

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade

Rede Pro Centro Oeste

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM
SEMENTES, PLÂNTULAS E FOLÍOLOS DE *Ingá laurina*
(*FEBRACEAE*) INDUZIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE COBRE, FERRO E ZINCO

DANIELA ESPANGUER GRACIANO

Dourados –MS

ABRIL - 2020

DANIELA ESPANGUER GRACIANO

**Avaliação das alterações fisiológicas em sementes, plântulas e folíolos de
Ingá laurina (FEBRACEAE) induzidas por nanopartículas de óxido de
cobre, ferro e zinco**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade

Orientador: Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Coorientador: Dr. Etenaldo Felipe Santiago

Dourados –MS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

G731a Graciano, Daniela Espanguer
Avaliação das alterações fisiológicas em sementes, plântulas e folíolos de *Ingá laurina* (Fabaceae) induzidas por nanopartículas de óxido de cobre, ferro e zinco [recurso eletrônico] / Daniela Espanguer Graciano. -- 2022.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.
Coorientador: Dr. Etenaldo Felipe Santiago.
Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Nanopartículas óxido metálicas. 2. Alteração fisiológica. 3. Espectroscopia de fluorescência. 4. Clorofila a. 5. Bioindicador. I. Caires, Dr. Anderson Rodrigues Lima. II. Santiago, Dr. Etenaldo Felipe. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

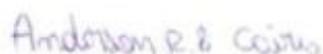
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES, PLÂNTULAS E FOLÍOLOS DE *Inga laurina* (Fabaceae) INDUZIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE, FERRO E ZINCO"

Por

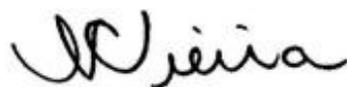
DANIELA ESPANGUER GRACIANO

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade


(Assinatura digitalizada ou digital)

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientador/Presidente – UFMS



Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Vieira
Membro Titular – UFGD



Prof. Dr. José Carlos Sorgato
Universidade Federal da Grande Dourados
Membro Titular – UFGD

Sandro Marcio Lima

Prof. Dr. Sandro Marcio Lima
Universidade Estadual e Mato Grosso do Sul

Membro Titular Externo – UEMS

Jaldair Araújo e Nóbrega

Prof. Dr. Jaldair Araújo e Nóbrega
Universidade Federal da Grande Dourados

Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 06 de abril de 2020.

RESUMO

GRACIANO, Daniela Espanguer. Universidade Federal da Grande Dourados, Abril de 2020. **“ Avaliação das alterações fisiológicas em sementes, plântulas e folíolos de *Inga laurina* (FEBRACEAE) induzidas por nanopartículas de óxido de cobre, ferro e zinco”**. Orientadora: Prof^o Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires. Co-orientador: Prof^o: Dr. Etenaldo Felipe Santiago.

O avanço tecnológico da nanotecnologia na sociedade moderna nos apresenta o desafio de gerar dados e informações que amparem a evolução normativa e da legislação para regular as aplicações de nanopartículas (NPs) utilizadas na indústria, bem como o uso, armazenamento e descarte das NPs no meio ambiente. No presente estudo objetivou-se avaliar e caracterizar o funcionamento fisiológico de sementes de *Inga laurina* quando expostas as nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), ferro (Fe₂O₃NPs) e zinco (ZnONPs). Para tal, foram determinados os índices de germinação e crescimento das raízes quando submetidas a diferentes concentrações de NPs e avaliadas as alterações na capacidade fotossintética das sementes via análises de imagem de fluorescência da clorofila *a* durante o período germinativo e em plantas jovens, 30 dias após a exposição. Os resultados obtidos para CuONPs mostraram uma redução da intensidade de fluorescência ao longo do tempo para o tratamento 50 mgL⁻¹ quando comparado ao grupo Controle (0 mgL⁻¹). Diferentemente, um aumento foi observado para as demais concentrações (100, 200 e 300 mgL⁻¹). As alterações na intensidade de fluorescência foram uma consequência da redução (50 mgL⁻¹) ou aumento (100, 200 e 300 mgL⁻¹) no teor de clorofila promovido pelas CuONPs. Foi observado também que as CuONPs induziram oscilações na temperatura das plântulas ao longo dos sete dias em todos os tratamentos. Os resultados demonstraram que as CuONPs não impactaram o processo de germinação, apresentando índices de germinação de 100% para todos os tratamentos. Todavia, o crescimento das raízes foi impactado pelas concentrações de CuONPs, no qual uma redução do tamanho da raiz foi observada para todas as concentrações. Os resultados também demonstraram que o funcionamento do aparato fotossintético e a temperatura das sementes/plântulas/folíolos foram impactados pelas Fe₂O₃NPs e ZnONPs de maneira similar ao observado para as CuONPs, na qual ocorreu um aumento gradativo da eficiência fotoquímica em função do aumento da concentração de nanopartículas. Os índices de germinação foram de 100% para todos os tratamentos para ambas nanopartículas. Entretanto, diferentemente das CuONPs, as Fe₂O₃NPs e ZnONPs não impactaram no desenvolvimento das raízes. Em resumo, o presente estudo mostra pela primeira vez que, dependendo da concentração, as CuONPs, Fe₂O₃NPs e ZnONPs podem impactar positivamente ou

negativamente o status fisiológico da planta *Inga laurina* em seu estágio inicial de desenvolvimento, alterando principalmente a eficiência do funcionamento do fotossistema II.

Palavras-chave: Nanopartículas óxido metálicas, alteração fisiológica, espectroscopia de fluorescência, Clorofila *a*, bioindicador.

ABSTRACT

GRACIANO, Daniela Espanguer. Federal University of Grande Dourados, April 2020. **“Evaluation of physiological changes in seeds, seedlings and leaflets of *Inga laurina* (FEBRACEAE) induced by nanoparticles of copper, iron and zinc oxide”**. Advisor: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires. Co-supervisor: Prof. Dr. Etenaldo Felipe Santiago.

The technological advancement of nanotechnology in modern society presents us with the challenge of generating data and information that support the normative evolution and legislation to regulate the applications of nanoparticles (NPs) used in industry, as well as the use, storage and disposal of NPs in the environment. The present study aimed to evaluate and characterize the physiological functioning of *Inga laurina* seeds when exposed to copper oxide nanoparticles (CuONPs), iron (Fe₂O₃NPs) and zinc (ZnONPs); For this purpose, the germination and root growth indices were determined when submitted to different concentrations of NPs and the changes in the photosynthetic capacity of the seeds were evaluated by chlorophyll a fluorescence image analyses during the germination period and in young plants, 30 days after exposure. The results obtained for CuONPs showed a reduction in fluorescence intensity over time for treatment 50 mgL⁻¹ when compared to the Control group (H₂O, 0 mgL⁻¹). In other cases, an increase was observed for the other concentrations (100, 200 and 300 mgL⁻¹). Changes in fluorescence intensity were a consequence of the reduction (50 mgL⁻¹) or increase (100, 200 and 300 mgL⁻¹) in chlorophyll content promoted by CuONPs. It was also observed that CuONPs induced oscillations in seedling temperature over the seven days in all treatments. The results showed that the CuONPs did not impact the germination process, presenting germination rates of 100% for all treatments. However, root growth was impacted by CuONPs, in which a reduction in root elongation was observed for all concentrations. The results also demonstrated that the functioning of the photosynthetic apparatus and the temperature of the seeds/seedlings/leaflets were impacted by Fe₂O₃NPs and ZnONPs in a similar way to that observed for CuONPs, in which there was a gradual increase in photochemical efficiency due to the increase in the concentration of nanoparticles. Germination rates were 100% for all treatments for both nanoparticles. However, unlike CuONPs, Fe₂O₃NPs and ZnONPs did not impact root development. In summary, the present study shows for the first time that, depending on the concentration, CuONPs, Fe₂O₃NPs and ZnONPs could positively or negatively impact the physiological status of plant *Inga laurina*

in its initial stage of development, mainly altering the efficiency of the operation of photosystem II.

Keywords: Metallic oxide nanoparticles, physiological alteration, fluorescence spectroscopy, Chlorophyll *a*, bioindicator.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
ÍNDICE.....	ERROR! INDICADOR NÃO DEFINIDO .
FIGURAS.....	12
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	18
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
1.1 Históricos das questões ambientais, legislação e aplicação dos nanomateriais na indústria.....	20
1.2 Impacto ambiental e estudos de plantas como bioindicadores ambientais.....	23
1.3 Nanopartículas:.....	27
1.3.1 Estudos sobre sua interação com organismos, tecidos ou células; características e propriedades.....	27
1.4 Espécie selecionada para o estudo e sua importância.....	30
1.5 Fotossíntese e produção de NADPH, e ATP, a partir de energia quântica da luz.....	33
1.6 Técnicas ópticas para estudo da fotossíntese e detecção de estresse de plantas.....	36
1.6.1 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	36
1.6.2 Espectroscopia molecular de absorção no UV-Vis (Análise do extrato).....	38
1.6.3 Imagem termografia/Temperatura superficial.....	39
1.6.4 Fluorescência estacionária - portátil.....	40
1.6.5 Índice de germinação e crescimento da raiz.....	40
2.OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos.....	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 Material Botânico.....	44
3.2 Nanopartículas utilizadas.....	44
3.3 Teste de Germinação.....	44
3.4 Tamanho da raiz.....	46

3.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i> modulada e cinética.....	47
3.7 Obtenção das imagens termográficas.....	49
3.8 Caracterização óptica do extrato.....	50
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	52
4.1 CuONPs.....	52
4.1.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) – sementes e plântulas.....	52
4.1.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) – folíolos.....	56
4.1.3 Eficiência fotoquímica (<i>Fv/Fm</i>) – semente e plântulas.....	58
4.1.4 Eficiência fotoquímica (<i>Fv/Fm</i>) – folíolos.....	62
4.1.5 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – sementes.....	62
4.1.6 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – folíolo.....	65
4.1.7 Fluorescência estacionária – sementes e plântulas.....	66
4.1.8 Fluorescência estacionária- folíolo.....	68
4.1.10 Análises termográficas – folíolo.....	70
4.1.11 Índice de germinação e tamanho da raiz.....	72
4.1.12 Análise do extrato.....	76
4.2 Fe₂O₃NPs.....	80
4.2.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) – sementes e plântulas.....	80
4.2.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) - folíolo.....	82
4.2.3 Eficiência fotoquímica (<i>Q_y_max</i>) – semente e plântulas.....	84
4.2.4 Eficiência fotoquímica (<i>fv/fm</i>) – folíolo.....	87
4.2.5 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – sementes e plântulas.....	88
4.2.6 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – folíolo.....	90
4.2.7 Fluorescência estacionária – sementes e plântulas.....	91
4.2.8 Fluorescência estacionária – folíolos.....	93
4.2.9 Análises termográficas – sementes e plântulas.....	95
4.2.10 Análises termográficas – folíolos.....	96
4.2.11 Índice de germinação e comprimento da radícula das sementes.....	98
4.2.12 Análise de Extrato Bruto.....	101
4.3 ZnONPs.....	105
4.3.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) – sementes e plântulas.....	105
4.3.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>FM_Lss</i>) - folíolo.....	108
4.3.3 Eficiência fotoquímica (<i>Fv/Fm</i>) – semente e plântulas sementes e plântulas.....	109
4.3.4 Eficiência fotoquímica (<i>fv/fm</i>) – folíolo.....	112
4.3.5 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – sementes e plântulas.....	113
4.3.6 Supressão não-fotoquímica (<i>NPQ_Lss</i>) – folíolo.....	115
4.3.7 Fluorescência estacionária – sementes e plântulas.....	116
4.3.8 Fluorescência estacionária – folíolos.....	118
4.3.9 Análises termográficas – sementes e plântulas.....	119
4.3.10 Análises termográficas – folíolo.....	120
4.3.11 Índice de germinação e comprimento da raiz, sementes e plântulas.....	121
4.3.12 Análise do extrato.....	125
5. CONCLUSÕES.....	128
6. REFERENCIAS.....	129

FIGURAS

- Figura 1 : Tabela de classificação máxima de efluentes em corpos d'água, limites de classe dos parâmetros monitorados. (RESOLUÇÃO 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005). Fonte: Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.....22
- Figura 2 : *Inga laurina* Sw. (Willd). A- Hábito. B. Botões em pré antese. C. Inflorescência em espiga. D. Fruto aberto com presença de quatro sementes envolvida pela sacrotesta. E. Sementes poliembrioadas, removida sarcotesta (setas: embriões), (VIEIRA, 2015)..... 30
- Figura 3 : Estruturas metabólicas presentes em *Inga laurina*, Galoil tirosina (20); m-digaloil tirosina (21); m- trigaloil tirosina (22); miricetina 3-O- α (2'-O galoil); ramnosídeo (23); ácido arcórbico (24). Adaptado por (LOKVAM et al., 2007).....32
- Figura 4 : Aparelho de imagem termográfica utilizado (Testo 881) . Foto: Daniela Graciano..... 39
- Figura 5 : Aparelho de fluorescência estacionária utilizado. Foto: Daniela Graciano..... 40
- Figura 6 : (A) Frutos e sementes beneficiadas de *Inga laurina* e (B) sementes de *Inga laurina* embebidas em solução. Foto: Daniela Graciano.....44
- Figura 7 : (A) Sementes de *Inga laurina* em diferentes tratamentos de exposição e mantidas sob agitação. (B) Sementes pós embebição expostas a CuONPs em água ultra-pura, colocadas em caixa de germinação e avaliadas durante 7 dias. Foto: Daniela Graciano 46
- Figura 8 : Avaliação do tamanho da raiz de plântulas de *Inga laurina* submetidas a diferentes concentrações de CuONPs, decorridos 168h após o período de embebição, com o auxílio de um paquímetro digital. Foto: Daniela Graciano..... 46
- Figura 9 : Plantulas de *Inga laurina* decorridos 30 dias de casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano47
- Figura 10 : (A) Equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, utilizado para aferir os parâmetros de fluorescência da (Chl-*a*). (B) imagem de emissão de fluorescência da clorofila em sementes e plântulas de *Inga laurina*. Foto: Daniela Graciano.....48
- Figura 11 : Obtenção dos espectros de fluorescência estacionária da clorofila *a*, medidas no período após embebição da semente (48h) e diariamente a cada 24h até (168h) final de período de germinação e após 30 dias. Foto: Daniela Graciano..... 49
- Figura 12 : (A) Câmera Termográfica utilizado no experimento: (B) Imagem termográfica indicando a temperatura superficial de sementes e plântulas de *Inga laurina* e (C) Imagem termográfica no software. Foto: Daniela Graciano..... 50
- Figura 13 : (A) Aparelho de UV/Vis e (B) Extrato da clorofila a ser analisado. Foto: Daniela Graciano51
- Figura 14 : (A) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (*Fm_Lss*) no período de 24 a 168h, após a imersão em 0 mgL⁻¹ de CuONPs. (B) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (*Fm_Lss*) no

período de 24 a 168h, após a imersão em 50 mgL ⁻¹ de CuONPs. (C) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro (<i>Fm_Lss</i>) no período de 24 a 168h, após a imersão em 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.....	52
Figura 15 : <i>FM_Lss</i> média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> , em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, $p < 0, 05$; $n = 10$).....	54
Figura 16 : <i>Fm_Lss</i> de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.	55
Figura 17 : <i>Fm_Lss</i> média de 10 plântulas de <i>Inga laurina</i> , 30 dias após embebição com CuONPs....	56
Figura 18 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro (<i>Fm_Lss</i>), (A) 30 dias após a imersão em 50 mgL ⁻¹ de CuONPs e (B) 30 dias após a imersão em 300 mgL ⁻¹	58
Figura 19 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica $Qy_{max} = Fv/Fm$: (A) 0 mgL ⁻¹ , (B) 50 mgL ⁻¹ de CuONPs, e (C) 300 mgL ⁻¹ de CuONPs,	59
Figura 20 : Qy_{max} - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, $p < 0, 05$; $n = 10$).....	60
Figura 21 : Qy_{max} - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 plântulas de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs, após 30 dias da embebição.	62
Figura 22 : <i>NPQ_Lss</i> - parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, $p < 0, 05$, $n = 10$).....	63
Figura 23 : <i>NPQ_Lss</i> - parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.....	64
Figura 24 : <i>NPQ_Lss</i> - parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 plântulas de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após serem submetidas após 30 dias da embebição a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.....	66
Figura 25 : Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária ao longo do tempo da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.....	66
Figura 26 : Razão F685/F735 em função da concentração de CuONPs, com excitação em 405 nm, em 168h de germinação (7 dias).....	67
Figura 27 : Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária da média de 10 plântulas de <i>Inga laurina</i> , após 30 dias de serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.....	68

Figura 28 : Temperatura média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo em todas as concentrações de CuONPs comparadas com a controle (0 mgL ⁻¹). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n=10).....	69
Figura 29 : Temperatura de plântulas de <i>Inga laurina</i> em todas as concentrações de CuONPs comparadas com a controle (0 mgL ⁻¹). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n=10).....	71
Figura 30 : Imagem do último dia de germinação 168h de plântulas de <i>Inga laurina</i> , para concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ CuONPs. Foto: Daniela Graciano.....	72
Figura 31 : Comprimento da radícula após 168 h do período de embebição das sementes de <i>Inga laurina</i> , em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de CuONPs.	73
Figura 32 : Comprimento da raiz de sementes, após 168h após embebição com concentrações de CuONPs. Foto: Daniela Graciano.....	74
Figura 33 : Comprimento das raízes das plantulas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de plantio em casa de vegetação.....	75
Figura 34 : Comprimento da raiz, após 30 dias após embebição de 0 e 50 mgL ⁻¹ CuONPs. Foto: Daniela Graciano.....	75
Figura 35 : Espectro de Fluorescência Uv/vis de folhas de <i>Inga laurina</i> , após 30 Dias de embebição de quatro concentrações de CuONPs.....	76
Figura 36 : Médias de Clorofila (a e b) e carotenoides em plântulas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias, após embebição com concentrações de CuONPs.....	78
Figura 37 : Médias de Clorofila Total (a e b) em plântulas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de embebição com concentrações de CuONPs.....	79
Figura 38 : (A) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de <i>Inga laurina</i> para o <i>Fm_Lss</i> no período de 24 a 168h, após a imersão em 0 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs; (B) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de <i>Inga laurina</i> para o <i>Fm_Lss</i> no período de 24 a 168h, após a imersão em 50 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs; (C) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de <i>Inga laurina</i> para o <i>Fm_Lss</i> no período de 24 a 168h, após a imersão em 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	80
Figura 39 : <i>Fm_Lss</i> média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> , em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).....	81
Figura 40 : <i>Fm_Lss</i> de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	82
Figura 41 : <i>Fm_Lss</i> ' média de 10 plântulas de <i>Inga laurina</i> , após 30 dias após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	83
Figura 42 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de <i>Inga laurina</i> para (<i>Fm_Lss</i>), nas concentrações de 0, 50 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs, aos 30 dias após germinação.....	84

Figura 43 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica (Q_y_{max}): (A) 0 mgL ⁻¹ , (B) 50 mgL ⁻¹ , e (C) 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	85
Figura 44 : Q_y_{max} - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).....	86
Figura 45 : $Q_y_{max} = (Fv/Fm)$ - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mg L ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	87
Figura 46 : Q_y_{max} - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de plântulas de <i>Inga laurina</i> , após 30 dias de exposição a Fe ₂ O ₃ NPs.....	88
Figura 47 : NPQ_{Lss}' - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05, n = 10).....	89
Figura 48 : NPQ_{Lss} - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05; n = 10).....	90
Figura 49 : NPQ_{Lss} - dissipação não fotoquímica da média de plântulas de <i>Inga laurina</i> , depois de 30 dias, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	91
Figura 50 : Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária ao longo do tempo da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	92
Figura 51 : Razão F685/F735 em função da concentração de Fe ₂ O ₃ NPs, com excitação em 405 nm, durante o período de germinação (7 Dias) e 30 dias após o plantio.....	93
Figura 52 : Espectro da Fluorescência estacionária da média de 10 de plântulas de <i>Inga laurina</i> , após 30 dias de serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ Nps.....	94
Figura 53 : Razão F685/F735 em função da concentração de NPs de Ferro (Fe ₂ O ₃ NPs), com excitação em 405 nm, após 30 Dias de exposição as nanoparticulas.....	95
Figura 54 : Análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).....	96
Figura 55 : Temperatura superficial de plântulas de <i>Inga laurina</i> , após 30 dias de exposição à Fe ₂ O ₃ NPs.....	97
Figura 56 : Imagem do último dia de germinação, 168h, de sementes de <i>Inga laurina</i> para concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs. Foto: Daniela Graciano.....	98
Figura 57 : Comprimento da raiz após 168h do período de embebição das sementes de <i>Inga laurina</i> , em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.	99

Figura 58 :: Comprimento das raízes de plântulas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de germinação.	100
Figura 59 : Plântulas de <i>Inga laurina</i> no tratamento com 0 e 300 mgL ⁻¹ Fe ₂ O ₃ NPs, após 30 Dias de crescimento em casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano.....	101
Figura 60 : Absorção de fluorescência de plântulas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de Fe ₂ O ₃ NPs.....	102
Figura 61 : Teor de Clorofila <i>a</i> de <i>Ingá Laurina</i> , após 30 dias de Plantio - Fe ₂ O ₃ NPs nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹	103
Figura 62 : Teor de Clorofila <i>a,b</i> e carotenóides de plantas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de nanopartículas de ferro Fe ₂ O ₃ NPs.....	103
Figura 63 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro (<i>Fm_iss</i>) no período de 24 a 168h, após a imersão em A) 0 mgL ⁻¹ (Controle); B) 50 mgL ⁻¹ e C) 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.	105
Figura 64 : Parâmetro Fluorescência máxima no último pulso saturante (<i>Fm_iss</i>) das sementes de <i>Inga laurina</i> submetidas no período de germinação com concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.	106
Figura 65 : <i>Fm_iss</i> de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	107
Figura 66 : Parâmetro <i>Fm_iss</i> , média de 10 plantas jovens de <i>Inga laurina</i> , em função do tempo, 30 dias após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	108
Figura 67 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em plântulas de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro (<i>Fm_iss</i>) , 30 dias após a imersão em 0, 50 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	109
Figura 68 : Imagem de emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> em sementes de <i>Inga laurina</i> para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica <i>Fv/Fm</i> : (A) 0 mgL ⁻¹ , (B) 50 mgL ⁻¹ de ZnONPs, e (C) 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	109
Figura 69 : <i>Qy_max</i> - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05; n = 10).....	110
Figura 70 : Parâmetro de rendimento fotoquímico (<i>Qy_max</i>) das sementes de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONP, durante o período de germinação.....	111
Figura 71 : Parâmetro de rendimento fotoquímico (<i>Qy_max</i>) das plântulas de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONP, após 30 dias de plantio.....	112
Figura 72 : Valores médios do <i>quenching</i> não-fotoquímico (<i>NPQ_Lss</i>), das sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo para as concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de nanopartículas de zinco ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05; n = 10).....	114

Figura 73 : <i>NPQ_Lss</i> - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.	115
Figura 74 : Valores médios do <i>quenching</i> não-fotoquímico (<i>NPQ_Lss</i>) de pântulas de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	115
Figura 75 : Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionaria ao longo do tempo da média de 10 sementes de <i>Inga laurina</i> em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	117
Figura 76 : Razão F685/F735 em função da concentração de ZnONPs, com excitação em 405 nm, em 168h de germinação (7 Dias).....	117
Figura 77 : Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionaria ao longo do tempo da média de plântulas de <i>Inga laurina</i> , em função da concentração, decorridos 30 dias de exposição a ZnONPs..	118
Figura 78 : Análise de razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila <i>a</i> , após 30 dias de exposição com ZnONPS.....	119
Figura 79 : Análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05, n = 10).....	120
Figura 80 : Análises dos valores médios da temperatura superficial das plântulas de <i>Inga laurina</i> em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	121
Figura 81 : Imagem do último dia de germinação 168h de sementes de <i>Inga laurina</i> para concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs. Foto: Daniela Graciano.....	122
Figura 82 : Comprimento da raiz (CR), após 168h do período de embebição das sementes de <i>Inga laurina</i> , em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.	123
Figura 83 : Sementes germinadas de <i>Inga laurina</i> , após 168h de embebição nas soluções de ZnONPs com concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹	123
Figura 84 :Comprimento das raízes após 30 dias de embebição das sementes de <i>Inga laurina</i> , em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	124
Figura 85 : Plantas de <i>Inga laurina</i> no tratamento com 300 mgL ⁻¹ ZnONPs, após 30 Dias de crescimento em casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano.....	125
Figura 86 : Absorção de fluorescência de plantas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	125
Figura 87 : Teor de Clorofila <i>a</i> de plantas de <i>Inga laurina</i> após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL ⁻¹ de ZnONPs.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEF- Fluxo cíclico de elétrons

Chl – Clorofila

Chl-*a* - Clorofila *a*

CR - Comprimento da raiz

CTE - Cadeia de Transporte de Elétrons

Cu – Cobre

CuONPs – Nanopartículas de óxido de cobre (II)

Fq'/Fm' - Eficiência de operação do PSII Adaptado à Luz

Fe- Ferro

Fe₂O₃NPs- Nanopartículas de óxido de Ferro (III)

FSI - Fotossistema I

FSII - Fotossistema II

Fv/Fm - Eficiência Máxima do PSII Adaptado ao Escuro

Fv'/Fm' - Eficiência Máxima do PSII Adaptado à Luz

H⁺ - Prótons de Hidrogênio

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HO₂ - Radical Hidroperoxila

LHC- Complexo coletor de luz

NMs - Nanomateriais

NPQ_Lss – Non-photochemical quenching/Supressão não fotoquímica

NPs - Nanopartículas

O₂ - Oxigênio molecular

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singleto

OH - Radical Hidroxila

PDI – Índice de polidispersão

Pmf- Força motriz de prótons

RC- Centro de reação

ROS - Reactive Oxygen Species/ Espécies reativas de oxigênio

Ts - Temperatura Superficial

UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados

UV-Vis- Ultravioleta e Visível

ZnONPs - Nanopartículas de óxido de Zinco

Zn – Zinco

ROS- Reactive Oxygen Species/ Espécies reativas ao oxigênio

UFGD- Universidade Federal da Grande Dourados

UV-Vis- Ultravioleta e Visível

ZnNPs- Nanopartículas de Zinco

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Históricos das questões ambientais, legislação e aplicação dos nanomateriais na indústria.

