p. 1-8, 2012.
- GROSE, S.O.; OLMSTEAD, R.G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* sl (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, 32: p. 660-670. 2007.
- HASSAN, M. J. et al. Effect of Cadmium Toxicity on Growth, Oxidative Damage, Antioxidant Defense System and Cadmium Accumulation in Two Sorghum Cultivars. **Plants**, v. 9, n. 11; p. 1-14, 2020.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p.1132-1334, 1979.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The waterculture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: **Agric. Exp. Stn.**, Univ. Of California. (Circ. 347). 1950.
- HUANG, D. et al. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. **Planta**, v. 245, n. 5, p. 863-873, 2017.
- LI, Z. et al. Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. **Molecules**, v.19, n. 11, p. 18003–18024, 2014
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER L, DOUCE R (eds). *Methods in Enzimology*, London: **Academic Press**. v. 148, p. 350-381, 1987.
- LIU Z. et al. Effects of low concentration cadmium on the growth and photosynthetic physiology of *Lonicera japonica* Thunb. **Environmental Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 223-228, 2018.

LONGUI, R. A. **Livros das árvores**; árvores e arvoretas do Sum. 2. Ed., Porto Alegre, L&PM, p.176, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Vol. 1. 5 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum,v.1, p.368, 2002.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v.127, n.9, p.1781-1787, 2001.

MARASTONI, L. et al. The potential of two different *Avena sativa* L. cultivars to alleviate Cu toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 01-09, 2019a.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J.O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). **Environmental Pollution**, v.149, p.10-17, 2007.

NADERIZADEH, Z.; KHADEMI, H.; AYOUBI, S. Biomonitoring of atmospheric heavy metals pollution using dust deposited on date palm leaves in southwestern Iran. **Atmosfera**, v.29, n.2, p.141–155, 2016.

PIETRZAK, U.; McPHAIL, D.C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. **Geoderma**, v.122, p.151-166, 2004.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, Zürich, v.1, n.3, p.499-514, 1973.

ROSA, D. R. et al. Lime Protection for young vines exposed to copper toxicity. **Water Air Soil Pollut.**, v. 231 p.01-10, 2020.

SAMPAIO, M. T. F.; POLO, M.; BARBOSA, W. Estudo do crescimento de espécies de árvores semidecíduas em uma área ciliar revegetada. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 879-885, 2012.

SCHULZE, M. et al. E. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, 141(8), p. 2071-2085, 2008.

SCHWALBERT, R. et al. Physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars to copper excess. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 91, n. 04, 2019.

SONMEZ, S.; KAPLAN, M.; SONMEZ, N.K.; KAYA, H.; UZ, I. High Level of Copper application to soil and leaves reduce the growth and yield of tomato plants. **Scientia Agricola**, v.63, p.213- 218, 2006.

STORCK, L. et al. **Experimentação vegetal**. 3. ed. Santa Maria, RS: Editora da UFSM. 2016. 198p.

SUVARAPU, L.N.; BAEK, S.O.; Determination of heavy metals in the ambient atmosphere:a review. **Toxicol. Ind. Health**, v.33, n.1, p.79–96, 2017.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C. & BIASSANI, C. A. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (BoletimTécnico, 5).

TIECHER. T. L. et al. The interaction of high copper and zinc doses in acid soil changes the physiological state and development of the root system in young grapevines (*Vitis vinifera*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 148, p. 985-99, 2018.

TIECHER. T. L. et al. Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 203-212, 2017.

TRENTIN, E. et al. Potential of vermicompost and limestone in reducing copper toxicity in young grapevines grown in Cu-contaminated vineyard soil. **Chemosphere**, v. 226, p. 421-430, 2019.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v.31, p.731-734, 2008.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v.167, p.527-533, 2004.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou informações relevantes de duas espécies florestais importantes, *Cedrela fissilis* e *Handroanthus heptaphyllus*, sob o efeito de cobre (Cu), elemento essencial para as plantas em baixas concentrações, porém pode causar danos na produção e crescimento quando presente em altas concentrações.

A espécie *Cedrela fissilis* teve as variáveis fisiológicas e bioquímicas afetadas negativamente, desse modo apresentou um comportamento sensível na presença de Cu em sistema hidropônico. Com isso, mudas de *Cedrela fissilis* podem ser consideradas como sinalizadores de áreas contaminadas.

A espécie *Handroanthus heptaphyllus* apresentou sensibilidade ao Cu, de uma forma geral, somente na maior concentração de Cu aplicada ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ), apresentando tolerância em concentrações mais baixas, indicando que esta espécie pode ser utilizada como fitorremediadora de solos contaminados por Cu.

Experimentos à curto prazo, como o experimento hidropônico realizado neste estudo, se torna atraentes perante uma análise mais rápida em relação a toxicidade de metais, ponderando uma possível utilização destas espécies para o uso da fitorremediação (GONÇALVES et al., 2012).

Portanto, os resultados alcançados neste estudo cooperam para pesquisas futuras, além de auxiliar na escolha de espécies apropriadas no plantio de locais contaminados por metais pesados.



## APÊNDICES

APÊNDICE A - Plantas de *Cedrela fissilis* (A) e *Handroanthus heptaphyllu* (B) durante o período de aclimação no sistema hidropônico em casa de vegetação.



A



B

APÊNDICE B - Procedimento de avaliação da fotossíntese em *Cedrela fissilis* (A) e *Handroanthus heptaphyllus* (B).



A



B

APÊNDICE C - Mudas de *Cedrela fissilis* (A) e *Handroanthus heptaphyllus* (B) após 21 dias de exposição a diferentes concentrações de Cu em sistema hidropônico.



A



B