Com o progresso da humanidade vivenciado a partir do final do século XVIII, principalmente devido à descoberta de energia a vapor, deu-se o início da transição de métodos de produção que antes eram manuais para os métodos industriais, caracterizado pela produção em alta escala com o auxílio de máquinas. Todavia, associado aos avanços tecnológicos, observou-se também maior interferência humana sobre o funcionamento natural do meio ambiente, resultando em desastres ambientais.

Um dos primeiros desastres a chamar atenção mundial foi à destruição atômica em Hiroshima e Nagasaki, no Japão, que culminou na morte de pelo menos 150 mil japoneses, deixando o ambiente local radioativo por décadas. Outra tragédia nuclear, a explosão de um reator na usina de Chernobyl, na Ucrânia, em 1986, tirou a vida de 10 mil pessoas, além de afetar milhares de quilômetros de florestas. No Brasil, em 2015 no estado de Minas Gerais, chamado de caso de “Mariana”, com a ruptura de uma barragem de beneficiamento de minério de ferro; o efluente e a lama fizeram desaparecer cidades, rios e uma parte da biodiversidade do local foi dizimada, os efeitos dos contaminantes ao meio ambiente e aos seres humanos serão ainda observados em longo prazo, por muitos e muitos anos.

A legislação brasileira referente às questões ambientais, tem sofrido alterações desde o Brasil Império, no sentido de atender às demandas da sociedade, a partir do final da década de 20, surgiu uma legislação ambiental mais completa, embora o meio ambiente tenha continuado a ser compreendido de forma restrita. A partir da década de 60 começa a segunda etapa da fase setorial, que é marcada pela edição de normas com maiores referências às questões ambientais propriamente ditas do que as da fase anterior. Entre os textos legislativos mais importantes se destacam o Estatuto da Terra ou Lei nº 4.504/64, o Código Florestal ou Lei nº 4.771/65, a Lei de Proteção à Fauna ou Lei nº 5.197/67, o Código de Pesca ou Decreto-lei nº 221/67 e o Código de Mineração ou Decreto-lei nº 227/67.

Na década de 80 a Lei nº 6.938/81, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, é o primeiro grande marco em termos de norma de proteção ambiental no Brasil. Essa legislação definiu de forma avançada e inovadora os conceitos, princípios, objetivos e instrumentos para a defesa do meio ambiente, além de reconhecer importância deste, para a vida e para a qualidade de vida. Recentemente no Brasil foi instituída a Lei Federal, que

dispões sobre a Política Nacional Resíduo Sólido: PNRS, *que instituiu a obrigatoriedade em se elaborar o Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos/PGRS, “que estabelece os princípios básicos da minimização da geração de resíduos, identificando e descrevendo as ações relativas ao seu manejo adequado, levando em consideração os aspectos referentes a todas as etapas, compreendidas pela geração, segregação, acondicionamento, identificação, coleta, transporte interno, armazenamento temporário, tratamento interno, armazenamento externo, coleta e transporte externo, tratamento externo e disposição final devidamente licenciado pelo órgão ambiental competente”.* (PNRS – 12.305/2010)

Atualmente quem normatiza a quantidade de efluentes, provindos de empresas e indústrias é o Conselho Nacional do Meio Ambiente, por meio da resolução CONAMA 357/2005 alterada pela CONAMA 430/2011, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Para tal, parâmetros são estabelecidos regulamentando os valores máximos de efluente contaminado que pode ser despejado em corpos d’água, conforme apresentado na Figura 1.

TABELA 1 - CLASSE 1 - AGUAS DOÇES	
PADRÕES	
PARÂMETROS	VALOR MÁXIMO
Clorofila <i>a</i>	10 µg/L
Densidade de cianobactérias	20.000 cel/mL ou 2 mm ³ /L
Sólidos dissolvidos totais	500 mg/L
PARAMETROS INORGANICOS	VALOR MÁXIMO
Alumínio dissolvido	0,1 mg/L Al
Antimônio	0,005mg/L Sb
Arsênio total	0,01 mg/L As
Bário total	0,7 mg/L Ba
Berílio total	0,04 mg/L Be
Boro total	0,5 mg/L B
Cádmio total	0,001 mg/L Cd
Chumbo total	0,01mg/L Pb
Cianeto livre	0,005 mg/L CN
Cloreto total	250 mg/L Cl
Cloro residual total (combinado + livre)	0,01 mg/L Cl
Cobalto total	0,05 mg/L Co
Cobre dissolvido	0,009 mg/L Cu
Cromo total	0,05 mg/L Cr
Ferro dissolvido	0,3 mg/L Fe
Fluoreto total	1,4 mg/L F
Fósforo total (ambiente lântico)	0,020 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico)	0,025 mg/L P

Figura 1: Tabela de classificação máxima de efluentes em corpos d'água, limites de classe dos parâmetros monitorados. (RESOLUÇÃO 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005). Fonte: Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

A despeito da evolução normativa, a legislação brasileira ainda é carente da definição de parâmetros que identifiquem elementos contaminantes cada vez mais comuns nos processos industriais modernos. Em qualquer avaliação da qualidade de água e efluentes contaminados, com base nos parâmetros vigentes, só serão detectadas as macropartículas, até o momento, não existe no Brasil a legislação vigente com parâmetros que incorporem valores máximos e mínimos de nanopartículas (NPs) ou nanomateriais (NMs), utilizados na indústria e descartados no meio ambiente.

O avanço tecnológico na sociedade moderna nos apresenta o desafio de, por meio dos estudos científicos, gerar dados e informações que amparem a evolução normativa e de legislação para regulação das aplicações de nanomateriais (NPs), utilizadas na indústria bem como parâmetro máximo de seu descarte no meio ambiente. A nanociência constitui um emergente e interdisciplinar campo científico que lida com o desenvolvimento de métodos para preparação de partículas manométricas de um determinado material (como por exemplo: um polímero, um metal ou um semicondutor). São classificados como nanomateriais, materiais com dimensões inferiores ordem de 10^{-9} m, sendo possível detectá-los somente com auxílio de microscópios eletrônicos de alta resolução (ZARBIN et al., 2007).

A comunidade científica tem demonstrado que as nanopartículas (NPs) são quimicamente mais reativas, possuem maior acesso aos organismos biológicos, maior biodisponibilidade e maior bioatividade quando comparadas às partículas de mesma composição química em suas dimensões a granel (bulk). Sendo assim, em contato com o ambiente, as NPs podem interagir e impactar diferentemente os organismos vivos e ainda, se forem biopersistentes, podem acumular-se em órgãos vitais como pulmões e cérebro, causando danos aos organismos (FADEEL et al., 2012); (CASCIANO et al., 2009). Por ser uma área nova do conhecimento e devida à falta de regulamentação, questões essenciais ainda não foram respondidas tais como: Qual o nível de exposição às nanopartículas que a humanidade está sujeita? Quais níveis de exposição são prejudiciais à saúde e ao ambiente ou se podem se acumular ao longo da cadeia alimentar? (BOUWMEESTER et al., 2009).

A nanotecnologia é revolucionária, aplicável em diversos setores e possui potencial para beneficiar a saúde humana e o ambiente, porém é necessário considerar os riscos e

impactos que a produção, uso e descarte das NPs utilizadas em algumas dessas tecnologias podem causar no ambiente e aos organismos (CARNIEL et al., 2013). A possível interação com ecossistemas e organismos deve-se ao fato de produtos comerciais liberarem para o ambiente este material, como exemplo, a utilização de nanopartículas de prata (AgNPs) no setor têxtil, ou nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂NPs) em cosméticos (JOVANOVIĆ et al., 2015).

Os metais pesados, tanto os de conhecida função biológica quanto os de desconhecida função biológica, podem apresentar alta toxicidade a biota, em especial quando encontrado em altas concentrações (ESTEVES et al., 1998). Botelho sugere uma classificação para os metais pesados em críticos e não críticos, sendo estes últimos micronutrientes (BOTELHO, 2003). Estudos realizados indicam que as plantas aquáticas possuem certa tolerância a metais, como foi demonstrado pelo Lírio aquático (*Nymphaea ampla*), que apresentou uma elevada taxa de crescimento e importante capacidade de absorver metais pesados pelo seu sistema radicial (ALVAREZ et al., 2004). De modo geral, os vegetais são uns dos organismos potencialmente expostos às NPs, e ao considerarmos o potencial acúmulo e não biodegradabilidade das NPs, fica evidente a possibilidade da biomagnificação das NPs ao longo da cadeia alimentar. Isso se deve pelo fato das plantas constituírem a base da cadeia alimentar, uma vez que produzem e acumulam os fotoassimilados, constituindo em alimento dos seres consumidores primários, os herbívoros, estes por sua vez, servem de alimentos aos consumidores de segunda ordem.

Além da relevância de entender os potenciais impactos das NPs sobre as plantas, quanto às relações tróficas, merece destaque também o potencial uso dos vegetais como bioindicadores no processo de avaliação da contaminação ambiental induzida pelas NPs, por meio da avaliação das respostas de sensibilidade em função da composição química, tamanho e/ou concentração das NPs. Dessa forma, os estudos realizados até hoje devem ser considerados como modelo de predição de risco, pois, no nível de exposição a que a humanidade está sujeita atualmente, esses resultados não seriam, ainda, observáveis naturalmente (BRAYNER et al., 2013).

1.2 Impacto ambiental e estudos de plantas como bioindicadores ambientais

Chama-se de impacto ambiental qualquer alteração da qualidade ambiental que resulta da modificação de processos naturais ou sociais provocados por ação humana (Sanchez, 2006). Segundo Resolução CONAMA n°. 1/86, *define-se como impacto ambiental: “Qualquer alteração das propriedades físicas, químicas ou biológicas do meio ambiente, causada por*

qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas, que direta ou indiretamente afetam: a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; e a qualidade dos recursos ambientais” (CONAMA n.º 1/86) ”.

A determinação das alterações das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente é mensurada por meio de análises analíticas e/ou de indicadores ambientais. O impacto ambiental pode ser positivo ou negativo. No primeiro caso, a alteração representa em benefícios ou em ganhos para o ecossistema, podendo o impacto ser exemplificado por ações de reflorestamento de áreas suscetíveis à erosão; recomposição de vegetação ciliar; lançamento de efluentes adequadamente tratados, nos cursos d'água; repovoamento de rios e córregos, entre outros. No segundo caso pode um agente contaminante dizimar toda ou parte da biodiversidade local (GOMES et al., 2002). Os impactos causados pelo lançamento de cargas poluidoras e os cenários de intervenção são alvos de interesse para estudo de plantas que são capazes de remover, imobilizar ou tornar inofensivos ao ecossistema, contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no solo e/ou na água (ANDRADE et al., 2007).

Os animais e os vegetais podem atuar como importantes aliados do homem e da natureza como indicadores de qualidade ambiental, podendo servir como parâmetro de referência para avaliação das modificações ocorridas no meio ambiente, mostrando quando ele está contaminado ou sendo destruído. Por exemplo, uma avaliação detalhada do comportamento dos vegetais e/ou animais pode indicar a presença de produtos tóxicos no solo, na água ou no ar (MORAIS et al., 1999). Por tanto, os bioindicadores ou indicadores ambientais são uma ferramenta na avaliação da integridade ecológica, sendo assim a “condição de saúde” de uma área, definida pela comparação da estrutura e função de uma comunidade biológica entre uma área impactada e áreas de referência (ANDRADE et al., 2010).

Nos últimos 20 anos, a bioindicação tem implicado em sistemas de medição particularmente importante; a fonte de informação bioindicativa é considerada um dos pilares do monitoramento ambiental moderno, uma vez que fornece informações sobre os sistemas biológicos, tornando possível a avaliação de áreas inteiras, além da sua dinâmica (MARKERT et al., 2003). O uso dos bioindicadores representa vantagens sobre os métodos convencionais de avaliação da qualidade ambiental, visto que são de baixo custo e ainda possibilitam uma avaliação cumulativa de eventos ocorridos num determinado período, resgatando um histórico

ambiental não passível de detecção ou medição por outros métodos. No processo de descarte de efluentes as interações entre os elementos afetam desde o processo que ocorrem no solo ou corpo d'água, além daqueles relacionados à interação organismo/contaminante, como o contato do efluente com as células da raiz, absorção, transporte, redistribuição e metabolismo dos compostos. Ainda que potencialmente lesivos as plantas, compostos mineralizados são fundamentais ao desenvolvimento vegetal

A disponibilidade de nutrientes para as plantas é afetada por diversas reações de natureza física, química e biológica. Vários mecanismos estão envolvidos, dentre eles as interações iônicas, cujo efeito pode refletir na composição mineral da planta (SILVA e TREVIZAM, 2015). Segundo Prado, apesar do processo de absorção de nutrientes ser específico e seletivo; existe certa competição entre eles, podendo ser favorável (sinérgica), quando um íon auxilia a absorção do outro, ou desfavorável (antagônica), quando a absorção de um íon é prejudicada pela presença do outro (PRADO, 2008). Marschner também afirma que essa competição é influenciada pelas propriedades do transporte e pela diferença da concentração dos íons (MARSCHNER et al., 2012). Em estudos agrônômicos de interações plantas e metais foi observado que o excesso de Zinco (Zn) reduziu a translocação de Ferro (Fe) para as partes aéreas da soja. A presença de Zn inibe o metabolismo de Fe, assim demonstrando que em casos severos, se caracteriza por quedas de níveis de clorofila, deixando folhas totalmente cloróticas e posteriormente esbranquiçadas, acentuando o atraso no crescimento da planta (SILVA e TREVIZAM, 2014). Também foi determinado que baixas concentrações de Zn na planta deixa a mesma susceptível ao acúmulo de altas concentrações de Cádmi (Cd), indicando que o Zn em concentrações normais evita absorção de altas concentrações de Cd, e conseqüentemente, protege as plantas contra a toxicidade do Cd. Esse efeito é atribuindo as interações competitivas entre Zn e Cd devido a existência de um sistema de transporte comum nas membranas celulares (KÖLELI et al., 2004).

Sintomas de estresse pelo excesso de Cu são descritas como alterações na tonalidade das folhas, tornando-as verde-azuladas e enroladas onde aparecem cloroses intervenais e necrose, sendo a deficiência igualmente evidenciada pelo enrolamento das pontas das folhas mais novas e mesmo pela visualização de anomalias no crescimento das plantas (Brito, 2006). A deficiência de Cu induz a perda de água, podendo ocorrer estresse hídrico em condições normais de suprimento de água (BONNER e GLASTON, 1967). Nas plantas, o Zn e o Cu são componentes das enzimas, sendo necessários para a formação de substâncias que promovem o crescimento vegetal (MILLAR et al., et al, 1975).

Segundo Brito, o Zn participa como constituinte funcionais, dentre outras, das enzimas como: a desidrogenase, anidrase carbônica, RNA polimerase e álcool desidrogenase (BRITO et al., 2006). A sua carência provoca o surgimento de manchas generalizadas de crescimento rápido, comumente nas zonas internevais, eventualmente invadem as nervuras secundárias e mesmo as principais, ocorrendo microfilia, formação de folhas pequenas (BONNER et al., 1967). Consequentemente, um suprimento deficiente de Zn produz, primeiramente nas regiões mais jovens das plantas, uma redução do crescimento vegetal, impedindo o alongamento dos caules, a microfilia e expansão foliar e interfere na frutificação e manchas em folhas cítricas (BRITO et al., 2006).

Ainda que muitos estudos sobre fisiologia nutricional em plantas descrevam os efeitos dos elementos minerais, pouco se sabe sobre as interações e impactos desses elementos químicos quando em dimensões nanométricas, assim como suas rotas e distribuição nas plantas. Alguns estudos revelaram que as NPs de ouro (AuNPs) induzem supressão de fluorescência da clorofila a (Chl-*a*) e que a alteração depende do tamanho de partícula e concentração (FALCO et al., 2012). Este fenômeno é principalmente atribuído ao efeito da transferência de elétrons por meio de fotoindução de elétrons das moléculas de clorofila para a superfície das AuNPs, resultando em um decréscimo do sinal de fluorescência da clorofila. Queiroz e colaboradores também relataram que NPs de prata (AgNPs) induzem efeitos semelhantes (QUEIROZ et al; 2016). Adicionalmente, eles também mostraram que as AgNPs quando associada a clorofila-*a* reduz o tempo de vida do elétron no estado excitado da molécula de clorofila. Além disso, a interação de Chl-*a*/AgNPs foi dependente do tamanho e concentração das AgNPs. Em outro estudo Falco et al. demonstraram que a interação da clorofila com as AgNPs é fortemente afetada pela NPs, sugerindo que fluorescência da Chl-*a* tem um grande potencial para ser usado como ferramenta analítica para monitorar a interação de plantas e NPs, e seus efeitos em plantas (FALCO et al., 2015).

Devido ao rápido crescimento do uso de nanomateriais em produtos comerciais, torna-se importante avaliar a sua toxicidade tanto para o meio ambiente quanto para o ser humano, pois, sendo partículas não biodegradáveis e extremamente pequenas, a capacidade de deslocamento por todo o meio ambiente é considerável, o que as tornam disponíveis tanto na atmosfera, no meio aquático, bem como no solo (PASCHOALINO et al, 2010).

1.3 Nanopartículas:

1.3.1 Estudos sobre sua interação com organismos, tecidos ou células; características e propriedades

Dentre as várias aplicações, destaca-se o uso de nanocompósitos e os filmes ultrafinos de polímeros semicondutores aplicados para a produção de células solares de alta eficiência; dispositivos emissores de luz baseados em quantum dots; nanocatalisadores; nanotubos de carbono usados em pilhas e super capacitores, além de outros nanomateriais aplicados em sistemas robustos de armazenamento de hidrogênio bem como em distribuição mais eficiente de energia (SALAMANCA et al., 2015; HUSSEIN et al., 2015; JULIEN et al., 2016). Na medicina os avanços que a nanotecnologia poderá fornecer são ainda maiores, tanto no diagnóstico de doenças quanto no seu tratamento. Distúrbios graves como câncer, AIDS, doenças neuro degenerativas, doenças autoimunes e genéticas poderão ser combatidas por nanodrogas e nanodispositivos produzidos a partir de nanofios, quantum dots, nanoshells, NPs de ouro, nanotubos de carbono, NPs magnéticas e nanogéis (MALINOSKI et al., 2014; SALAMANCA et al., 2015; MISHRA et al., 2016).

Tais avanços na nanociência e nanotecnologia têm levado ao desenvolvimento de uma grande quantidade de novos produtos que possuem NPs em sua formulação e, conseqüentemente, está induzindo um aumento significativo na produção de diversos tipos de NPs. Dentre vasta gama de materiais, a Ag e o Cu, em dimensões nanométricas, tem recebido atenção especial, em grande parte, devido aos seus efeitos antimicrobianos (GUERRA et al., 2013).

As NPs, embora sendo composta pelo mesmo elemento químico, comportam-se de forma distinta em relação às partículas em suas dimensões à granel (bulk), em termos de propriedades químicas e físicas, bem como de sua interação com sistemas biológicos. Portanto, o tamanho da partícula é de suma importância em relação aos efeitos que podem produzir, porque quando em dimensões nanométricas, a área efetiva disponível é consideravelmente aumentada (i.e., aumento da relação da área superficial versus volume da partícula), mudando a natureza das forças de interações entre as moléculas e o material e assim, alterando os impactos que estes processos ou produtos nanotecnológicos podem causar ao meio ambiente, à saúde humana e à sociedade no geral (BOUWMEERTER et al., 2009).

A utilização de materiais com dimensões nanométricas em produtos comerciais tem levantado a questão da segurança dos seres humanos e do meio ambiente, pelo fato de sua utilização e comercialização terem precedido um marco regulatório sobre o uso, armazenamento e descarte dos nanomateriais (NMs). Portanto, devido ao seu tamanho reduzido e suas características distintas quando comparadas aos materiais em dimensões de bulk (material a granel em dimensões macro ou microscópica), as NMs têm a capacidade de interagir com diferentes organismos por meio de vários mecanismos muito dos quais pouco conhecidos (HULLA et al., 2015). O aumento da utilização de NMs em produtos de consumo pode tornar-se uma ameaça, especialmente porque o seu descarte e acúmulo no meio ambiente poderá interferir em processos bióticos e abióticos (DWIVEDI et al., 2015).

O elemento Cu em dimensões nanométricas, por exemplo, pode ser assimilado por células cerebrais, podendo ter efeitos tóxicos devido à aceleração na formação de espécies reativas de oxigênio in situ (BULKE et al., 2013). O Cu é um dos elementos vestigiais necessários nos organismos, mas pode causar toxicidade uma vez que exceder o limite de tolerância fisiológica in vivo. Por conseguinte, devido aos potenciais efeitos nocivos na saúde, a toxicidade das nanopartículas de cobre (CuNPs), bem como das nanopartículas de óxidos de cobre (CuONPs), têm gerado preocupações no meio científico (WANG et al., 2015).

Estudos recentes têm demonstrado a toxicidade de CuONPs quanto a sua utilização em pesticidas, na área da agricultura, e antibióticos na medicina (ZABRIESKI et al., 2015). Estudos realizados em biota aquática indica a toxicidade das CuNPs nestes ambientes, provocando morte celular em algas (ADAM et al., 2015). Outro estudo também aponta para a toxicidade de CuNPs em peixes, na qual pesquisadores puderam observar alterações morfológicas nas brânquias das espécies estudadas (SONG et al., 2015). Ainda abordando ambientes aquáticos, outro estudo aponta que crustáceos também são sensíveis à presença de CuNPs (MANUSADZIANAS et al., 2012). Além disso, esse mesmo estudo indicou que a toxicidade destas NPs é aumentada quando em forma de íons (MANUSADZIANAS et al., 2012).

De modo geral, o Zn está associado a síntese de carboidratos, a integridade da membrana e proteínas envolvidas na replicação do DNA e expressão de genes, além de executar função estrutural e catalítica em enzimas como superóxido dismutase, álcool desidrogenase e anidrase carbônica (BROADLEY et al., 2012). Lin e Xing expuseram sementes de canola, rabanete, azevém, alface, milho e pepino à NPs de óxido de Zn

(ZnONPs), concluindo que todas as espécies vegetais apresentaram inibição na germinação das sementes e no crescimento da raiz (LIN & XING, 2007). Mortimer, realizou teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, encontrando alta toxicidade para a exposição ao ZnO, tanto em forma nanométrica quanto em forma de bulk (macrométrica) (MORTIMER et. al., 2008). Em microcrustáceo *Daphnia magna*, Adam e colaboradores demonstraram que esse organismo, quando exposto por um período de 10 dias a concentrações subletais de ZnONPs, consegue regular rapidamente a quantidade interna de Zn. O mesmo ocorre quando, subsequentemente, esse mesmo organismo é transferido para um meio sem o contaminante (Adam et al., 2015). Já os possíveis efeitos causados pela exposição de NPZnO às células epidérmicas humanas são citotoxicidade, estresse oxidativo e possível peroxidação lipídica (SHARMA et al., 2009).

O Fe apesar de ser um elemento essencial e de participar da síntese de diversos componentes do aparato fotossintético (BRIAT e LOBRÉAUX, 1997; BRIAT et al., 2015), quando em excesso nos tecidos das plantas pode desencadear estresse oxidativo, de maneira a aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BECANA et al., 1998; FANG et al., 2001; SOUZA-SANTOS et al., 2001). Uma vez que os íons de ferro (Fe^{+2}) encontram-se em excesso na célula, os mesmos possuem a capacidade de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à radical hidroxila ($*OH$), que apresenta alta reatividade, podendo danificar o DNA da célula, e promover a oxidação tanto de lipídeos quanto de proteínas, provocando danos aos tecidos das plantas (BECANA et al., 1998; TSAI e HUANG, 2006). Alguns estudos toxicológicos utilizando plantas demonstraram os possíveis efeitos das NPs óxido de Fe (Fe_2O_3 NPs) sobre as mesmas.

Em estudo realizado com rabanete (*Raphanus sativus*) foi observada um comprometimento no desenvolvimento da cultura devido à adsorção das NPs na semente e à liberação de íons livres de ferro Fe^{+2} (ZUVERZA-MENA et al., 2017); já em estudos realizados com tomates (*Solanumlyco persicum*), expostos a 100 mgL^{-1} de Fe_2O_3 NPs, foi observado estresse hídrico e também processo de oxidação com formação de EROs, devido à agregação das NPs nas raízes (MARTÍNEZ-FENÁNDEZ et al., 2016).

Um aspecto de vital importância na avaliação dos potenciais riscos associados às NPs é compreender as interações entre NPs e o metabolismo de plantas. A literatura mostra que as NPs são capazes de penetrar em tecidos vivos de plantas e migrar para diferentes regiões da planta podendo ser absorvidas pelas raízes das plantas e transportadas para a parte aérea

através dos sistemas vasculares, dependendo da composição, forma, tamanho da NPs e da anatomia vegetal (FEICHTMEIER et al., 2015). Ademais, é sabido que NPs podem ser transferidas pela cadeia alimentar acarretando uma magnificação trófica (JUDY et al., 2011).

1.4 Espécie selecionada para o estudo e sua importância

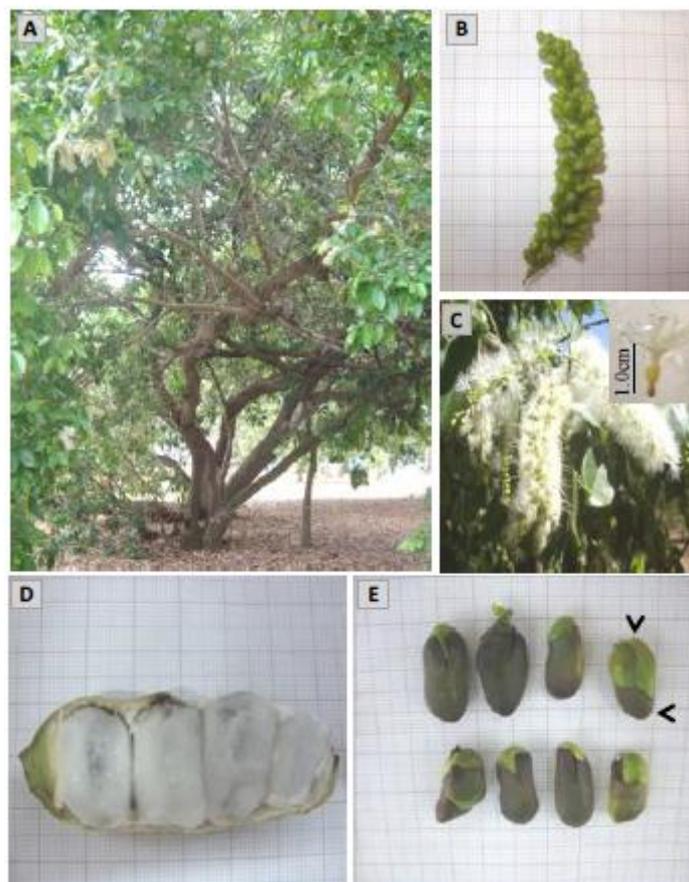


Figura 2: *Inga laurina* Sw. (Willd). A- Hábito. B. Botões em pré antese. C. Inflorescência em espiga. D. Fruto aberto com presença de quatro sementes envolvida pela sarcotesta. E. Sementes poliembrioadas, removida sarcotesta (setas: embriões), (VIEIRA, 2015).

A espécie *Inga laurina* (Sw.) Willd, ocorre desde América Central até América do Sul, está presente nos biomas do Cerrado, Floresta Amazônica, formações florestais do domínio de mata atlântica e restinga, em fitofisionomias campestres e floresta ciliar. (FILARDIL, et al., 2007). O ingá é uma arbórea nativa da família Fabaceae (Mimosoideae), de ocorrência nas florestas tropicais, matas ciliares e ambientes periodicamente inundados.

O termo ingá se originou do tupi, que significa embebido, empapado, ensopado; por causa da consistência de sua polpa. Caracteriza-se por sua abrangência em diversos países e no Brasil é frequente desde Nordeste, Sul e Sudeste, sendo utilizada na arborização,

recuperação de áreas degradadas e no sombreamento da cultura do café. (PENNINGTON et al., 1997; GARCIA et al., 1998). Arbórea de porte médio (10-20m), três ou quatro pares de folhas pontudas, opostas; o caule, junto de cada folha, é alado, em forma de coração; assim também são as outras espécies. O fruto é uma síliqua fabácea chata, amarela, medindo dois três ou quatro dedos de comprimento, contendo quatro, cinco, seis ou mais sementes transversais; estas sementes são cobertas por uma polpa nívea, como seda (holoseria), um tanto fria de sabor agradabilíssimo, que espontaneamente se separa uma da outra, conforme o número dos grãos; costuma-se tirar essa polpa com os dentes e come-la, mas não a semente; a semente é mínima, olivácea oblonga, divisível em duas partes, no sentido longitudinal” (MARCGRAV et al., 1942), como mostrado na Figura 2.

A propagação da espécie ocorre por meio de sementes, com dispersão, também, pela água. Sua utilização dentro de programas de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento dependem diretamente da manipulação adequada das sementes e, portanto, dos cuidados observados no período pós-maturidade. Apesar de pouco pesquisadas, os estudos preliminares indicam que as sementes apresentam comportamento recalcitrante, ou seja, sensíveis à desidratação e com baixa longevidade. (CARNIEL et al., 1998).

A germinação de sementes consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma sequência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo se dá pela absorção de água pelas sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário (BEWLEY e BLACK, 1994). A embebição é fundamental para a germinação porque permite a retomada da atividade metabólica, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento subsequente (MARCOS FILHO et al., 2005).

A velocidade de embebição depende das características de cada espécie, dentre as quais a composição química e da permeabilidade do tegumento. Porém existem várias espécies que se diferenciam pelo tamanho do fruto, outras pelo tamanho e tipo dos nectários foliares, ou são utilizadas várias características morfológicas para diferenciar a espécie.

Por ser uma espécie que não possui dormência em sua semente sendo estas sensíveis a alterações do meio, evidencia-se seu potencial como bioindicadora de contaminação ambiental, pois sofrem alterações morfológicas, fisiológicas, genéticas e etológicas, podendo auxiliar na detecção de estresse causado por cargas poluidoras. Estudos com a família

Fabaceae (Mimosoideae) destacam o papel destas como bioindicadores ambientais de poluição atmosférica. (CARNEIRO et al., 2004).

Outros protocolos de plantas bioindicadores começam a ser estudados, dado a sua relevância para o estudo de poluição ambiental. Também merece destaque o fato das sementes de *Inga laurina* apresentarem o embrião verde devido aos altos teores de clorofilas nas sementes maduras, sendo a clorofila um fluoróforo, as sementes das espécies deste gênero podem se constituir em excelente material para se aferir efeitos de estressores por meio das técnicas de fluorescência da clorofila-*a* (Chl-*a*).

Embora esta espécie seja parte importante da flora brasileira, ainda são insuficientes os conhecimentos sobre sua constituição química (MACEDO et al., 2007). Lokvam e colaboradores isolaram galoil depsídeos de tirosina (20-22-23) e flavonoide miricetina 3-O- α (2''-O-galoil); ramnosídeo (23), a partir de folhas jovens, conforme apresentado na Figura 3 (LOKVAM et al., 2007). Outros autores identificaram ácido ascórbico (24) em folhas jovens de *Inga laurina* (MILTON & JENNES, 1987). Os compostos fenólicos são derivados da via bioquímica do ácido chiquímico ou ácido mevalônico e de aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina (NACZK e SHAHIDI, 2004).

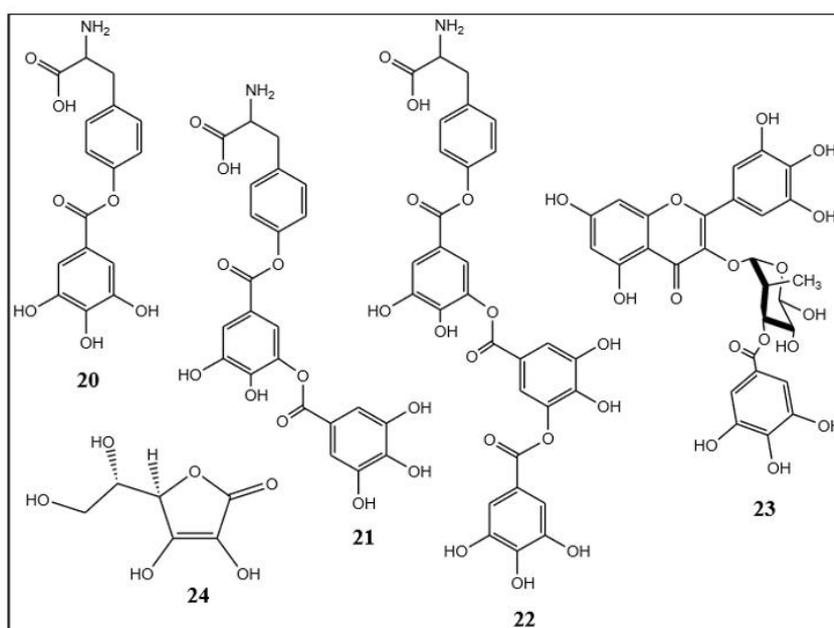


Figura 3: Estruturas metabólicas presentes em *Inga laurina*, Galoil tirosina (20); m-digaloil tirosina (21); m- trigaloil tirosina (22); miricetina 3-O- α (2''-O galoil); ramnosídeo (23); ácido arcórbico (24). Adaptado por (LOKVAM et al., 2007).

Muitos dos compostos fenólicos atuam como sequestradores de radicais livres enquanto outros agem como quelantes de metais catalisadores de reações de geração de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL et al., 2007; FLOEGEL et al., 2011), sendo capazes de retardarem ou inibirem a velocidade de oxidação das biomoléculas e, conseqüentemente, os danos oxidativos no organismo (HALLIWELL et al., 2007).

1.5 Fotossíntese e produção de NADPH, e ATP, a partir de energia quântica da luz

Conceitualmente, a fotossíntese é o processo no qual o CO₂ e a água são convertidos em carboidratos e oxigênio (WILHELM et al., 2011). Todavia, não se trata de uma reação química simples, o surgimento da reação consiste em um evento fotoquímico-biológico de extrema importância para a existência da vida na Terra (NELSON et al., 2013). De fato, atualmente a maioria dos organismos superiores é dependente de oxigênio, o qual é produzido pelas plantas, algas e cianobactérias por meio da fase fotoquímica da fotossíntese (MAMEDOV et al., 2015).

Essa importante etapa da fotossíntese consiste em um conjunto de reações biofísicas e bioquímicas, por meio das quais os organismos fotossintetizantes podem produzir poder redutor, especialmente na forma de NADPH, e ATP, a partir da absorção da luz (WILHELM et al., 2011). O poder redutor gerado nas etapas fotoquímicas é por sua vez empregado como fonte de energia para as fases metabólicas inerentes à sobrevivência do organismo, especialmente a assimilação de CO₂ (RUBAN et al., 2014). Em condições ótimas de crescimento, existe um equilíbrio entre a quantidade de energia capturada pelos fotossistemas e o consumo desta por meio da demanda metabólica celular (FOYER et al., 2012), entretanto, condições ótimas de crescimento são exceções na natureza (WILHELM et al., 2011).

Nos organismos eucariontes a fotossíntese ocorre em organelas denominadas cloroplastos. Esses plastídios especiais contêm por volta de 120 genes, os quais codificam proteínas do aparato fotossintético (JENSEN et al., 2014), além de possuírem toda uma gama de funções que incluem a síntese de aminoácidos, clorofila e vários lipídeos (ROBINSON et al., 2005). Os tilacoides possuem proteínas integrais de membrana que desempenham a função no transporte de elétrons (cadeia transportadora de elétrons), na produção de ATP e na geração de um gradiente de pH entre a região interna dos tilacoides (lúmen) e a parte externa (estroma) (FOYER et al., 2012).

O fotossistema II (FSII) se localiza nas lamelas granais, enquanto o fotossistema I (FSI) se localiza nas lamelas estromais e nas margens das lamelas (regiões onde não há empilhamento dos tilacoides). Como consequência dessa divisão espacial entre os fotossistemas existem proteínas carreadores que transportam os elétrons do FSII para o FSI, o que permite a regulação desse transporte (FOYER et al., 2012). A regulação do transporte de energia entre os fotossistemas permite que o fornecimento de ATP e NADPH a partir das membranas do tilacoides seja regulado de maneira precisa, de modo a permitir o uso otimizado do poder redutor pelo organismo, o que reduz a produção de oxigênio singlete no FSII e de superóxido no FSI (FOYER et al., 2012).

Os organismos fotoautotróficos tiveram que evoluir em complexas cascatas de transporte de energia, para tornar essa tarefa energeticamente possível e eficiente (RUBAN, 2012). Isso porque a remoção de elétrons da água requer um grande consumo de energia e pode gerar uma grande quantidade moléculas instáveis (SPETEA et al., 2014). A operação integrada entre absorção de luz, dissipação de energia e balanço entre a síntese de ATP e redutores compõem o cerne da regulação fotoquímica e suas respostas ao ambiente (FOYER et al., 2012). As reações da cadeia transportadora de elétrons do tilacóides que levam os elétrons do FSII ao FSI também são ligadas a passagem de prótons para o lúmen dos tilacóides, resultando em um gradiente de prótons (ΔpH) que é um dos componentes da força motriz de prótons (pmf, do inglês *proton motive force*) (YAMORI e SHIKANAI, 2016).

O pmf é formado por dois componentes, o gradiente de prótons (ΔpH) e o potencial de membrana ($\Delta\psi$) (YAMORI e SHIKANAI, 2016). A formação do pmf entre o lúmen do tilacoide e o estroma tem duas funções: (i) converter ADP e fosfato inorgânico (Pi) em ATP (FOYER et al., 2012); (ii) acidificar o lúmen do tilacoide, o que permite a ativação do mecanismo de dissipação de energia na forma de calor ou supressão não fotoquímica (NPQ, do inglês *non-photochemical quenching*).

As reações da fotossíntese podem ser divididas em duas etapas: a etapa oxidativa e a redutora. A etapa oxidativa ocorre nas membranas dos tilacoides e compreende o transporte linear de elétrons (LEF), necessário para a formação de NADPH e ATP, e o fluxo cíclico de elétrons (CEF), para formar apenas ATP. Posteriormente, a etapa redutora compreende as reações do ciclo de Calvin-Benson (região estromal), as quais consomem o poder redutor formado na etapa fotoquímica (NADPH e ATP) em um conjunto de reações bioquímicas

relacionadas à fixação do CO₂. Nas plantas, as reações da fase oxidativa ocorrem dentro das membranas dos tilacoides.

Essas reações são catalisadas por dois centros de reação (RC) independentes (PHUTHONG et al., 2015). O P700 é o RC localizado no complexo FSI e P680 está localizado no complexo FSII (GOVINDJEE, 2004; WIENTJES et al., 2009). Para realizar suas funções, ambos os RC devem estar associados a complexos coletores de luz (do inglês LHC) (PHUTHONG et al., 2015). Durante os processos da fase oxidativa, os sistemas envolvidos operam sobre os mais extremos potenciais redox (de +1,2V para -1,4 V). Proteínas expostas a extremos de potencial são suscetíveis a danos por oxidação, formação de radicais livres e/ou quebra de ligações químicas (NELSON, 2013). Acredita-se que os complexos que compõem a cadeia fotoquímica não têm como objetivo apenas aumentar a eficiência, mas também diminuir ao máximo os danos potenciais ao complexo (NELSON, 2015), por exemplo, incorporando moléculas dissipadoras de energia, como os pigmentos acessórios.

A literatura tem detalhado o aumento de Fluxo cíclico de elétrons (CEF) como uma estratégia benéfica para as plantas, pois permite que elas se protejam de danos oxidativos. O CEF pode ser dividido em duas rotas independentes. A rota PGR5-PGRL1 que leva os elétrons da ferredoxina para a plastoquina ou para o citocromo b6f. Alternativamente, a via NADP desidrogenase (NDH) é capaz de consumir os elétrons do NADPH para o *pool* de plastoquinonas. Ambas as rotas geram um gradiente de ΔpH com o complexo citocromo b6f. O ΔpH permite a síntese de ATP sem a produção de NADPH no cloroplasto (YAMORI et al., 2016). Os aspectos químicos e energéticos da estequiometria de produção de ATP pelo fluxo linear de elétrons ainda demandam mais estudos.

Há um consenso de que o transporte linear de elétrons (LEF) não gera ATP suficiente para que haja balanço adequado de ATP/NADPH no ciclo de Calvin (JOLIOT et al., 2011). Plantas de trigo sob condições de deficiência hídrica rapidamente geram um ΔpH que é promovido pelo CEF (ZIVCAK et al., 2014). Respostas similares foram encontradas em cevada, girassóis e alface sob diferentes tipos de estresse como seca, frio e deficiência de ferro (JOLIOT et al., 2011; TAKAHASHI et al., 2009; SEJIMA et al., 2014).

Plantas de *Arabidopsis thaliana* que sofreram silenciamento da via da PGR5 não foram capazes de reparar os danos oxidativos de estresses de alta luz (TAKAHASHI et al., 2009). Além disso, o silenciamento da PGR5 leva a uma queda na assimilação de CO₂ e a produção de biomassa (NISHIKAWA et al., 2012). Por outro lado, plantas de *Arabidopsis*

thaliana que foram silenciadas para a via NDH não mostraram perda de crescimento em condições favoráveis, todavia foram mais sensíveis a alguns estresses como alta luz (YAMORI et al., 2016). No entanto, alguns autores têm fornecido dado que sugerem a possibilidade da importância do CEF ser espécie/dependente e estresse/dependente.

1.6 Técnicas ópticas para estudo da fotossíntese e detecção de estresse de plantas

1.6.1 Fluorescência da clorofila *a*

Os índices relacionados à fluorescência da clorofila *a* (Chl-*a*) fornecem uma indicação da capacidade fotossintética da planta, o que é uma informação importante em estudos de estresse. De acordo com Ball e colaboradores o funcionamento do FSII implica em característica sensível para identificar estresse em plantas (BALL et al., 1994). Os fatores de estresse também estão relacionados à degradação da clorofila (HENDRY et al., 1993) e a emissão da fluorescência da Chl-*a* está intrinsicamente relacionada com a capacidade fotossintética das plantas (STRASSER et al., 2004; EULLAFFROY et al., 2009).

As relações entre as variáveis de Chl-*a* e o desempenho fotossintético são analisadas no contexto de aplicações das medições da fluorescência, para identificação de plantas com melhor desempenho fotossintético (BAKER, 2008; STIRBET e GOVINDJEE, 2011). Em tecidos verdes, a radiação fotossinteticamente ativa é absorvida pela clorofila e pigmentos acessórios do aparato proteína-clorofila *a/b* coletor de luz e migra para os centros de reação dos fotossistemas II e I, onde ocorre a conversão do quantum fotossintético. Com base neste conhecimento, a Fluorescência da Chl-*a* se constitui em importante técnica nos estudos ecofisiológicos de plantas. O rendimento da fluorescência da clorofila revela o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirige a fotossíntese. Esse nível depende do balanço entre irradiância no espectro de excitação e a soma da taxa de transporte de elétrons fotossintético e dissipação térmica, o que pode ser medido como supressão fotoquímico e não fotoquímico, respectivamente.

Os parâmetros instantâneos de (Fluorescência da clorofila-*a* (FChl-*a*), tais como F_0 (fluorescência inicial), F_m (fluorescência máxima) e seus derivados, F_v (diferença entre $F_m - F_0$), F_v/F_m (eficiência fotoquímica máxima do FSII) bem como as relações dos centros de reação, são passíveis de determinação em folhas intactas ou em células de cloroplastos. Aspectos funcionais do FSII revelam a efetividade da utilização da luz pela folha, à extensão

ou influência de fatores limitantes para a fotossíntese (além de luz), bem como inferências sobre a capacidade de ajuste ou expressão de respostas adaptativas nos organismos. A razão F_v/F_m tem mostrado ser um indicador confiável para a determinação e monitoramento diferentes tipos de estresses nas plantas. A *Chl-a*, in vivo, implica em método potente, não-destrutivo e rápido para detectar mudanças na atividade fotossintética de folhas devido a variação ambiental e a fatores de estresse natural e antropogênico (DURÃES et al., 2000).

O fluorímetro fornecem os valores de fluorescência inicial (F_o), máxima (F_m), variável (F_v) e a relação F_v/F_m bem como o índice de performance (IP) para as plantas adaptadas ao escuro. Todavia, a aplicação de um pulso de saturação sob iluminação actínica, fecha de forma transitória todos os centros de reações fornecendo um valor de fluorescência máxima no estado adaptado à luz, denominado F_m' , sendo este menor do que o valor F_m adaptado ao escuro devido à contribuição do NPQ (WANG et al., 2006).

Na fase da cinética em que a luz branca é incidida sobre a planta, há um rápido aumento da dissipação da energia na forma de calor, que é medido utilizando um parâmetro denominado dissipação não-fotoquímica (NPQ), que é obtido pelos parâmetros $F_m - F_m'$. É importante destacar que a intensidade da fluorescência máxima da planta na fase exposta à luz (F_m') será menor que a fluorescência máxima na fase adaptada ao escuro (F_m). Isso porque na fase clara, parte da energia está sendo consumida pelo NPQ, o que não acontece no primeiro pulso saturante, pelo fato de a planta estar totalmente adaptada ao escuro. Assim, o NPQ é também um importante parâmetro no estudo do aparato fotossintético das plantas, fornecendo informações sobre a dissipação de energia na forma não-fotoquímica (WANG et al., 2006; WANG et al., 2015).

Além da cinética de fluorescência da *Chl-a* obtida após pulsos de excitação, também é possível obter informações do status fisiológico das plantas a partir da análise da fluorescência da clorofila no estado estacionário, o que significa obter a emissão da *Chl-a* quando as plantas estão submetidas há um feixe de luz que mantém constante sua intensidade de excitação durante as medidas de fluorescência. Nessa situação, o espectro de fluorescência da clorofila é característico, e apresenta duas bandas de emissão, uma em aproximadamente 680 nm e outra, com menor intensidade, em torno 730 nm.

A intensidade de emissão, bem como a variação relativa da intensidade das bandas, a 680 e 730nm, podem ser utilizadas para monitorar as alterações no processo fotossintético. Por exemplo, à medida que se muda a concentração de clorofilas dos tecidos vegetais, espera-

se observar alterações nas intensidades de fluorescência, pois a emissão depende da quantidade de moléculas no meio que são capazes de absorver a radiação e fluorescer. Além disso, as duas bandas de emissão observadas com máximos em 685 e 735 nm, possuem diferentes contribuições do FSII e FSI.

A emissão em 685 nm advem das Chl-*a* presentes no FSII, enquanto a fluorescência em 735 nm tem contribuição das Chl-*a* dos FSI e FSII. Consequentemente, uma análise relativa entre as razões de emissão dessas duas bandas pode fornecer informações importantes sobre alterações do status fisiológico da planta (MISHRA et al., 2010).

1.6.2 Espectroscopia molecular de absorção no UV-Vis (Análise do extrato)

A espectroscopia UV-Vis implica na determinação do espectro de absorção da radiação eletromagnética nas regiões do visível (400-800 nm) e do ultravioleta (200-400 nm). Essa técnica é às vezes chamada de espectroscopia eletrônica porque a energia luminosa (fótons) é usada para excitar as moléculas para níveis eletrônicos mais altos, promovendo o elétron de um nível de energia menos energético para outro mais energético (excitação). Contudo, para que isto ocorra é necessário que o fóton absorvido tenha energia exatamente igual à diferença de energia entre os dois estados eletrônicos envolvidos na transição (SHRIVER, et al., 2008). Com os resultados de medidas de absorção na região do UV-Vis é possível identificar e/ou avaliar uma determinada molécula a partir de sua característica espectral, uma vez que cada molécula possui uma assinatura espectral única, bem como por meio da quantidade de luz absorvida (MELO, 2012).

Sabe-se que o espectro de absorção da clorofila apresenta duas regiões características: uma entre 300 e 500 nm e outra na região de 650 a 700 nm. Todavia, é importante destacar que ao analisar a absorção de luz por um extrato vegetal, por exemplo de folhas verdes, a banda de absorção da primeira região (i.e., entre 300 nm a 500 nm) não é apenas devido à absorção da radiação eletromagnética pela clorofila *a* e *b*, pois outros pigmentos, como os carotenoides e tocoferóis, também absorvem certo componente de energia nessa região (SKOOG, et al., 2009). Sabe-se que os tocoferóis e carotenoides apresentam máximos de absorção em torno de 350 e 450, respectivamente, enquanto que a da clorofila *a* e *b* apresentam o máximo em 418 nm, diferentemente a banda entre 650 nm a 700 nm é devida apenas à absorção da radiação eletromagnética pelas clorofilas *a* e *b* (NELLIS et al., 2017).

1.6.3 Imagem termografia/Temperatura superficial

A técnica de obtenção de imagem termográfica possibilita a visualização da temperatura da superfície foliar de plantas, por meio da detecção da radiação infravermelha emitida no infravermelho longo 8-14 μm (JIMENEZ-BELL et al., 2011). O processo de análise de dados pode ser realizado por meio de aplicativo computacional, que transforma os dados de radiação emitida em imagens térmicas, em que os níveis de temperatura são indicados pelo gradiente de falsa-cor (NOBEL et al., 1991). A variação da temperatura foliar pode estar relacionada à interferência de fatores ambientais e à taxa transpiratória. As modificações do estado hídrico de uma planta podem causar mudanças na transpiração foliar, em função da ativa regulação da condutância estomática, esta associação feita para comprovar a linearidade da relação inversa entre temperatura da folha e transpiração (CHAERLE et al., 2007). Conforme Nilsson e colaboradores, as mudanças associadas ao modelo padrão de resfriamento da planta podem ser monitoradas de forma instantânea por meio de imagens termográficas (NILSSON, 1995). Desse modo, as imagens térmicas, especialmente quando combinada com outras medidas não invasivas, tais como a fluorescência da Chl-*a* e a análise das trocas gasosas, pode ser uma poderosa ferramenta para estudar o desempenho fotossintético das plantas (BAKER et al., 2008).



Figura 4: Aparelho de imagem termográfica utilizado (Testo 881) . Foto: Daniela Graciano

1.6.4 Fluorescência estacionária - portátil

O espectro de fluorescência da clorofila é característico, pois apresenta duas bandas de emissão, uma em aproximadamente 680 nm e outra, com menor intensidade, em 730 nm. À medida que se aumenta a concentração do extrato de clorofila, há um aumento linear da intensidade de fluorescência, pois a fluorescência depende da quantidade de moléculas no meio que são capazes de absorver a radiação e fluorescer, dessa forma, quanto maior a quantidade de moléculas, maior será a fluorescência. Nesta técnica duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente. As bandas de fluorescência vermelho e vermelho-distante são devidas aos complexos Chl *a* do Fotossistema II e Fotossistema I, respectivamente, encontrados no interior das membranas tilacóides dos cloroplastos (MISHRA et al., 2010).

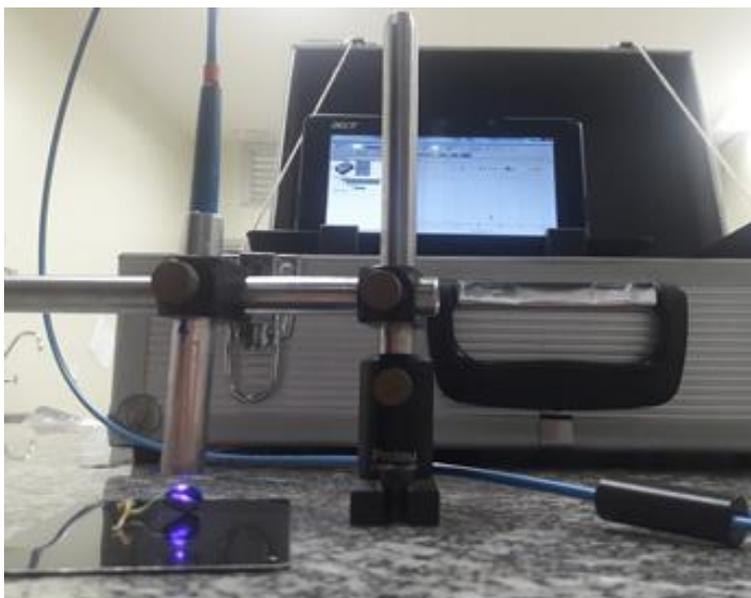


Figura 5: Aparelho de fluorescência estacionária utilizado. Foto: Daniela Graciano

1.6.5 Índice de germinação e crescimento da raiz

O termo germinação apresenta diferentes conceitos em função do campo de investigação. Do ponto de vista fisiológico, germinar é sair do repouso e entrar em atividade metabólica, isto é, uma semente viável em repouso, após ser suprida em suas necessidades externas (do ambiente) e internas (dos órgãos) é levada ao crescimento do embrião, o qual

conduzirá à germinação (LABOURIAU et al., 1983). Em tecnologia de sementes, porém, conceituação de germinação tem um cunho mais prático, incluindo a fase de crescimento da plântula neste processo (MACHADO e CÍCERO, 2002). Portanto, em condições de laboratório, a germinação de uma semente pode ser definida como a emergência e o desenvolvimento da plântula até alcançar um estado tal que os aspectos de suas estruturas essenciais permitam indicar a capacidade desta em transformar-se em uma planta, sob condições favoráveis no solo (BRASIL, 1992; ISTA, 1993).

O conhecimento das condições ótimas para a condução de testes capazes de avaliar as sementes, sob diferentes aspectos, é de fundamental importância. Avaliação da qualidade fisiológica das sementes de acordo com (LINARES et al., 1999), o nível da qualidade fisiológica de uma semente pode ser determinado por dois parâmetros fundamentais: viabilidade e vigor. Segundo o mesmo autor, a viabilidade é medida principalmente pelo teste de germinação e procura determinar a máxima germinabilidade de uma semente, sendo oferecidas, para isto, condições extremamente favoráveis. Por outro lado, o vigor detecta atributos mais sutis da qualidade fisiológica, não revelados pelo teste de germinação. O teste de germinação determina a porcentagem de sementes capazes de germinar normalmente, com base nas características morfológicas das plantas. Sendo assim, tanto as Regras para Análise de Sementes nacionais (Brasil, 1992) como as internacionais (ISTA, 1993) indicam o substrato, a temperatura, os limites de tempo, e, no caso de sementes dormentes, tratamentos especiais para a condução do teste. A necessidade de tal padronização advém principalmente do fato de que a intensidade da resposta das sementes ao ambiente é variável entre as espécies (MACHADO et al., 2002).

De acordo com Peixoto, a toxicidade de um determinado agente estressor pode ser observada por diversos sintomas no sistema radicular e na parte aérea, além de interferir na absorção e utilização de nutrientes. Essa toxicidade ocasiona reduções no peso da matéria seca, no número e no comprimento de raízes e na área radicular, que frequentemente estão associados a aumentos no raio médio e no volume das raízes. (PEIXOTO et al., 2007). Na parte aérea ocorrem reduções no peso de matéria seca, na altura e no diâmetro das plantas. Segundo Otto e colaboradores, a manutenção de grande massa seca de raízes resulta em grande gasto de energia metabólica e tem consequências negativas sobre o crescimento em altura das plantas e na produtividade (OTTO et al., 2007). A relação entre tamanho da parte aérea e raiz implica em uma ferramenta importante na detecção de estresse em plantas. Em estudos no polo Industrial de Cubatão, por exemplo, a *Tibouchina pulchra Cogn*, submetida

ao ar contaminado com alta concentração de SO₂, modificou o crescimento da planta, com redução significativa na razão: tamanho da parte aérea e raiz (KLUMPP et al., 2000)

Diante do exposto, estudos sobre o efeito de NPs sobre espécies nativas são fundamentais para ampliar o conhecimento dos efeitos contaminantes destes produtos assim como o potencial das espécies em serem utilizadas como bioindicadoras ambientais ou ainda a possibilidade de seu uso na fitoremediação. No presente estudo levantamos a hipótese de que as NPs são capazes de interagir com o embrião de sementes fotossintetizantes, interferindo desde os estádios pré-germinativos, no status fisiológico do complexo do PSII. Assim, foram avaliadas as alterações no funcionamento do aparato fotossintético das sementes de *Inga laurina* e a fitotoxicidade induzida por nanopartículas de CuONPs, Fe₂O₃NPs e ZnONPs.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar as alterações fisiológicas em sementes e plântulas de *Inga laurina* induzidas por NPs óxido metálicas (cobre, ferro e zinco), avaliando o potencial fitotóxico e impacto das NPs sobre o funcionamento do aparato fotossintético em estágio inicial de desenvolvimento.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o impacto fitotóxico de NPs de óxidos metálicos sobre *Inga laurina* por meio dos testes de germinação e crescimento da raiz;

Determinar os índices de germinação e crescimento da raiz para sementes de *Inga laurina* submetidas a diferentes concentrações e composições químicas das NPs;

Avaliar a viabilidade da técnica de espectroscopia de fluorescência no monitoramento *in vivo* da interação NPs-sementes;

Caracterizar as alterações no status fisiológico da *Inga laurina* em estágio inicial de desenvolvimento a partir da espectroscopia de fluorescência da clorofila *a*;

Determinar as alterações na eficiência de funcionamento do PSII das sementes de *Inga laurina*, nos estágios pré e pós-germinativo, quando submetidas a diferentes concentrações das NPs.

3. METODOLOGIA

3.1 Material Botânico

Frutos de *Inga laurina* (Sw.) Willd., foram coletados de matrizes ocorrentes em vegetação ciliar no município de Dourados Estado de Mato Grosso do Sul, e logo beneficiadas manualmente conforme (Figura 6, A). Sendo as sementes submetidas aos testes de concentrações em função da concentração das NPs (Figura 6, B).

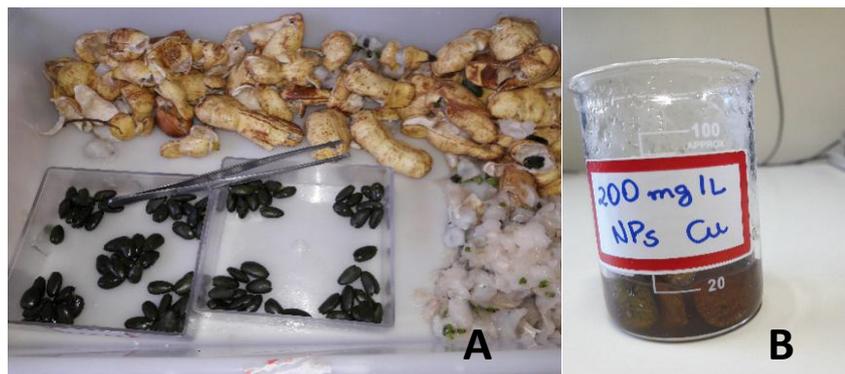


Figura 6: (A) Frutos e sementes beneficiadas de *Inga laurina* e (B) sementes de *Inga laurina* embebidas em solução. Foto: Daniela Graciano

3.2 Nanopartículas utilizadas

As partículas em dimensões nanométrica (nm) utilizadas durante a pesquisa foram:

- (A) CuONPs em pó com dimensões nominais < 50nm, adquiridas da Sigma-Aldrich com distribuição de tamanho definido;
- (B) Fe₂O₃NPs em pó com dimensões nominais < 50nm, adquiridas da Sigma-Aldrich com distribuição de tamanho definido;
- (C) ZnONPs em pó com dimensões nominais < 50nm, adquiridas da Sigma-Aldrich com distribuição de tamanho definido;

As nanopartículas são em pó, foram diluídas em água ultra-pura MilliQ, armazenadas em frascos Ambêr e colocadas em aparelho ultrasônico para favorecer a dispersão (evitar agregação) das nanopartículas na solução aquosa.

3.3 Teste de Germinação

Esta avaliação foi realizada em conjunto com o teste padrão de germinação, registrando a porcentagem de plântulas normais, na data prescrita pelas Regras para Análise

de Sementes (BRASIL, 1992) para primeira contagem do teste de germinação. As contagens das sementes germinadas foram realizadas diariamente de zero até o sétimo dia após o início do teste, quando ocorreu a estabilização do número de sementes germinadas; o critério de germinação adotado foi a emissão da raiz primária e epicótilo. A primeira contagem de germinação foi efetuada em conjunto com o teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no sexto dia após a sementeira. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado mediante contagens diárias do número de sementes germinadas, no mesmo horário, cujo índice foi calculado de acordo com a fórmula proposta por (MAGUIRE et al., 1962).

No processo de germinação, no período de embebição as sementes foram agitadas por 08 horas em beakers, amarrados com elásticos em mesa agitadora orbital da marca TECNAL (shaker), com a velocidade de 5 rpm e embebidos com 20 ml de solução (concentrações de contaminantes ou controle). Após a agitação as sementes de inga foram colocadas em caixa de germinação gerbox com papel filtro duplo umedecido, com a mesma solução da agitação. Figura 7. Em seguida, foram mantidas em câmara de germinação com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, fornecendo as condições ideais para a germinação e crescimento da espécie, as condições de germinação utilizadas foram: temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e umidade de 65/70% com intensidade actínica de aproximadamente $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Para cada material estudado Nps de (CuO, Fe₂O₃ e ZnO) foram utilizadas as seguintes concentrações: 0 mgL⁻¹; 50 mgL⁻¹; 100 mgL⁻¹, 200 mgL⁻¹ e 300 mgL⁻¹, e para cada concentração foram utilizadas 10 sementes por contaminante ou controle, totalizando 150 sementes. Estes testes foram repetidos nos meses de janeiro, fevereiro e março.

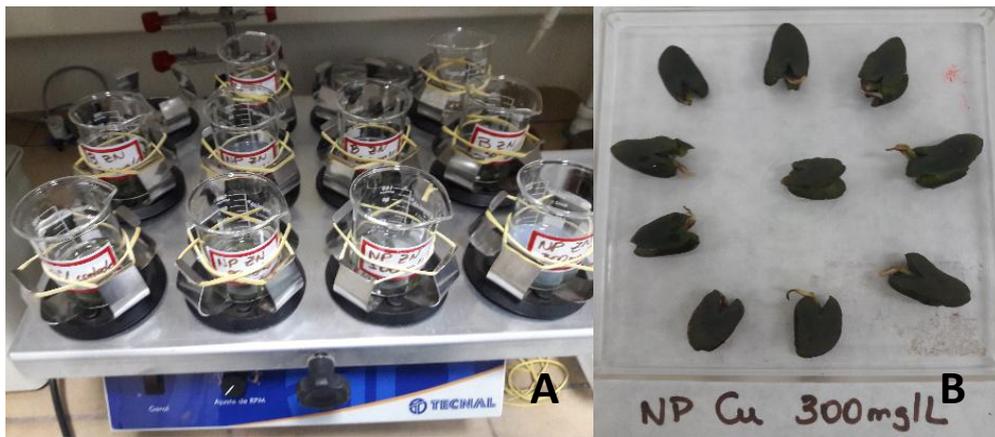


Figura 7: (A) Sementes de *Inga laurina* em diferentes tratamentos de exposição e mantidas sob agitação. (B) Sementes pós embebição expostas a CuONPs em água ultra-pura, colocadas em caixa de germinação e avaliadas durante 7 dias. Foto: Daniela Graciano

3.4 Tamanho da raiz

No final do período experimental germinativo foi mensurado, com o auxílio de um paquímetro da marca Digimess® com precisão de 0,05mm, o tamanho das raízes das plantas. Os dados foram submetidos a análise de comparações entre médias, usando-se o Teste T-Student a 95% de probabilidade ($P < 0,05$). Conforme figura 11.



Figura 8: Avaliação do tamanho da raiz de plântulas de *Inga laurina* submetidas a diferentes concentrações de CuONPs, decorridos 168h após o período de embebição, com o auxílio de um paquímetro digital. Foto: Daniela Graciano

Após 07 dias, no final do período de germinação, as plantulas foram colocadas em vasos de polietileno contendo substrato agrícola Bioplant®, separadas por concentração, cada concentração foram utilizados 3 vasos, e mantidas em viveiro com cobertura sombrite 50% e irrigação diária por microaspersão por 30 dias. Figura 9.



Figura 9: Plantulas de *Inga laurina* decorridos 30 dias de casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano

3.6 Fluorescência da clorofila *a* modulada e cinética

A fluorescência da clorofila-*a* (Chl-*a*) foi medida pela primeira vez 24h (após embebição da semente) e posteriormente coletada (Chl-*a*) a cada 24h por 7 dias, até final de período de germinação (168h). As sementes eram mantidas à 25°C em câmara de germinação e as plântulas em casa de vegetação sujeita as variações de temperatura do período de verão entre janeiro e março. As imagens de fluorescência cinética foram coletadas utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments. Esse sistema é composto por painéis de Leds usados como fonte de excitação com intensidade de luz actínica acima de 2500 μmol (prótons) $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e uma câmera CCD que coleta imagens na região entre 400 a 1000 nm fornecendo imagens com resolução de 512 x 512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames por segundo. O sistema é fechado, propiciando a adaptação da amostra ao escuro, antes de exposta à radiação. Antes das medidas de fluorescência cinética, as sementes foram adaptadas ao escuro por 1/2h garantindo que todos os centros de reação estivessem abertos. A luz branca foi utilizada como fonte de excitação, empregado também um filtro para selecionar somente a emissão da clorofila, na região de 680 nm, sendo as medidas efetuadas em um dos lados da semente. As medições foram realizadas diariamente no período entre as 9:00h às 15:00h. Os folíolos foram adaptados ao escuro e após 30 minutos

foram iluminados em uma área de 4 mm de diâmetro com um arranjo de 6 LEDs e pulso de luz de $300 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Figura 10.

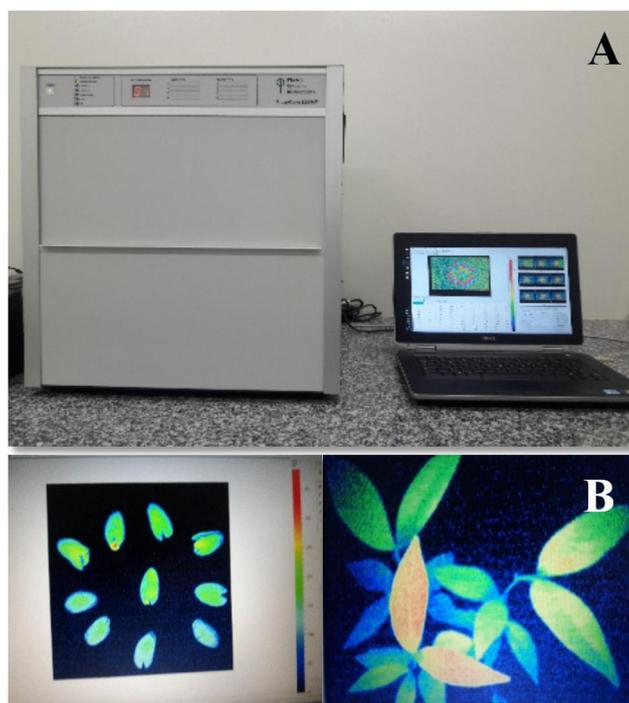


Figura 10: (A) Equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, utilizado para aferir os parâmetros de fluorescência da (Chl-*a*). (B) imagem de emissão de fluorescência da clorofila em sementes e plântulas de *Inga laurina*. Foto: Daniela Graciano

A fluorescência estacionária da clorofila *a* é medida com um fluorímetro portátil constituído de dois lasers de diodo, operantes em 405 nm e em 532 nm, um monocromador (USB 2000 FL – OceanOptics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop para obtenção os espectros. As amostras foram excitadas em 405 nm e os espectros foram obtidos de 450 nm a 800 nm, Figura 11.



Figura 11: Obtenção dos espectros de fluorescência estacionária da clorofila *a*, medidas no período após embebição da semente (48h) e diariamente a cada 24h até (168h) final de período de germinação e após 30 dias. Foto: Daniela Graciano

3.7 Obtenção das imagens termográficas

As imagens foram obtidas por meio de uma câmera termográfica Testo® (Figura 11.A), detector infravermelho de 2.3 Megapixels de resolução, em que as escalas de temperaturas são indicadas por gradientes de falsa cor. Por meio da funcionalidade designada de fusão, uma combinação da imagem térmica com a imagem visual pode ser criada. Assim, sobrepondo uma área de imagem infravermelha sobre uma imagem visual, foram localizadas as áreas de interesse.

Para obtenção das imagens térmicas nas sementes de *Inga laurina*, submetidas as diferentes concentrações, foram medidas após embebição das sementes (24h) e diariamente até o final do período de germinação (168h). Antes de iniciar as medidas, as sementes eram retiradas da câmara de germinação, mantidas no laboratório com refrigeração de 25°C, temperatura obtida por um ar condicionado 9.000 BTUs e no escuro, por 30min, esse procedimento era realizado para evitar qualquer alteração de temperatura, principalmente por radiação luminosa. Para o procedimento da análise termográfica em cada placa com as sementes, as imagens foram tiradas pela aproximação do equipamento a uma distância de aproximadamente 20 cm de cada caixa de germinação acrílica, mantendo-se o ângulo de 90° graus entre a câmara e a amostra.

Após o período de germinação, as plântulas foram mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente durante 30 dias. Depois desse tempo, foi realizado a coleta de imagens térmicas nas folhas, utilizando o mesmo procedimento adotado para as sementes. amostra.



Figura 12: (A) Câmera Termográfica utilizado no experimento; (B) Imagem termográfica indicando a temperatura superficial de sementes e plântulas de *Inga laurina* e (C) Imagem termográfica no software. Foto: Daniela Graciano

3.8 Caracterização óptica do extrato

Análises de absorção UV-Vis foram realizadas no extrato obtida a partir de folíolo objetivando avaliar possíveis alterações físico-químicas da planta associadas as NPs. No estudo de absorção do extrato do vegetal, foi utilizado o espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Varian). O espectrofotômetro de absorção molecular tem como fonte de excitação uma lâmpada de Deutério, um monocromador Czerny-Turner 0,25m e um detector de diodo de Si, como apresentado na Figura 16.

Os espectros de absorção foram coletados de 200 a 800 nm, usando uma cubeta de quartzo de duas faces polidas de 10 mm de caminho óptico. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente. A extração do extrato vegetal foi realizada a partir de folhas jovens, após 30 dias de germinação. As folhas foram coletadas, picotadas e adicionadas 3g de folhas foram adicionadas em 30 mL de Metanol PA. e deixadas por um período de 72 horas, posteriormente separou-se o extrato obtido, conforme Figura 16. Este extrato foi armazenado em frasco âmbar envolto por papel alumínio e em ambiente refrigerado para evitar degradação.



Figura 13: (A) Aparelho de UV/Vis e (B) Extrato da clorofila a ser analisado. Foto: Daniela Graciano

Os teores dos pigmentos presentes nos extratos foram determinados a partir das equações i,ii,iii e iv, conforme Lichtenthaler (1987).

$$\text{Clorofila } a: 15,65 A^{666\text{nm}} - 7,34 A^{653\text{nm}} \times \text{FD} \quad (\text{i})$$

$$\text{Clorofila } b: 27,05 A^{653\text{nm}} - 5,03 A^{666\text{nm}} \times \text{FD} \quad (\text{ii})$$

$$\text{Clorofila total: (Chl } a + b) = 24,23A^{652\text{nm}} + 3,26A^{665,2\text{nm}} \quad (\text{iii})$$

$$\text{Carotenóides totais: } (1000 A^{470\text{nm}} - 2,86 \times \text{Chl } a - 129,2 \times \text{Chl } b \times \text{FD}) / 221 \quad (\text{iv})$$

$A^{653\text{nm}}$ representa o valor da absorbância em 653 nm em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores foram corrigidos para miligramas de pigmento fotossintético por grama de massa fresca através da multiplicação do resultado pelo volume final do extrato (mL), dividido pela massa fresca (g) e multiplicado por 0,001, sendo o resultado final expresso em miligramas de pigmento por grama de massa fresca (mg g^{-1} MF).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 CuONPs

4.1.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (FM_{Lss}) – sementes e plântulas

A emissão da fluorescência da clorofila *a* para parâmetro *Fm_{Lss}* (fluorescência máxima da planta adaptada à luz), variou em intensidade de pixels nas diferentes concentrações (0, 50 e 300 mgL⁻¹) de CuONPs, bem como, ao longo das 168h de avaliação. Figura 14.

Sementes de *Inga laurina* submetidas a 300 mgL⁻¹ apresentam, no geral, maior *Fm_{Lss}* que as demais concentrações. Para as concentrações 0 e 50 mgL⁻¹ ocorreu redução da emissão ao longo do tempo (cores mais suaves) ao passo que em 300 mgL⁻¹ esse efeito é menos evidente. Foi observado que nas maiores doses houve o aumento de *Fm_{Lss}* em relação a (0) Controle, indicando que pode ter havido a otimização da cadeia de transportes de elétrons diante das concentrações de NPS. (SUH et al., 2002; PEREIRA et al., 2009; CASTRO, 2010).

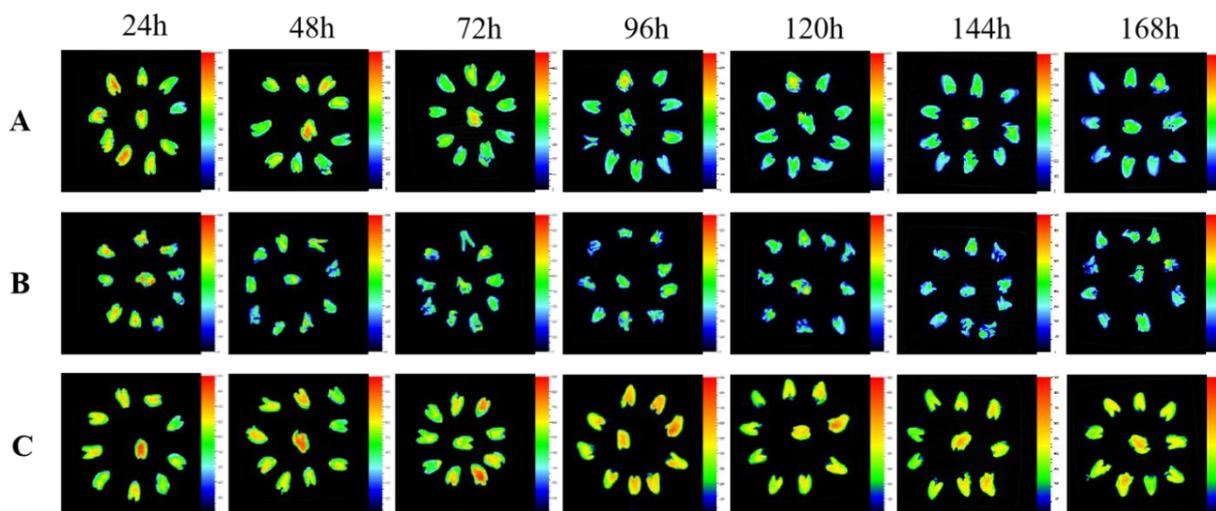


Figura 14: (A) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (*Fm_{Lss}*) no período de 24 a 168h, após a imersão em 0 mgL⁻¹ de CuONPs. (B) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (*Fm_{Lss}*) no período de 24 a 168h, após a imersão em 50 mgL⁻¹ de CuONPs. (C) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (*Fm_{Lss}*) no período de 24 a 168h, após a imersão em 300 mgL⁻¹ de CuONPs.

Observou-se respostas de fluorescência da clorofila *a* por meio da fluorescência máxima no último pulso saturante (*Fm_{lss}*) das sementes de *Inga laurina* submetidas no período de germinação, com CuONPs, nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹. Sob todas as concentrações ocorre queda da *Fm_{lss}* ao longo do tempo (Figura 15). As reduções da *Fm_{lss}*, independentemente das doses de CuONPs podem estar relacionadas à degradação natural da clorofila em função do tempo, por serem as sementes de *Inga laurina* classificadas como recalcitrantes (BILIA et al., 2003), altamente intolerantes à dessecação e com baixa longevidade natural (FIGLIOLIA et al., 1994; PRITCHARD et al., 1995; BILIA et al., 1997; FARIA et al., 2004). A quantidade de clorofila na semente diminui durante o processo de maturação através das ações das enzimas clorofilase e quelatase de magnésio, que degradam a clorofila.

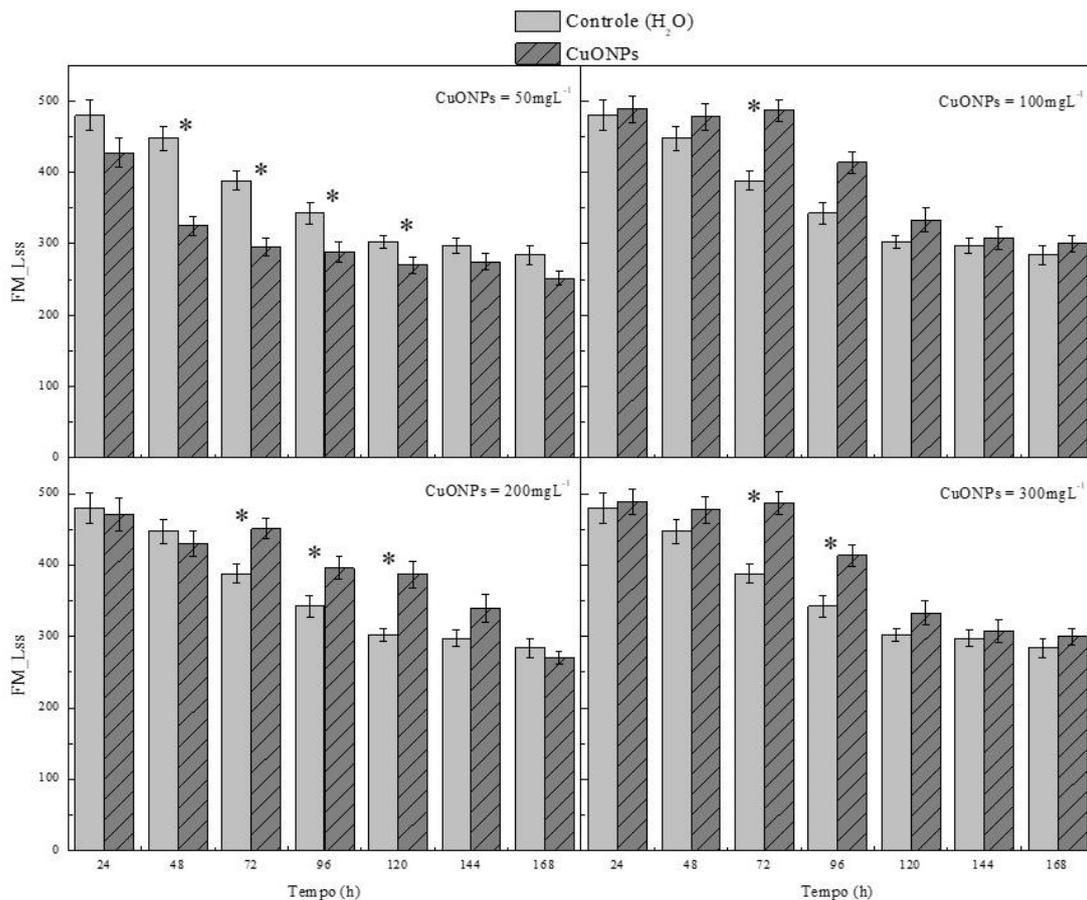


Figura 15: *Fm_Lss* média de 10 sementes de *Inga laurina*, em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05; n = 10).

Nos testes estatísticos, ficou evidenciado o efeito das doses sendo que o tratamento 50 mgL⁻¹ CuONP apresentou média com diferença estatística nas 48h, 72h, 96h e 120h de germinação, sendo a média de (*Fm_Lss*) menor que o tratamento (0) Controle, resultando assim, em menor emissão de fluorescência. Nos outros tratamentos 100, 200 e 300 mgL⁻¹ a média do (*Fm_Lss*) foi maior que aquelas observadas no tratamento (0) Controle.

Ficou, evidenciado, a diferença de Fluorescência entre as doses de 50 e 300 mgL⁻¹. A elevação de *Fm_Lss* nas maiores doses de CuONPs entre 48-96h é um fenômeno de difícil interpretação (Figura 16). Eventos compensatórios de dissipação de energia relacionados à fotoinibição são comuns em plantas submetidas ao estresse (GUO et al 2018). De modo isolado, o elemento Cu pode desestabilizar o funcionamento do FSII e acarretar danos ao crescimento das plantas. (BROADLEY et al., 2012). Em estudos para investigar o efeito de CuONP (10-800 mgL⁻¹) sobre a resposta fisiológica e bioquímica de plântulas de trigo (*Triticum ssp*) cultivadas em soluções nutritivas, (SHARMA et al., 2017), reportaram redução significativa no teor de clorofila e na fluorescência de clorofila nas plântulas. Os autores atribuíram esses resultados ao dano oxidativo na membrana dos cloroplastos causado pela interação direta com as nanopartículas, ou ainda, aos íons de Cu²⁺ liberados pela dissolução do CuO nanoparticulado.

Observou-se que na concentração de 300 mgL⁻¹ houve um aumento da *Fm_Lss* de 24 a 72h e logo após um decréscimo da fluorescência, mas ainda sim permaneceu com a maior média de *Fm_Lss*. Sob concentração de 50 mgL⁻¹ a *Fm_Lss* foi menor que o tratamento (0) Controle. Esse comportamento pode estar relacionado à degradação natural da clorofila de sementes devido à sua função de reserva (BILLA et al. 2003). Evidenciando que nas maiores doses há um consumo de clorofila como reserva entre 48-96h (Figura 16).

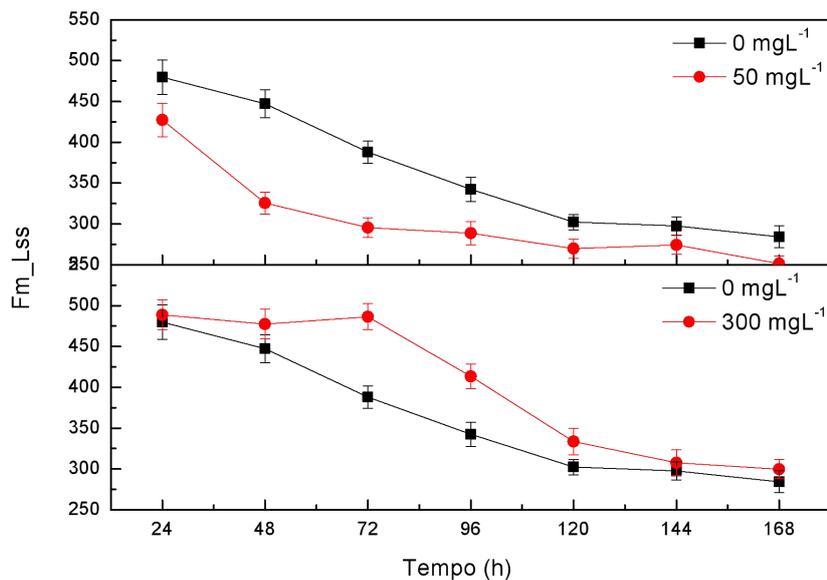


Figura 16: *Fm_Lss* de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs.

A germinação hipógea, conforme classificação de (MÍQUEL et al., 1987), com os cotilédones permanecendo parcialmente expostos e com coloração verde, indica função de fotossíntese, além de armazenamento. Esse tipo de germinação já havia sido descrito para essa espécie por (RESSEL et al., 2004).

Em sementes de *Inga laurina* a capacidade fotossintética é precoce, uma vez que os tecidos cotiledonares apresentam além dos plastos de reserva, cloroplastos com organização de membrana funcional, cotilédones foliáceos, de coloração verde intenso (KITAJIMA et al., 1992), o que as capacita para a produção de foto assimilados desde os primeiros momentos da ativação metabólica no início da germinação.

Durante o desenvolvimento de alguns embriões de sementes, os cloroplastos fotoquímicos podem ser capazes de produzir assimilados e, conseqüentemente, a conversão em biopolímeros de reserva nos degraus finais da embriogênese (SMOLIKOVA et al., 2017a). Por outro lado, embriões de sementes amarelas continham oito oxidoreductases únicas que podem indicar níveis mais elevados de catabolismo oxidativo, e uma maior capacidade de transferência de elétrons (SMOLIKOVA et al., 2017b; MAMONTOVA et al., 2018).

4.1.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (Fm_{Lss}) – folíolos

A emissão de fluorescência da clorofila no último pulso modulado (Fm_{Lss}) de plântulas obtidas a partir de sementes expostas à CuONPs (decorridos 30 dias da exposição) são apresentadas na figura 17. Foi possível observar que na maior concentração 300 mgL^{-1} a média de (Fm_{Lss}) foi maior que no tratamento (0) Controle e na menor concentração 50 mgL^{-1} a média (Fm_{Lss}) foi menor que no tratamento (0) Controle. Os resultados de Fm_{Lss} observados nas plântulas evidenciam os efeitos das CuONPs mesmo decorridos 30 dias da exposição das sementes, sugerindo três eventos possíveis: a) efeito direto das CuONPs ainda presentes nos tecidos das plântulas; b) efeitos indiretos relacionados a distúrbios funcionais decorrentes dos primeiros dias de exposição das sementes e; c) os dois fatores ocorrendo de maneira simultânea. Os efeitos diretos das CuONPs nas plântulas após 30 dias de exposição sugerem a presença destas nos tecidos já diferenciados implicando, necessariamente, na entrada das NPs nos tecidos dos cotilédones; seus efeitos somente seriam reduzidos a partir da saída das NPs do corpo vegetal, por exemplo, por meio da queda das folhas de modo prematuro ou durante a senescência regular.

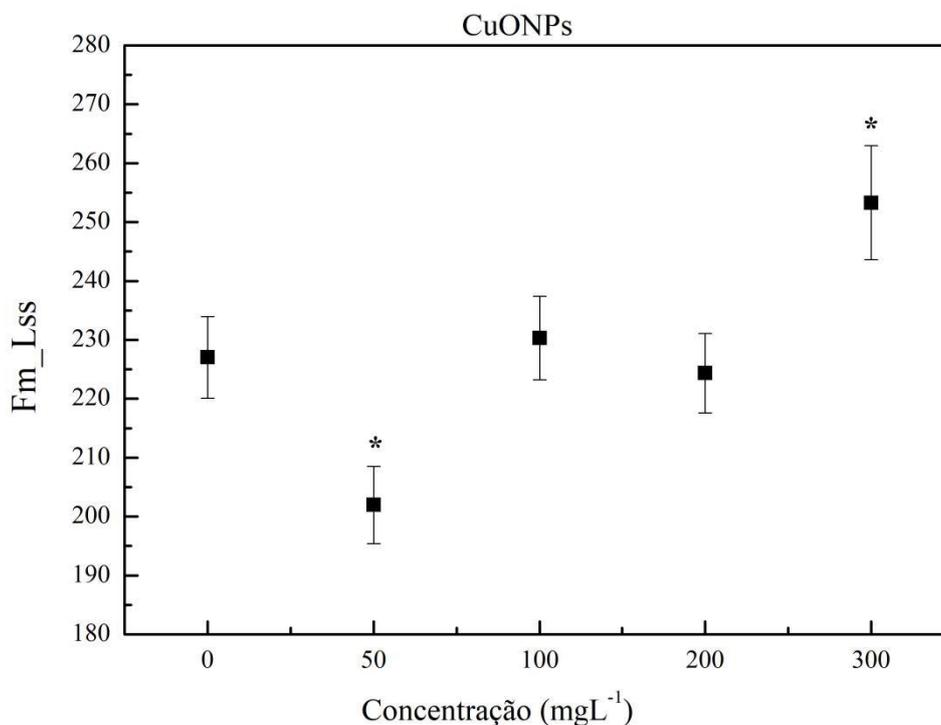


Figura 17: Fm_{Lss} média de 10 plântulas de *Inga laurina*, 30 dias após embebição com CuONPs.

Os efeitos indiretos relacionados a distúrbios funcionais normalmente ainda estão presentes nos primeiros dias da exposição (em especial, quando o tempo decorrido da exposição ao fator de estresse é curto) logo, parece sensato admitir que as respostas de *Fm_Lss* observados nas plântulas estão relacionadas a fatores diretos e indiretos das CuONPs. Estudos em plantas de pepino (*Cucurbita pepo*) cultivadas em solução nutritiva com CuONPs (0-1000 mgL⁻¹) após centrifugação, para remoção das nanopartículas do sobrenatante, tiveram aumento de biomassa, comparadas às plantas cultivadas em solução não centrifugada, sugerindo o efeito fitotóxico das nanopartículas (STAMPOULIS et al, 2009). Em condições hidropônicas, plantas de *Elsholtzia splendens* (tolerante a Cu) foram expostas a CuONP e CuSO₄. O conteúdo de Cu na parte aérea das plantas expostas a CuONP (1000 mgL⁻¹) foi muito maior que nas plantas expostas a fonte solúvel na dose 0,5 mgL⁻¹, concentração escolhida com base na concentração de Cu dissolvido na dose de 1000 mgL⁻¹ de CuONP. Os autores relatam formação de depósitos de CuONP nas células da raiz e em células foliares, comprovando por análise de absorção de raio X, que o Cu no tecido da planta predominava como CuONPs. Este dado sugere que as NPs foram absorvidas e translocadas para parte aérea (SHI et al., 2013).

A relação entre as maiores concentrações de CuONPs e o parâmetro *Fm_Lss* observado nas plântulas de *Inga laurina*, se deu de forma não linear entre dose-resposta. Em sistemas biológicos os mecanismos internos de auto-organização respondem de modo ajustado à intensidade e/ou tempo de duração de fatores estressores (HÜTT e LÜTTGE., 2002). Assim nem sempre o comportamento observado é ajustado às concentrações, de modo que possam ser explicados por meio de equações lineares.

Na figura 18 revela as diferenças de *Fm_Lss* em folhas de *Inga laurina* após 30 dias de emveição das sementes em diferentes concentrações de CuONPs. Plântulas do tratamento 300 mgL⁻¹ apresentam maior gradiente de pixel representado pelas cores mais quentes na escala, explicitando o efeito das concentrações sobre as variáveis de emissão de fluorescência.

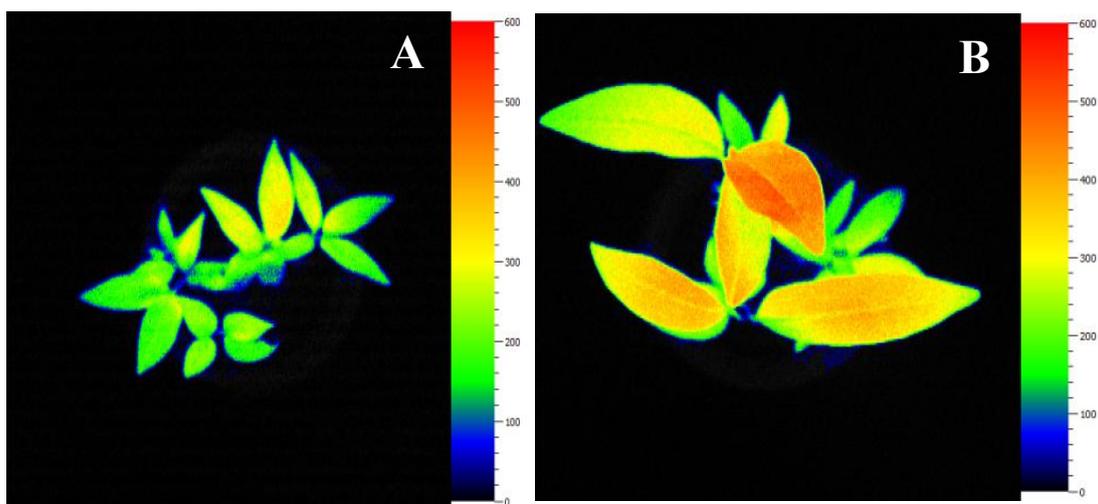


Figura 18: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (Fm_lss), (A) 30 dias após a imersão em 50 mgL^{-1} de CuONPs e (B) 30 dias após a imersão em 300 mgL^{-1} .

4.1.3 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) – semente e plântulas

Nossos resultados sugerem mudanças induzidas por CuONPs em cloroplastos fotoquímicos ativos durante reações de germinação e hidrólise. A Figura 19 mostra imagens representativas do rendimento quântico da conversão de energia fotoquímica em FSII (Qy_max) em função do tempo para sementes de *Inga lauriana* expostas a CuONPs em (A) 0 mgL^{-1} , (B) 50 mgL^{-1} , (C) 300 mgL^{-1} . As alterações observadas também são dependentes de tempo e dose. Após a exposição na maior concentração de CuONPs, a máxima eficiência da atividade fotoquímica do FSII, já está aumentando antes da protrusão radicular. Este resultado sugere uma alta atividade metabólica em sementes, com o aumento das concentrações.

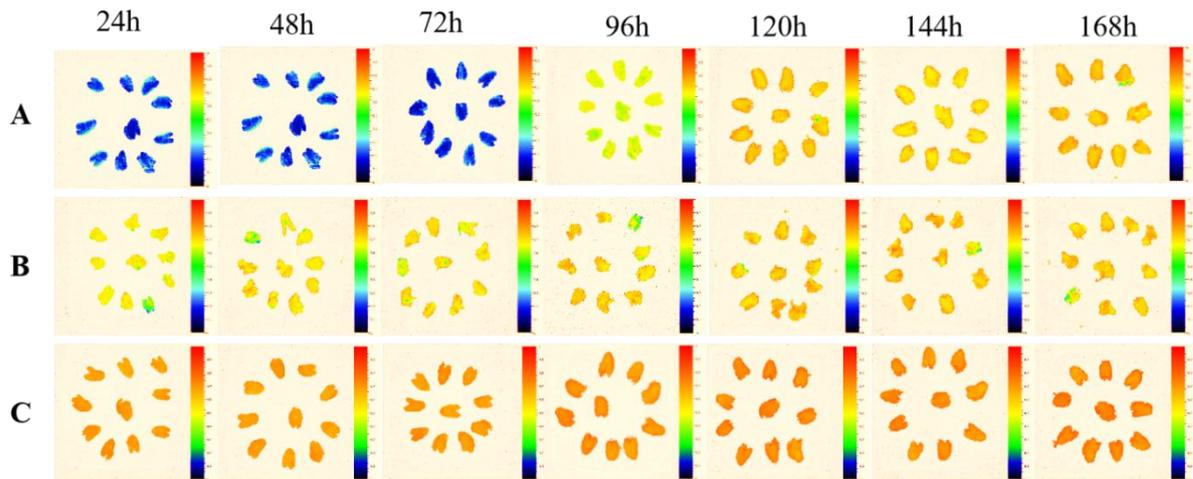


Figura 19: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica $Qy_{max} = Fv/Fm$: (A) 0 mgL⁻¹, (B) 50 mgL⁻¹ de CuONPs, e (C) 300 mgL⁻¹ de CuONPs,

As diferenças associadas à dose/resposta para a eficiência do rendimento fotoquímico da fotossíntese (Qy_{max}) das sementes de *Inga laurina*, no período de germinação, para as concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹, foram observadas no período compreendido entre 72-120h (Figura 20). De modo geral, exceto para a dose 200 mgL⁻¹ decorridos 144h, as CuONPs promoveram aumento da Qy_{max} , sendo a maior diferença entre o controle (0 mgL⁻¹) e a 100 mgL⁻¹ CuONPs, em 72h, apresentando 0,65 e 0,75 u.a de (Qy_{max}), respectivamente. Para todas as concentrações, decorridas 168h não foram mais observadas diferenças entre as médias de eficiência fotoquímica entre as concentrações.

No entanto, os dados sugerem a potencialização da eficiência fotoquímica; e associados ao aumento da concentração em mgL⁻¹, resultando em maiores valores de Qy_{max} , em ordem crescente 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs. As elevações de Qy_{max} observadas podem estar relacionadas à otimização no transporte de elétrons. (AMDE et al., 2017), ou à degradação natural da clorofila de sementes devido à sua função de reserva (BILLA et al. 2003).

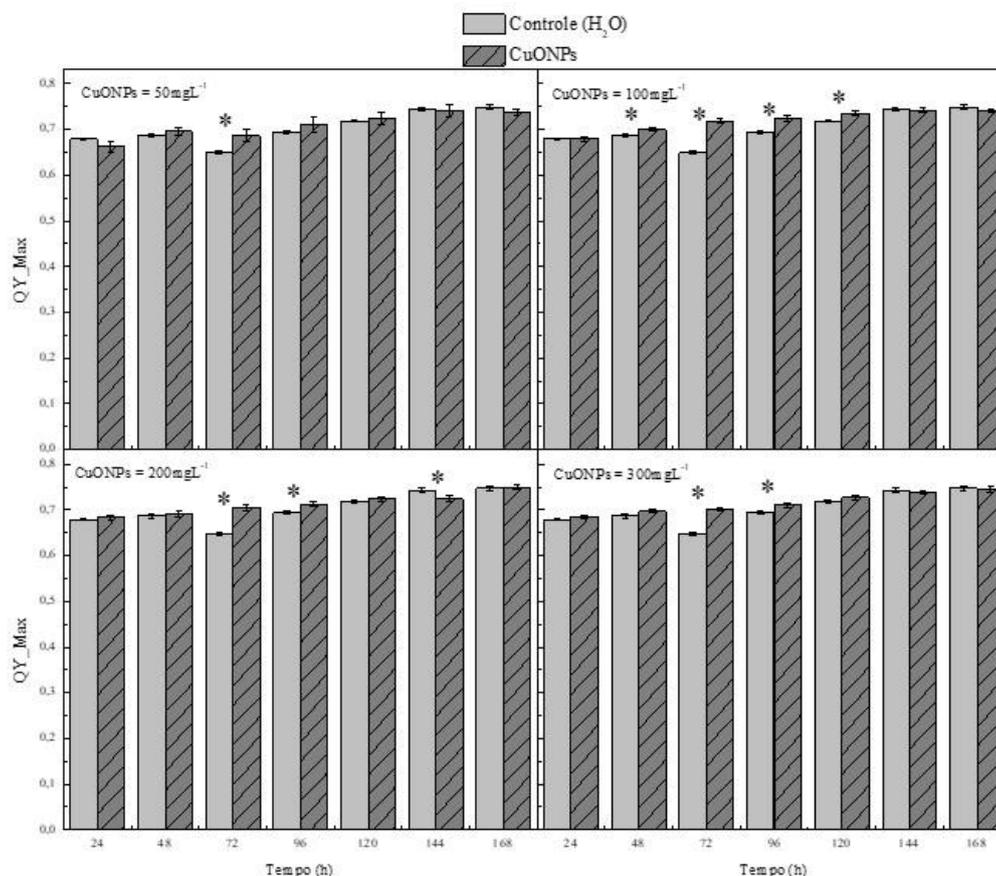


Figura 20: Q_y_max - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$; $n = 10$).

O parâmetro eficiência quântica potencial do fotossistema II (Q_y_max) representa a razão entre as fluorescências variável e a máxima (F_v/F_m) e expressa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (BAKER, 1991; KRAUSER & WEIS, 1991), o que pode, segundo (HAEHNEL et al.,1982), representar a eficiência quântica do transporte de elétrons através do FSII. Ainda que a (Q_y_max) seja tratada como um parâmetro robusto na identificação de respostas ao estresse (MOHAMMED et al, 1995), em nosso estudo os dados observados não sugerem efeitos deletérios das CuONPs ao complexo dos fotossistemas durante o período de germinação das sementes de *Inga laurina* nas doses utilizadas. De modo contrário, ocorreram aumentos para esta característica entre as 72-144h. Elevações da (Q_y_max) podem ser observadas quando, de modo simultâneo, os valores de emissão inicial de fluorescência (F_o) são reduzidos e a fluorescência máxima (F_m)

aumentados, ou de modo isolado os valores de fluorescência variável (Fv) são mais elevados quando comparados à Fm'.

Dentre os fatores que podem estar relacionados aos resultados estão as diferenças entre as massas envolvidas nas sementes ao longo do tempo que mudam as relações entre o número de dissipadores (moléculas dos complexos dos fotossistemas I e II) e o número de NPs livres ou agregadas. A massa e o tamanho das sementes são importantes características, pois são partes críticas do processo germinativo e podem afetar a dispersão e o recrutamento da população, assim como a predação de sementes tanto quanto o estabelecimento, crescimento e sobrevivência de plântulas (MICHAELS, et al., 1998). O tamanho das sementes pode ser indicativo de qualidade fisiológica (POPINIGIS, et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2005), ou seja, dentro de um mesmo lote de sementes, aquelas denominadas pequenas podem apresentar menor emergência de plântulas e vigor do que as consideradas médias e grandes. CARVALHO e NAKAGAWA (2000), mencionam que, de um modo geral, as sementes de maior tamanho poderão receber maior quantidade de substâncias de reserva durante a fase de desenvolvimento, o que proporcionará embriões mais formados, sendo consideradas sementes de maior vigor. A maior quantidade de reserva aumenta a probabilidade de sucesso no estabelecimento da plântula (LORENZI et al., 1998), pois permite a sobrevivência por maior tempo em condições ambientais desfavoráveis.

Sementes e plântulas representam estádios distintos de desenvolvimento do organismo. Para alguns fatores, sementes podem ser mais tolerantes que plântulas ou plantas jovens. Biologicamente, sementes representam uma fase do desenvolvimento vegetal mais sujeita às intempéries/variações do meio sobretudo, durante o período de dispersão, já as plântulas e plantas jovens de modo geral aparecem posteriormente, quando as condições foram minimamente favoráveis à germinação das sementes.

O estágio de desenvolvimento das plantas jovens é mais complexo que o das sementes, nas primeiras, novos tecidos são diferenciados, novas respostas associadas à expressão gênica podem ser observadas no sentido tanto da desestabilização de funções quanto das reações de reparo e restabelecimento. Em relação ao processo germinativo, BELTRATI et al., (2003) consideram que “os estádios de plântulas e indivíduos jovens, representam críticas no ciclo de vida da planta, são as etapas mais sensíveis às perturbações induzidas pelo homem, mudanças climáticas, competição intra e interespecífica, entre outros fatores que podem provocar redução ou extermínio dos bancos de germoplasma”.

4.1.4 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) – folíolos

Quando avaliado a eficiência do rendimento fotoquímico da fotossíntese através do parâmetro (Q_y_max) de plântulas de *Inga laurina*, obtidas a partir de sementes expostas à CuONPs (decorridos 30 da exposição), demonstraram que em plântulas a concentração de 50 mgL^{-1} obtém a média de (Q_y_max) inferior ao (0) Controle; e na concentração de 300 mgL^{-1} obtiveram (Q_y_max) maior que o tratamento (0) Controle. No entanto, nossos dados sugerem que as elevações de (Q_y_max) observadas estarem relacionadas à otimização no transporte de elétrons pelas NPs. (AMDE et al., 2017). E nas maiores doses sugerem que as NPs podem estar relacionado à degradação da clorofila de sementes devido à sua função de reserva (BILLA et al. 2003).

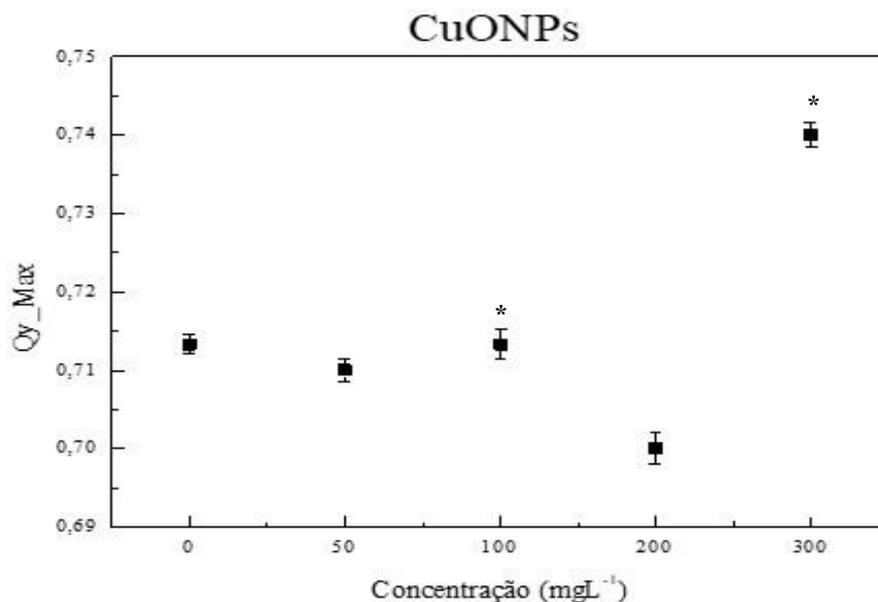


Figura 21: Q_y_max - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 plântulas de *Inga laurina* em função do tempo, submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de CuONPs, após 30 dias da embebição.

4.1.5 Supressão não-fotoquímica (NPQ_Lss) – sementes

As análises da *quenching* não fotoquímica (NPQ_Lss), foram realizadas no último pulso saturante de luz, quando as sementes já estão adaptadas a fase clara(Figura 22). No tratamento 50 mgL^{-1} e 100 mgL^{-1} CuONP, a maior diferença entre as médias de supressão não-fotoquímica (NPQ_Lss) foram observadas decorridos 120-144h de exposição, com o (0) Controle dissipando mais energia na forma de calor. Após 168h de exposição das sementes

submetidas às CuONPs, foram superiores o Controle. Nos tratamentos 200 e 300 mgL⁻¹ de 24-120h o Controle apresentou maior (*NPQ_Lss*) e decorrentes e nas 168h inverteu-se as médias, sendo os tratamentos nestas concentrações com médias superiores ao tratamento Controle.

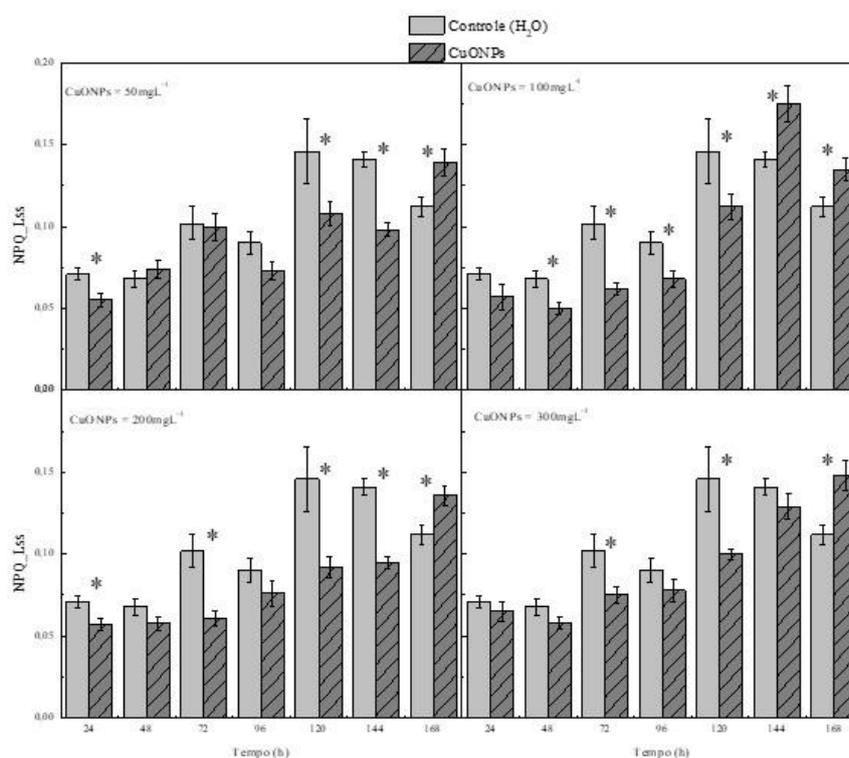


Figura 22: *NPQ_Lss*- parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05, n = 10).

Os valores do *NPQ_Lss* mostram uma diminuição inicialmente nas sementes contendo os CuONPs (Figura 23) . Ao longo do tempo, para todas as sementes, observamos uma tendência de aumento da dissipação de energia por vias não fotoquímicas a partir das 120h. No entanto, sob as doses CuONPs de 200 e 300 mgL⁻¹, houve indução de perda do comportamento oscilatório de dissipação não-fotoquímica, quando comparado ao (0) Controle. Esse comportamento oscilatório pode estar relacionado a formas cronobiológicas, controladas pelo mecanismo endógeno de cronometragem responsável pela organização de reações de

hidrólise e metabolismo de reserva durante a germinação de sementes de acordo com estímulo ambiental periódico.

Nas folhas jovens de *Inga laurina* já foram identificadas concentrações elevadas (1 a 10%) de três diferentes formas de tripsina, sugerindo uma defesa química da planta durante o período de crescimento, pois nas folhas adultas não encontraram os mesmos resultados (LOKVAM et al., 2007). Foi isolado um inibidor de tripsina das sementes de ingá, característicos das espécies das Fabaceae (MACEDO et al., 2007). Os compostos fenólicos são derivados da via bioquímica do ácido chiquímico ou ácido mevalônico e dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina (NACZK e SHAHIDI, 2004). A fenilalanina origina o ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amonialiase, que por sua vez origina o fenol propanóide, e formam as diferentes classes de compostos fenólicos. A enzima responsável pela formação do ácido cinâmico está sob controle de vários fatores externos e internos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, infecções fúngicas, lesões e luminosidade a qual os vegetais estão expostos (NACZK e SHAHIDI, 2004).

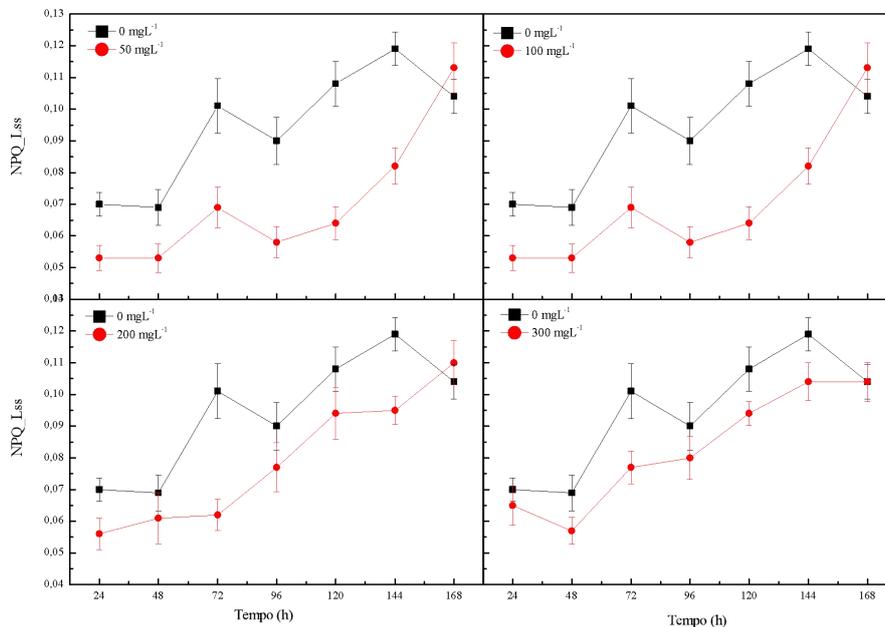


Figura 23: NPQ_{Lss} - parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs.

Já é conhecido pela ciência que muitos dos compostos fenólicos atuam como sequestradores de radicais livres enquanto outros agem como quelantes de metais

catalisadores de reações de geração de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL et al., 2007; FLOEGEL et al., 2011), sendo capazes de retardarem ou inibirem a velocidade de oxidação das biomoléculas e, conseqüentemente, os danos oxidativos no organismo (HALLIWELL et al., 2007). O mecanismo de ação dos antioxidantes pode ocorrer por interrupção das cadeias de reações oxidativas, sob bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, ou agindo como doadores de prótons e elétrons impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres (HALLIWELL et al., 2007; PEKAL et al., 2011).

4.1.6 Supressão não-fotoquímica (NPQ_{Lss}) – folíolo

As análises dos valores médios do *quenching* não-fotoquímico (NPQ_{Lss}) de plântulas obtidas a partir de sementes expostas à CuONPs (decorridos 30 da exposição). A relação entre as concentrações de CuONPs e a NPQ_{Lss} observadas nas plântulas de *Inga laurina* sugerem uma relação não linear entre dose-resposta provável pelo auto ajuste da planta (HÜTT e LÜTTGE, 2002) (Figura 24). As concentrações de 50 e 200 mgL⁻¹, apresentaram a maior média de dissipação não-fotoquímica (NPQ_{Lss}). Já as concentrações de 100 e 300 mgL⁻¹ induziram uma menor dissipação fotoquímica que o controle, expondo um comportamento não linear entre as concentrações. De modo similar, como o observado para o Q_y max, as respostas não lineares para NPQ_{Lss} podem estar associadas as diferenças das massas das sementes.

Como já foi discutido, sementes e plântulas tem estágios distintos de desenvolvimento, pois nenhum individuo possuem as mesmas características, podendo ter diferentes níveis de tolerâncias nos seus estágios de desenvolvimento vegetal.

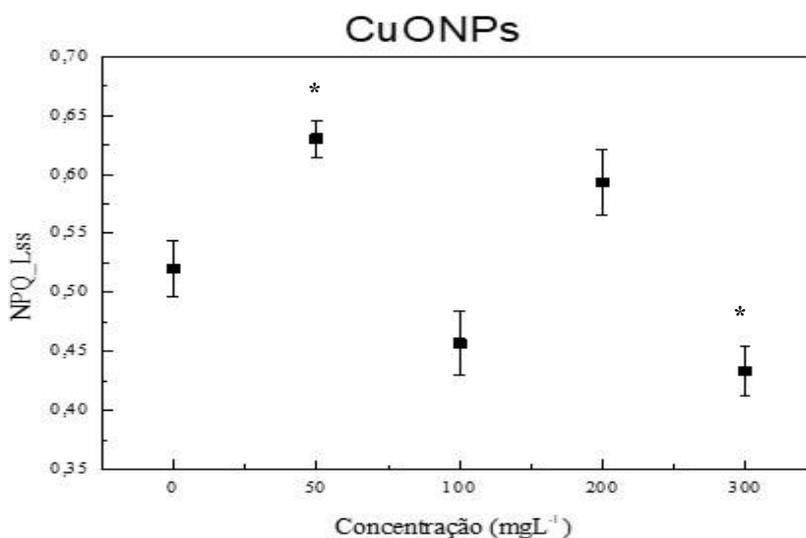


Figura 24: NPQ_Lss - parâmetro de quenching não fotoquímico da média de 10 plântulas de *Inga laurina* em função do tempo, após serem submetidas após 30 dias da embebição a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de CuONPs.

4.1.7 Fluorescência estacionária – sementes e plântulas

Os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm (Figura 25) . As medidas foram realizadas nos cotilédones das sementes, conforme Figura 11 (item 3.0 metodologia). Foi possível observar que o tratamento com 300 mgL^{-1} apresentou um maior pico de fluorescência de moléculas de clorofila (Chla), seguido pelo (0) Controle, logo após o tratamento com 100 e 200 mgL^{-1} , e sendo o tratamento com 50 mgL^{-1} com a menor fluorescência. Esse parâmetro corrobora com os resultados dos outros parâmetros como (Fm_lss), (Qy_max) e (NPQ_Lss), encontrados na fluorescência modular por imagem, em que, semente/ plântula indicam menor fluorescência na concentração de 50 mgL^{-1} CuONPs e maior fluorescência nas maiores concentrações, durante as 168h.

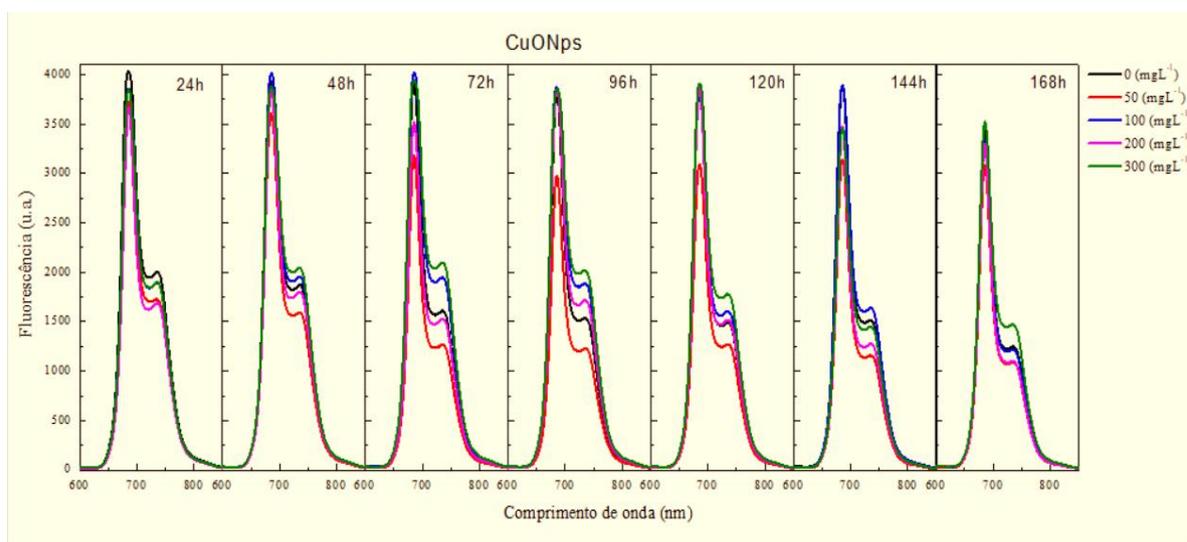


Figura 25: Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionaria ao longo do tempo da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de CuONPs.

4.1.7.1 Razão de fluorescência F685/F735

Análise dessa razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila *a*, Figura 26. Nota-se que houve alterações no teor de clorofila das sementes com

CuONPs, sendo o tratamento com 300 mgL^{-1} com uma menor média de fluorescência da molécula de clorofila (*Chla*). Para que obtivéssemos mais informações foi realizada a razão de fluorescência F685/F735 destas duas bandas, assim fornecendo mais informações sobre o estado fisiológico e o conteúdo de clorofila das plantas. Essa relação é usada para quantificar a eficiência máxima do FSII (BUSCHMANM et al., 2007). Na análise do conteúdo de clorofila, a razão de fluorescência é um indicador do estresse oxidativo (LU et al., 2000).

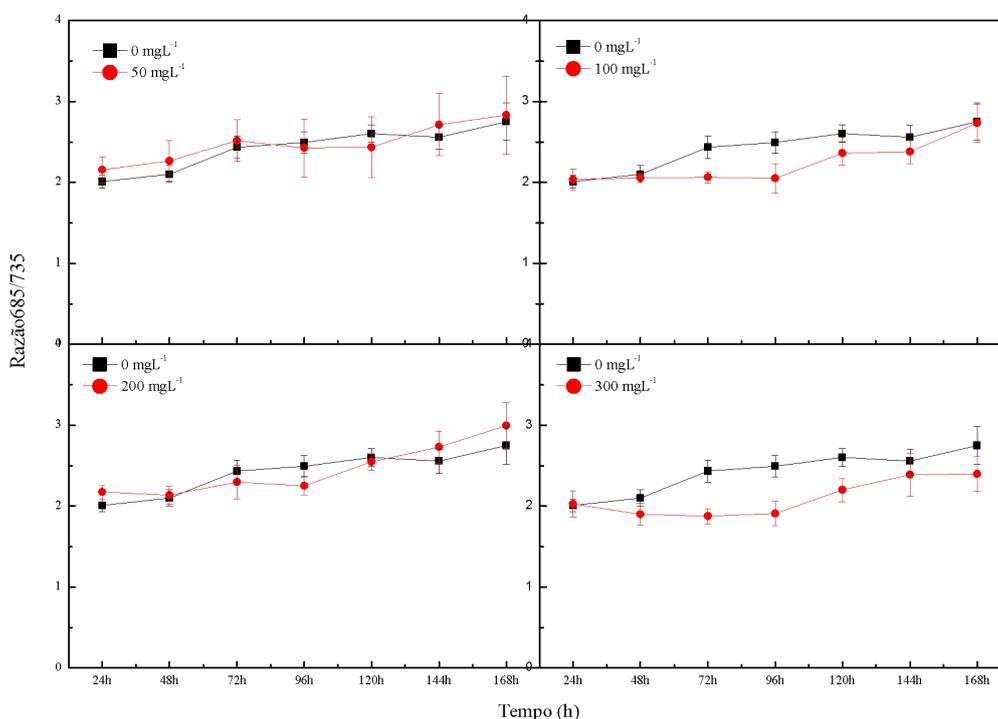


Figura 26: Razão F685/F735 em função da concentração de CuONPs, com excitação em 405 nm, em 168h de germinação (7 dias).

Nossos resultados revelam um aumento na relação F685/F735 em função do tempo. A razão de fluorescência red-far depende do conteúdo da clorofila (CEROVIC et al., 1999). Estes resultados podem ser atribuídos ao consumo de suas próprias moléculas de clorofila como reservas, pois quanto maior essa proporção, menor a concentração de clorofila devido à reabsorção seletiva do vermelho em relação à fluorescência far-red pelas moléculas de clorofila (GITELSON et al., 1998; CEROVIC e outros, 1999; CAIRES et al., 2010).

4.1.8 Fluorescência estacionaria- folíolo

Figura 27 mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas no 3º par de folhas de metáfilos, em plantas classificadas como plântulas, após o seu 30º dia após germinação. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente. Foi possível observar que o tratamento com 100 e 300 mgL⁻¹ apresentou um maior pico de fluorescência de moléculas de clorofila, enquanto que o tratamento 50 mgL⁻¹ apresentou o menor pico, possivelmente pelo maior consumo de clorofilas como reserva e pelo aumento do fluxo de elétrons e linearidade na intensidade de fluorescência nos maiores tratamentos durante o período germinativo.

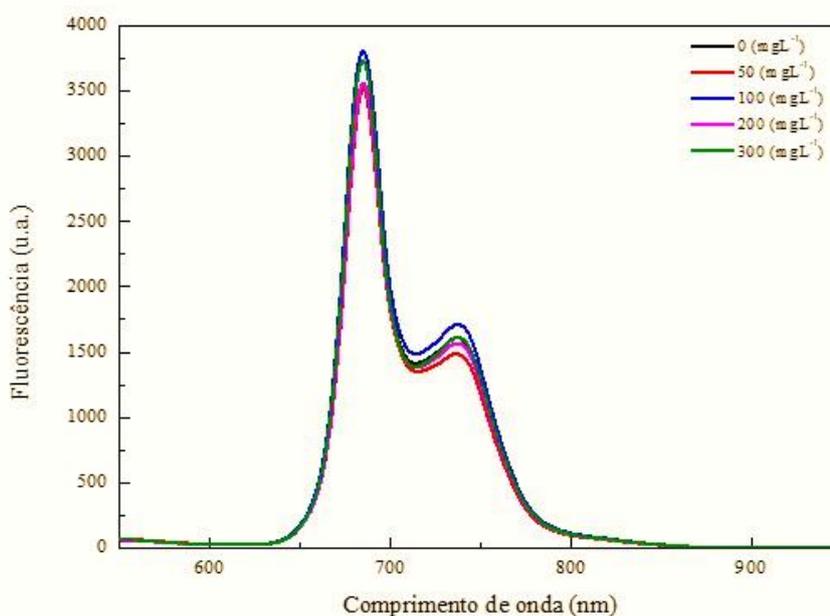


Figura 27: Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionaria da média de 10 plântulas de *Inga laurina*, após 30 dias de serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs.

4.1.9 Análises termográficas – sementes

Análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de nanopartículas de óxido de cobre (CuONP) (Figura 28). De modo geral, a temperatura superficial das sementes variou ao longo do tempo nas diferentes concentrações de CuONPs, maior diferença significativa entre controle e NPs foram observadas nas maiores concentrações (200 e 300 mgL⁻¹). No início houve uma queda na temperatura, até 96h, em seguida uma elevação da mesma também foi observada para todas as concentrações.

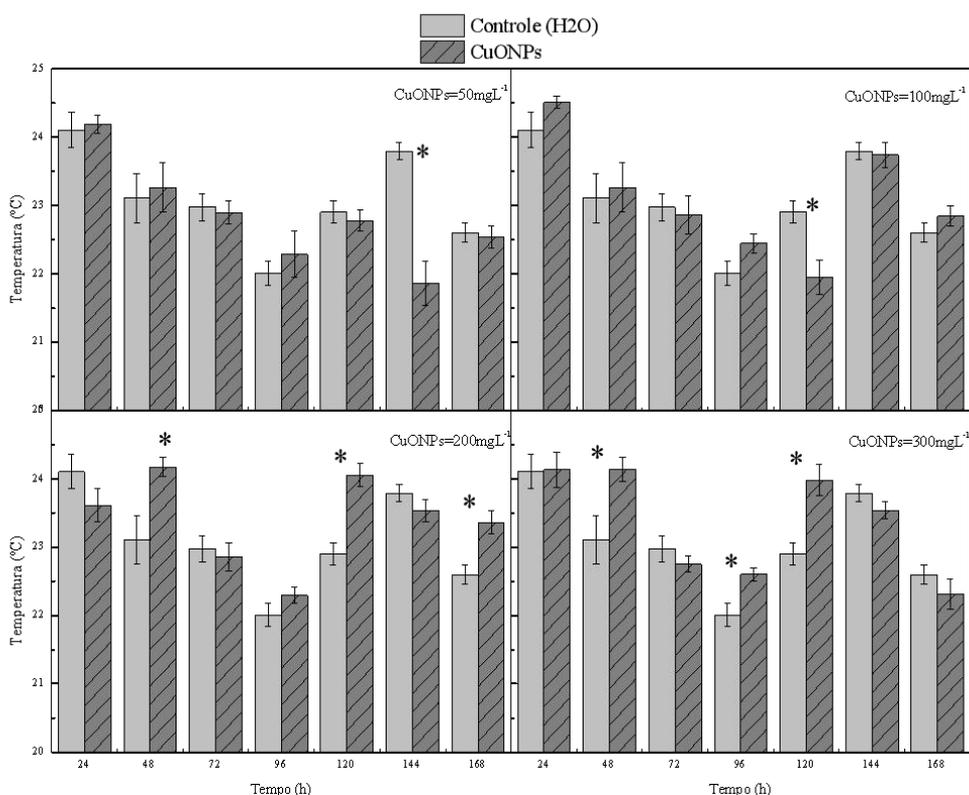


Figura 28: Temperatura média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo em todas as concentrações de CuONPs comparadas com a controle (0 mgL⁻¹). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n =10).

As modificações na temperatura superficial de sementes em germinação podem ser associadas, num primeiro momento, as reações de exotermia ou endotermia durante a

embebição. Uma vez que os potenciais de água da semente são zerados (FASE II), o conteúdo de água não se altera, o que só volta a ocorrer na terceira fase do processo germinativo, durante a mobilização das reservas.

Embora para sementes ortodoxas as variações no conteúdo de água possam influenciar a temperatura das sementes, para as sementes recalcitrantes (como é o caso do *Inga laurina*) as variações de temperatura na superfície são mais bem explicadas pelas alterações na atividade metabólica.

4.1.10 Análises termográficas – folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação com a mesma metodologia das sementes de *Inga laurina*, as folhas foram submetidas a análises da temperatura superficial (Ts), foram realizadas enquanto estavam adaptadas a 30 minutos no escuro. Na concentração controle obteve a média inferior a todas as concentrações de (CuONPs), sendo o tratamento com 300 mgL⁻¹ com a maior temperatura superficial (Ts). Indicando o aumento das (Ts) nas maiores concentrações de até 1 grau C° (Figura 32). A temperatura foliar pode ser usada como um indicador relevante do grau de estresse em plantas. Ressalta-se ainda que a transpiração é o principal mecanismo envolvido na regulação da temperatura foliar devido às menores aberturas estomáticas e, por consequência, ocorrem diminuição da transpiração foliar e aumento da temperatura da folha, por conta da redução da dissipação do calor latente sinalizando que a capacidade de refrigeração das plantas diminui via transpiração (VIEIRA JÚNIOR et al., 2007; KUMAR e PORTIS JÚNIOR, 2009).

Em plantas jovens não é possível correlacionar o NPQ_{Lss} com a temperatura, pois o quenching não-fotoquímico é o decréscimo do rendimento quântico da fluorescência associado à dissipação termal da energia de excitação (POSPISIL et al., 1997).

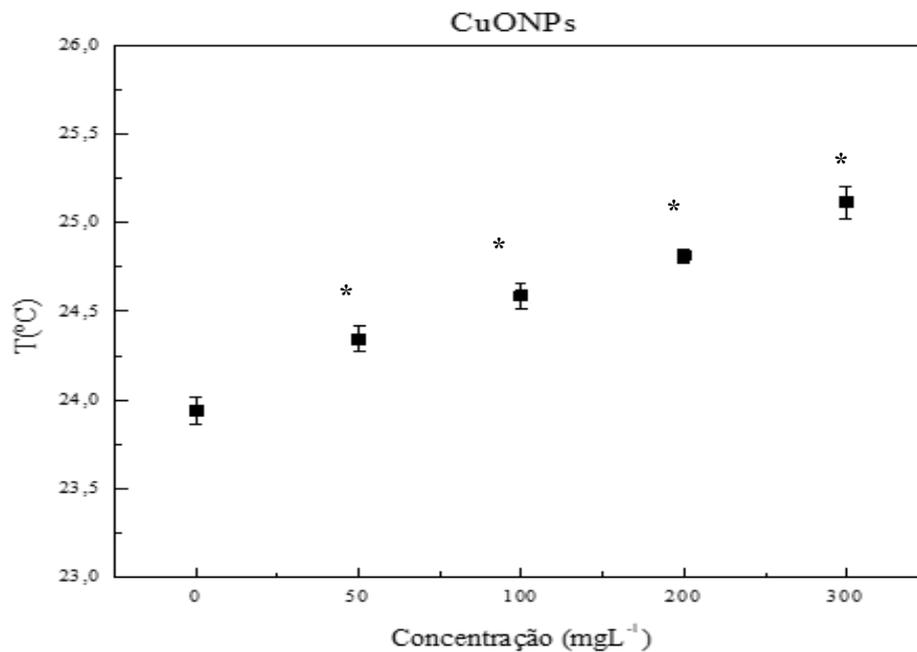


Figura 29: Temperatura de plântulas de *Inga laurina* em todas as concentrações de CuONPs comparadas com a controle (0 mgL⁻¹). * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n =10).

A temperatura, por sua vez, apresentou uma tendência de aumento em alguns casos específicos, indicando que a energia perdida por vias não-fotoquímicas está sendo dissipada de outras maneiras. A mais provável delas pode ser atribuída à desativação da cadeia de transporte de elétrons (CTE), sendo a energia dissipada pela transferência dos elétrons da CTE para a superfície das partículas metálicas. É certo que este fenômeno acarreta uma cascata de efeitos que prejudicam a saúde do vegetal e que muito provavelmente são responsáveis pelas alterações observadas nos parâmetros fisiológicos analisados neste trabalho: a desativação da CTE reduz o rendimento do PSII e conseqüentemente a produção de ATP e NADPH, que por sua vez afetam o funcionamento do ciclo de Calvin, implicando numa menor taxa de fixação de carbono (pela Rubisco) e também numa menor taxa de regeneração da RuBP (que é limitada pela CTE) (FALCO et al, 2018).

O quenching não-fotoquímico está relacionado ao incremento da energia de excitação não-radiativa, envolvendo formação de calor ou transferência para o PSI não-fluorescente (SCHREIBER et al 1.,1998). Não é possível atribuir totalmente a dissipação não fotoquímica,

mas quando comparado a média de (*Fm_{lss}*), após 30 dias de germinação, indica que o aumento da temperatura não está relacionado com a maior média de *NPQ*. Nas maiores concentrações como a de 300 mgL⁻¹ foram obtidos a média de *NPQ* inferior, a média de temperatura maior e a média de *Fm_{lss}* menor que a dose Controle (0).

4.1.11 Índice de germinação e tamanho da raiz

4.1.11.1 Índice de germinação e comprimento da radícula das sementes

Os resultados de germinação, para todas as sementes colocadas nas placas petri, em todas as concentrações, foi de 100%, isto é, todas as sementes com tratamentos germinaram igualmente (Figura 30). Verifica-se que as sementes de *Inga laurina* apresentaram a mesma capacidade de germinação. Diante disto, reafirma-se a natureza recalcitrante e alta germinabilidade, características estas presentes nas espécies do gênero Ingá (RODRIGUES et al., 2007). Com relação ao índice de velocidade de germinação – IVG da espécie, os resultados demonstram que as sementes apresentaram velocidade de germinação não significativa. Os valores de porcentagem de germinação foram transformados em Arc. Sem. (x/100). 0,5 (BANZATTO et al., 2006).

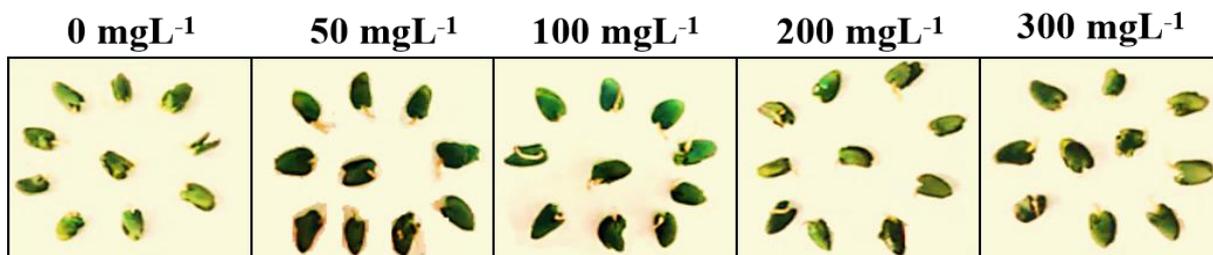


Figura 30: Imagem do último dia de germinação 168h de plântulas de *Inga laurina*, para concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ CuONPs. Foto: Daniela Graciano

Em todos os tratamentos houve redução do comprimento da raiz após o período de germinação (Figura 31). As menores médias foram para o tratamento de 50 mgL⁻¹, porém em todas as concentrações foi observado redução em relação ao Controle. Reduções no crescimento das raízes podem ser observadas quando plantas são submetidas às condições adversas. Registros de redução no CR em plantas expostas a NPs, em pesquisa realizada com *Cicer arietinum L* (grão-de-bico) exposta a diferentes concentrações de CuONPs foi demonstrado que as NPs interferiram no crescimento da planta, causando um retardo no crescimento das raízes e do caule (NAIR et al., 2015).

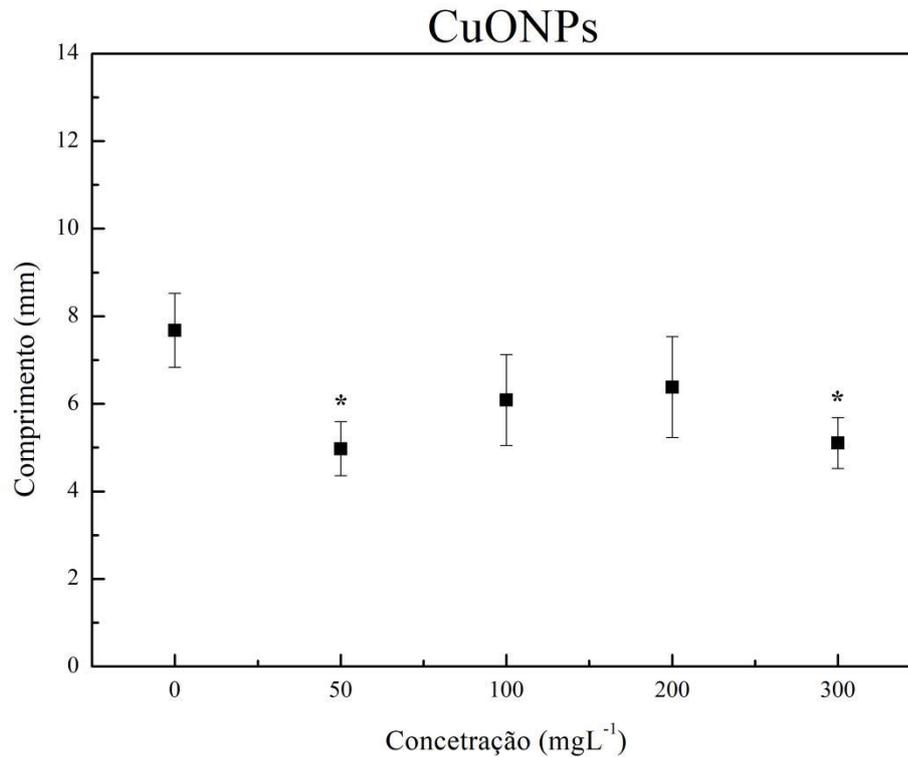


Figura 31: Comprimento da radícula após 168 h do período de embebição das sementes de *Inga laurina*, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs.

Em um trabalho, em que se avaliou o crescimento de arroz sob três diferentes níveis de estresse causados por CuONPs, concluiu-se que a porcentagem de germinação foi significativamente reduzida (SHAW et al., 2013). Outro estudo mostrou, também, os efeitos de nanopartículas de óxido de cobre sobre a germinação de mudas de ervilha verde, em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que houve uma redução significativa no crescimento das plantas (tanto no comprimento de brotos e quanto nas raízes), bem como aumento de espécies reativas de oxigênio e geração de peroxidação lipídica, que é a degradação oxidativa dos lipídios (NAIR et al., 2015).

No geral, sob as concentrações o CR foi menor que sob o Controle, porém o tratamento com 50 mgL⁻¹ se mostrou mais sensível ao longo de todos os parâmetros estudados (Figura 35). O encurtamento das raízes implica em severo dano as plântulas, pois em ambientes naturais são comuns a competitividade entre espécies afetando o estabelecimento e crescimento. Biologicamente, sementes representam uma fase do desenvolvimento vegetal

mais sujeita às intempéries/variações do meio, sobretudo, durante o período de dispersão, já as plântulas, de modo geral aparecem posteriormente, quando as condições foram minimamente favoráveis à germinação das sementes. A plântula pode ser, no entanto, mais suscetível que a semente (BELTRATI et al., 2003).



Figura 32: Comprimento da raiz de sementes, após 168h após embebição com concentrações de CuONPs.

Foto: Daniela Graciano

4.1.11.2 Tamanho da raiz das plântulas

O menor crescimento das raízes nas plantas submetidas a CuONPs quando comparadas as controle (Figura 33) sugerem efeitos de toxicidade.

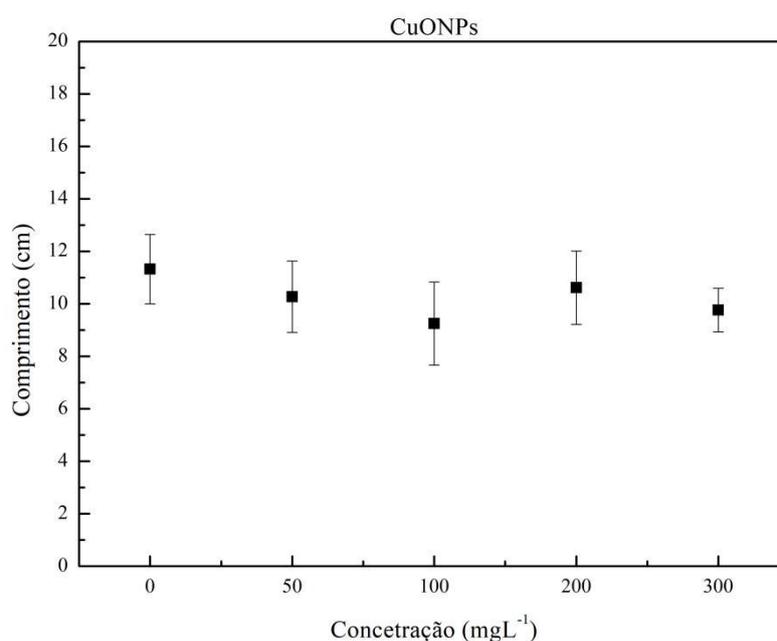


Figura 33: Comprimento das raízes das plantulas de *Inga laurina* após 30 dias de plantio em casa de vegetação.

De modo geral, o sintoma de toxicidade está comumente relacionado ao excesso de Cu nas raízes é a redução no seu comprimento (OUZOUNIDOU et al., 1995; KOPITTKKE et al., 2009; LEQUEUX et al., 2010), possivelmente por causa da diminuição na frequência da divisão celular no ápice radicular, inibindo assim o crescimento do eixo radicular (JIANG et al. 2001). Estas alterações no ápice, uma região extremamente delicada da raiz, por sua vez, promove diversas modificações locais, como a redução da coifa e a maturação precoce dos tecidos, como relatado para videira (AMBROSINI et al., 2015) e para aveia preta (GUIMARÃES et al., 2016). A redução da coifa, ou mesmo sua ausência, interfere nas demais regiões da raiz e compromete seu desenvolvimento (AMBROSINI et al., 2015; GUIMARÃES et al. 2016), já que uma das funções desta importante estrutura é proteger as células que estão em processo de divisão (MARSCHNER, 2012).



Figura 34: Comprimento da raiz, após 30 dias após embebição de 0 e 50 mgL⁻¹ CuONPs. Foto: Daniela Graciano

4.1.12 Análise do extrato

O extrato de clorofila das plântulas de *Inga laurina*, cultivados em casa de vegetação, após 30 dias da exposição a diversas concentrações de CuONPs, apresentou menor absorção de fluorescência na Controle do que nas demais concentrações (Figura 35).

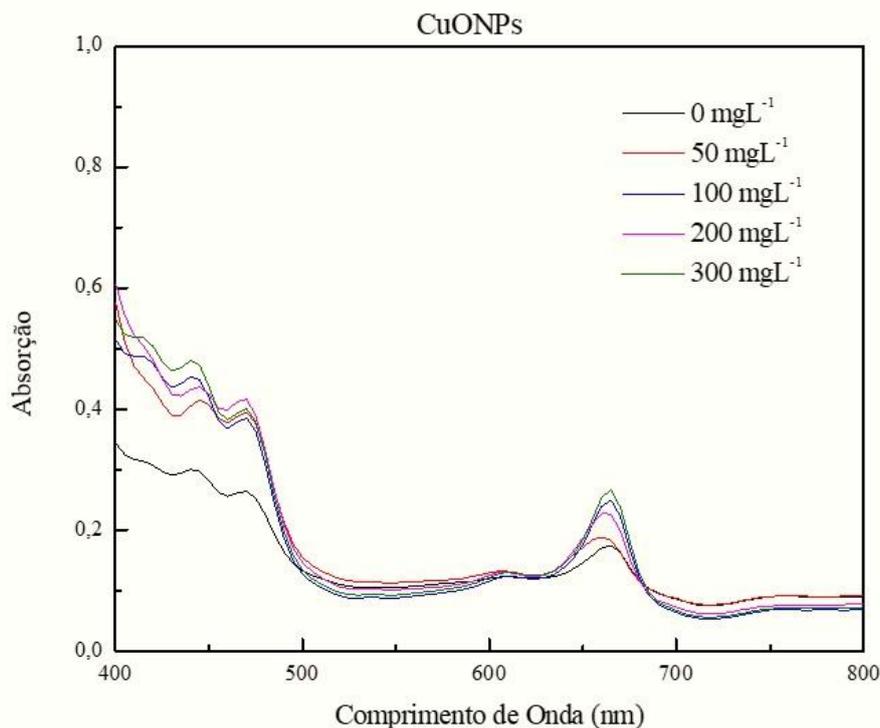


Figura 35: Espectro de Fluorescência Uv/vis de folhas de *Inga laurina*, após 30 Dias de embebição de quatro concentrações de CuONPs.

O aumento do teor de clorofila nas maiores concentrações corrobora com a maior F_m e maior rendimento de Q_y (F_v/F_m). Porém resultando no encurtamento do comprimento da raiz (CR), evidenciou que todos os tratamentos produziram alterações fisiológicas nas plantas tratadas em relação a (0) Controle. Em diversos estudos constatou-se diminuição nos teores de clorofila *a* e *b* nas folhas, no total das concentrações elevadas de Cu.

Diversos autores (MATEOS-NARANJO et al. 2008; YRUELA et al., 2013; ADRESS et al., 2015) relataram o efeito do excesso de cobre sobre a clorofila resultando em degradação desse pigmento. Entretanto, é interessante ressaltar que em plantas tolerantes, o conteúdo de clorofila pode aumentar ou não sofrer alterações significativas em resposta ao tratamento com metais (BORGHI et al. 2007).

Os sintomas de toxicidade causados pelo excesso de Cu e Zn são expressados no organismo vegetal devido a uma gama de interações que ocorrem em nível molecular e celular. Um sintoma bastante comum é a clorose, observada quando há redução do conteúdo de clorofilas nas folhas jovens (YANG et al., 2011).

Em trabalhos com diferentes espécies, como feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), milho (*Zea mays* L.) e aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), cultivados em solos com altos teores de Cu e Zn, foram observados decréscimos nos teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides (SANTANA et al., 2015; TIECHER et al., 2016a; 2016b). Videiras submetidas a altas concentrações de Cu também apresentaram redução acentuada de pigmentos fotossintéticos (CAMBROLLÉ et al.; 2013b; ROSA et al., 2014).

A diminuição de pigmentos clorofilados pode ser atribuída ao efeito adverso do excesso desses metais no transporte de elétrons na fotossíntese, causando diminuição da síntese ou o incremento da degradação de clorofila (CAMBROLLÉ et al., 2012; TIECHER et al., 2016a), possivelmente por fotoxidação. Porém nas maiores concentrações não foram encontrados a diminuição e sim o aumento desses pigmentos, sugerindo respostas de stresse fisiológico.

O teor de Clorofila *b* nas plântulas de *Inga laurina* foi maior que o teor de clorofila *a* (Figura 35). O aumento da clorofila *b* em plantas pode ser devido a um aumento da proporção do complexo coletor clorofila *a/b*-proteína, em relação ao complexo P-700-clorofila *a*-proteína. (MEBRAHTU et al., 1991). Ambas as clorofilas são componente das membranas dos cloroplastos e ocorrem na razão clorofila *a*/clorofila *b* de aproximadamente 3:1 (LICHTENTHALER et al, 1981). Plantas expostas a elevados fluxos de fótons fotossintéticos (FFF) apresentam razões clorofila *a/b* em torno de 3,2 a 4,0 e plantas crescendo em ambientes com reduzidos (FFF) possuem razões *a/b* em torno de 2,5 a 2,9 (SEYBOLD E EGGLE, 1970).

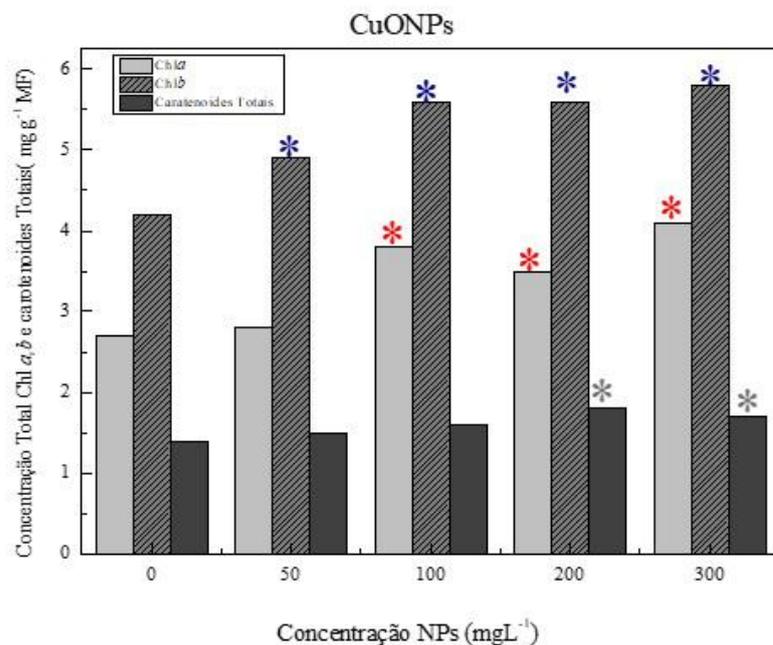


Figura 36: Medias de Clorofila (a e b) e carotenoides em plântulas de *Inga laurina* após 30 dias, após embebição com concentrações de CuONPs.

O teor de Clorofila total de plântulas de *Inga laurina* após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de CuONPs, o tratamento controle teve o menor teor de clorofila, seguido pela concentração 50 mgL⁻¹, já nas demais concentrações o teor de clorofila é superior (Figura 37). A concentração total de clorofila foi aumentando em relação ao Controle, sendo a transformação de clorofila *b* em *a* um efeito fotoprotetor. Para proteger suas células dos efeitos tóxicos das EROs as plantas dispõem de um sistema de defesa composto por antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, que trabalham em conjunto e em sincronia detoxificando as EROs produzidas e fazendo com que os vegetais superem a situação de estresse e recuperem a homeostase celular (MARTINEZ et al., 2010).

Dentre os principais metabólitos antioxidantes não enzimáticos encontram tocoferol e os carotenoides. Nas plantas, o aumento na concentração dessas moléculas pode indicar um aumento na tolerância ao estresse por metais (DIETZ et al., 1999). Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (DEMMIG e ADAMS, 1992).

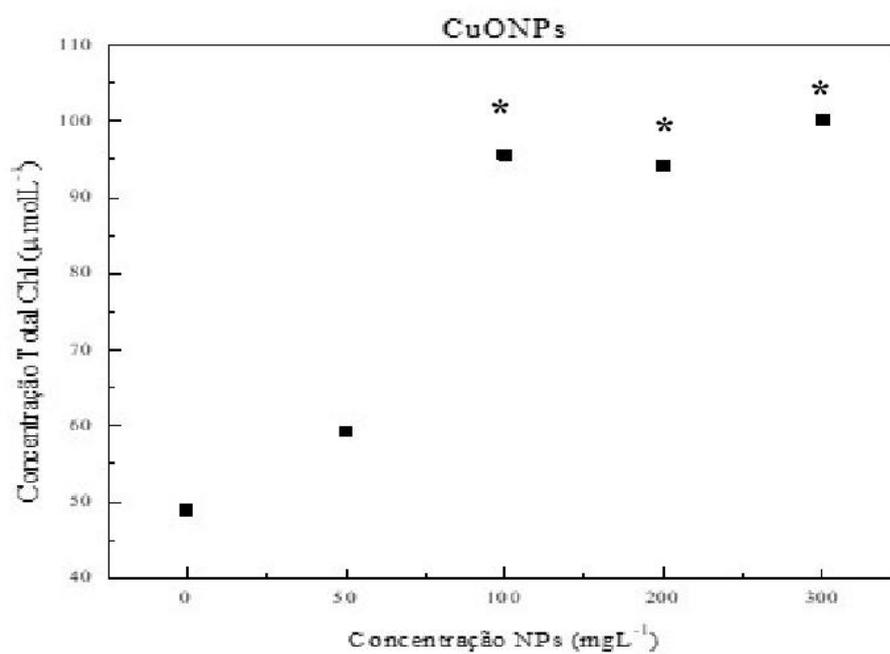


Figura 37: Médias de Clorofila Total (*a e b*) em plântulas de *Inga laurina* após 30 dias de embebição com concentrações de CuONPs.

4.2 Fe₂O₃NPs

4.2.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (*Fm_Lss*) – sementes e plântulas

Observou-se diferença de gradiente de pixel através das imagens para os tratamentos: 0 mgL⁻¹, 50 mgL⁻¹ e 300 mgL⁻¹. Observou-se, ainda, aumento de *Fm_Lss* as 48h e declínio as 72h, aparentemente, tendência de que as Fe₂O₃NPs tenham favorecido o consumo de clorofila como reserva e potencializado a *Fm_Lss* nas primeiras horas, porém diminuíram a intensidade a partir das 120h. Sob todas as doses houve a diminuição de intensidade em relação ao Controle a partir das 96h.

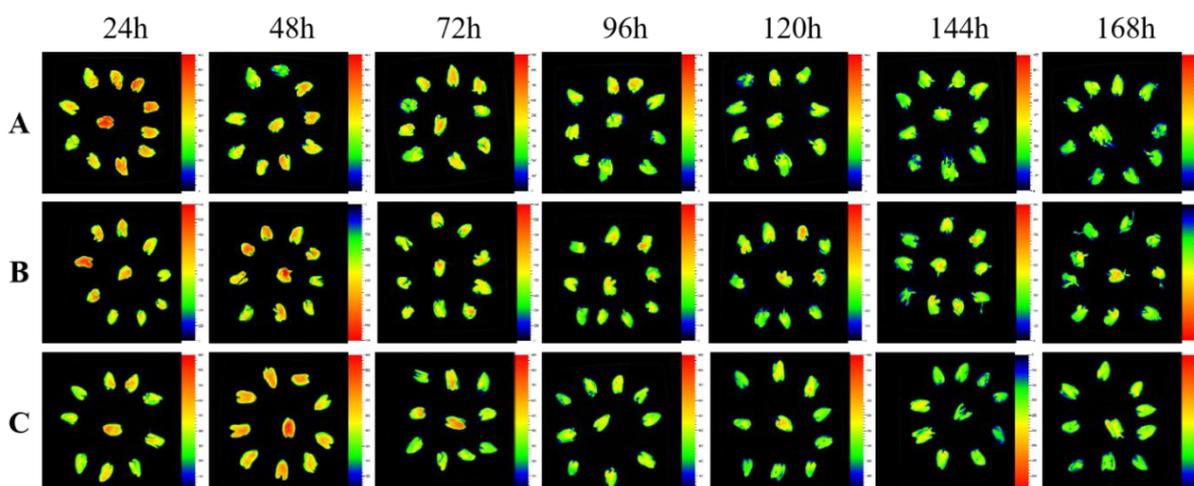


Figura 38: (A) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o *Fm_Lss* no período de 24 a 168h, após a imersão em 0 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs; (B) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o *Fm_Lss* no período de 24 a 168h, após a imersão em 50 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs; (C) Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o *Fm_Lss* no período de 24 a 168h, após a imersão em 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

Nos testes estatísticos, o tratamento 50 mgL⁻¹ Fe₂O₃NPs obteve média com diferença estatística nas 24h e 48h de germinação, sendo nas 24h após o período de embebição, o tratamento (0) Controle com maior a média de (*Fm_Lss*), e já no período de 48h tratamento 50 mgL⁻¹ com maior média de (*Fm_Lss*), terminando o período germinativo de sete dias (168h) os dois tratamentos com valores médios aproximados, sugerindo a recuperação da semente/plântula aos 168 dias. No tratamento 100 mgL⁻¹, a média com diferença estatística foi em 48h de germinação, com a (*Fm_Lss*) maior para o tratamento com concentrações de Fe₂O₃NPs. No tratamento 200 mgL⁻¹ Fe₂O₃NP a média com diferença estatística foi no

período de 48h de germinação, sendo a (*Fm_*lss) maior no tratamento com as concentrações de Fe₂O₃NPs. No tratamento 300 mgL⁻¹ a média com diferença estatística foi em 24h de germinação, com o tratamento (0) Controle com maior (*Fm_*lss), porém no restante dos dias da germinação, os tratamentos apresentaram valores médios de (*Fm_*lss) próximos (Figura 39).

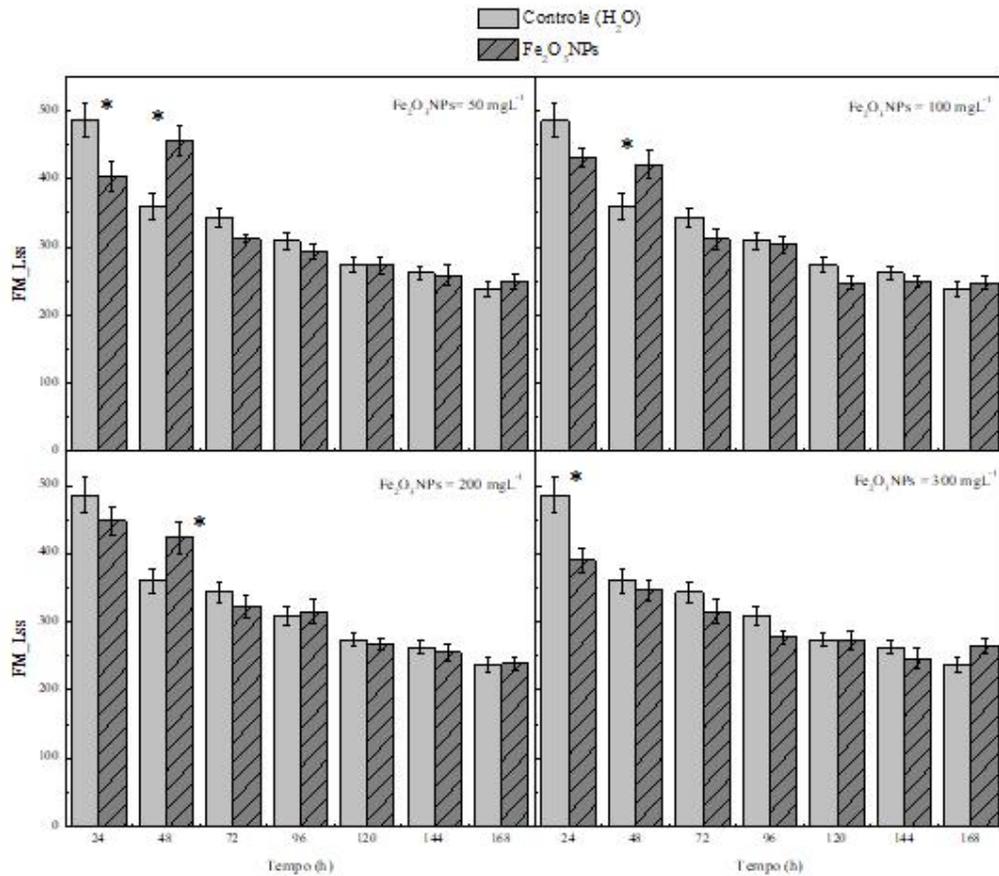


Figura 39: *Fm_*Lss média de 10 sementes de *Inga laurina*, em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).

Fe₂O₃NPs interferem de alguma forma nas transferências eletrônicas, potencializando a energia modulada entre 48 e 72h após embebição. Porém após 96h começam a perder emissão como é possível observar na figura 49, que apresenta o *Fm_*lss em uma tentativa de explorar mais os resultados e tentar entender os acontecimentos fisiológicos(Figura 39).

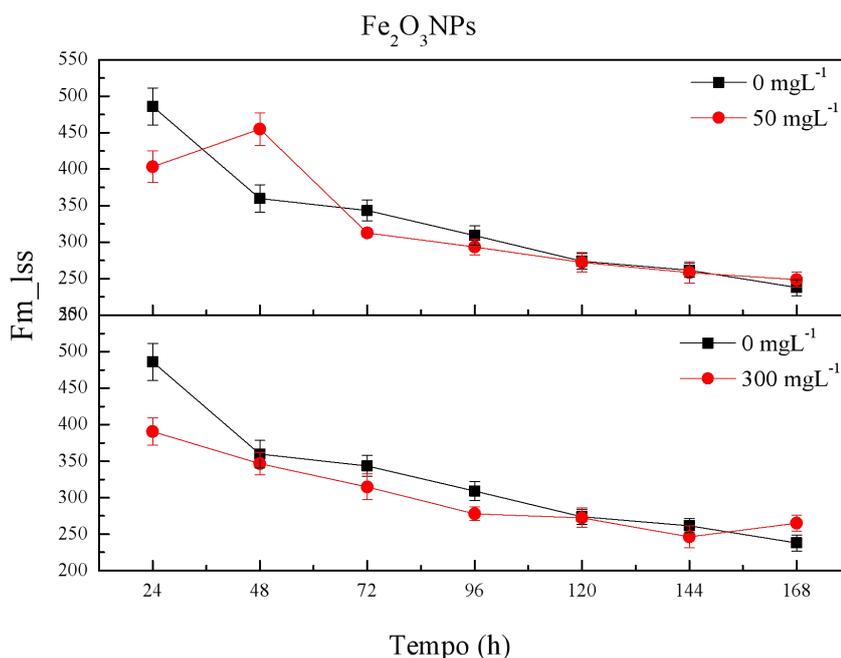


Figura 40: *Fm_Lss* de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

4.2.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (FM_Lss) - folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram submetidas a Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia do período de germinação. Observou-se que, sob 50 e 100 mgL⁻¹ foi obtido as maiores médias de (*Fm_Lss*) e os tratamentos 200 e 300 mgL⁻¹ com a menor *Fm_Lss*. Indicando menor tolerância nas maiores concentrações e assim tendo a (*Fm_Lss*) reduzida em relação ao tratamento (0) Controle (Figura 40). (SAQUIB et al., 2016) ao utilizarem modelo vegetal (*Raphanus sativus*) demonstraram que o potencial genotóxico da NPs de (Fe₂O₃) está relacionado à concentração. Os autores relatam que as NPs agem no interior da célula, liberando íons tóxicos e ocasionando o estresse oxidativo, levando à alteração do funcionamento mitocondrial e danos ao DNA. Estes danos no material genético comprovam a necessidade de aprofundamento nos estudos sobre a toxicidade das NPs. (ZUVERZA-MENA et al., 2017) (RIZWAN et al., 2017).

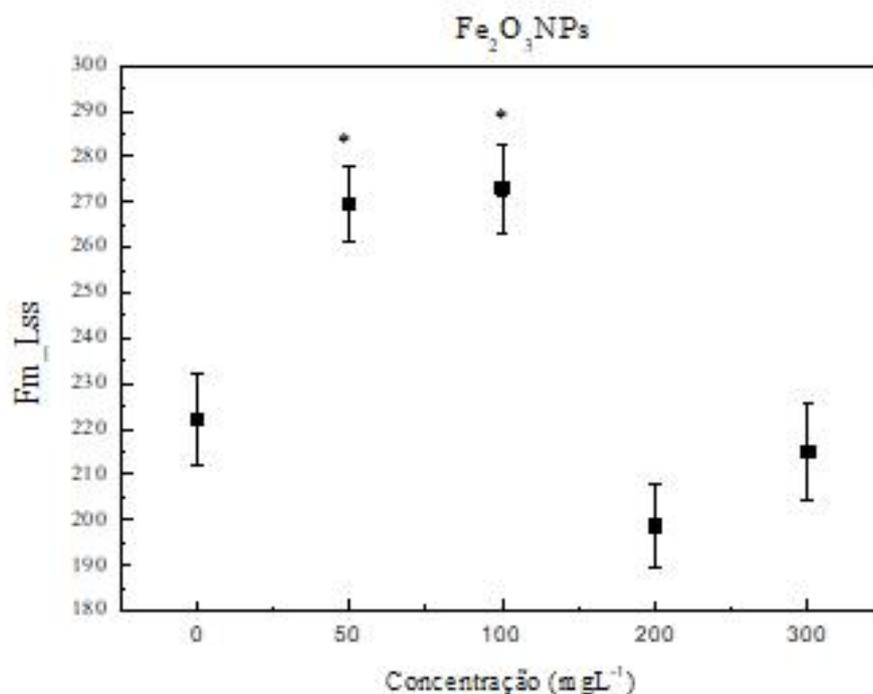


Figura 41: Fm_{Lss}' média de 10 plântulas de *Inga laurina*, após 30 dias após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

De modo geral, as menores concentrações apresentam média de (Fm_{Lss}) superiores ao tratamento (0) Controle, apresentando mais tolerância ao longo do período germinativo, que as maiores concentrações. Sugerindo que, nas maiores concentrações, tenha havido um aumento na dissipação não fotoquímica (NPQ_{Lss}), como mostra figura 46, assim dissipando energia em forma de calor. E na menor concentração, o Fe₂O₃NPs pode ter beneficiado as transferências eletrônicas sob doação de elétrons. Já é conhecido pela ciência que muitos dos compostos fenólicos atuam como sequestradores de radicais livres enquanto outros agem como quelantes de metais catalisadores de reações de geração de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL et al., 2007; FLOEGEL et al., 2011), sendo capazes de retardarem ou inibirem a velocidade de oxidação das biomoléculas e, conseqüentemente, os danos oxidativos no organismo (HALLIWELL et al., 2007).

O mecanismo de ação dos antioxidantes pode ocorrer por interrupção das cadeias de reações oxidativas, através do bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, ou agindo como doadores de prótons e elétrons impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres (HALLIWELL et al., 2007; PEKAL et al., 2011).

Analisando todos os parâmetros após 30 dias de embebição em doses de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, é possível observar que houve uma maior dissipação não fotoquímica (NPQ_{Lss}) e um aumento de rendimento químico (Qy_{max}) e maior temperatura superficial (T_s) em plantas jovens submetidas a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, nas maiores concentrações.

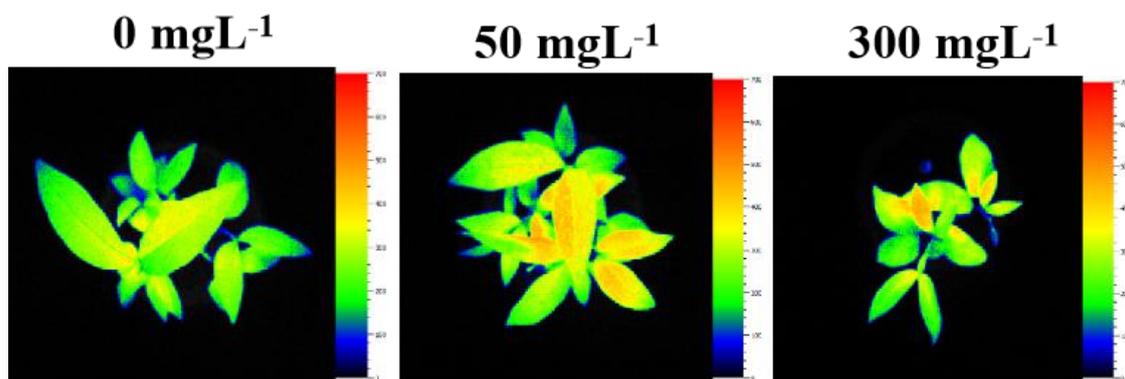


Figura 42: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de *Inga laurina* para (Fm_{Lss}), nas concentrações de 0, 50 e 300 mgL^{-1} de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, aos 30 dias após germinação.

4.2.3 Eficiência fotoquímica (Qy_{max}) – semente e plântulas

Os resultados sugerem mudanças induzidas por $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$ em cloroplastos fotoquímicos ativos durante reações de germinação e hidrólise. O rendimento quântico da conversão de energia fotoquímica em FSII (Qy_{max}) em função do tempo para sementes de *Inga laurina* expostas a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$ em (A) 0 mgL^{-1} , (B) 50 mgL^{-1} , (C) 300 mgL^{-1} (Figura 43). As alterações observadas também são dependentes de tempo e dose. Após a exposição na maior concentração de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, a máxima eficiência da atividade fotoquímica do FSII, já está aumentando antes da protrusão do radicular. Este resultado sugere uma alta atividade metabólica em sementes, como uma possível forma de minimizar os impactos dos $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$.

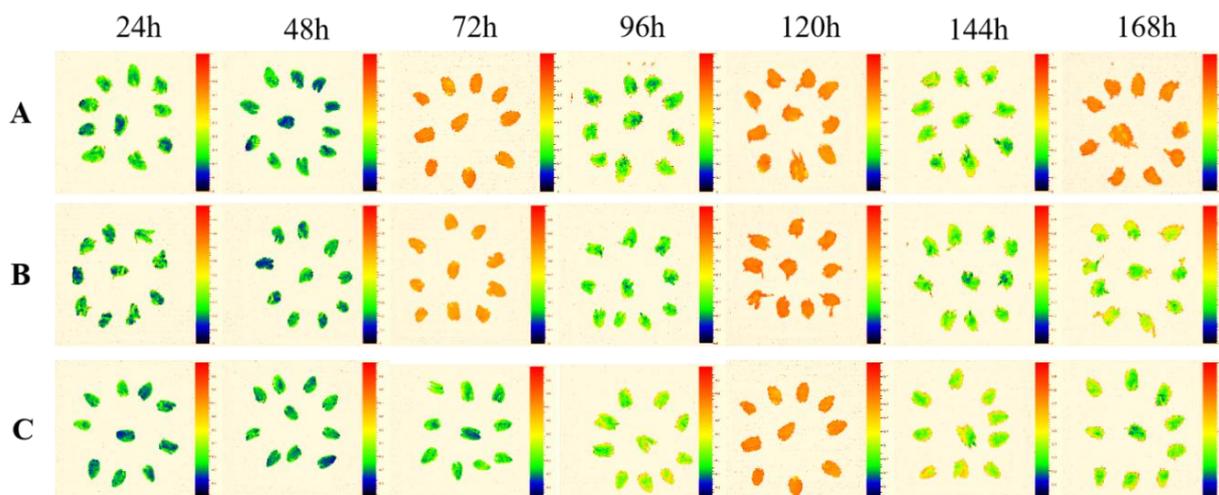


Figura 43: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica (Qy_{max}): (A) 0 mgL⁻¹, (B) 50 mgL⁻¹, e (C) 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

O rendimento da eficiência fotoquímica (Qy_{max}) da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs (Figura 44). O tratamento 50 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs, após 24h do período de embebição da semente, apresentou média maior, e a partir de 48h de germinação se aproximou da média do tratamento (0) Controle no período de 72h e 96h de germinação e as 120h, 144h e 169h de germinação superou o (Qy_{max}) do tratamento (0) Controle. Para a dose de 100 mgL⁻¹, o (Qy_{max}) destas concentrações superaram a média do tratamento (0) controle a partir de 48h de germinação até o ultimo dia 168h, assim obtendo o maior (Qy_{max}), com diferença significativa a partir das 48h. Já para o 200 mgL⁻¹, as médias de (Qy_{max}) também são maiores nas 48h, 144h e 168h de germinação em relação a dose controle, após as 48h há um declínio no Qy_{max} e, esse, se iguala ao controle, isso ocorre até as 120h. No tratamento 300 mgL⁻¹ as médias de (Qy_{max}) são maiores que a dose Controle, indicando maior (Qy_{max}) quando submetidas a Fe₂O₃NPs.

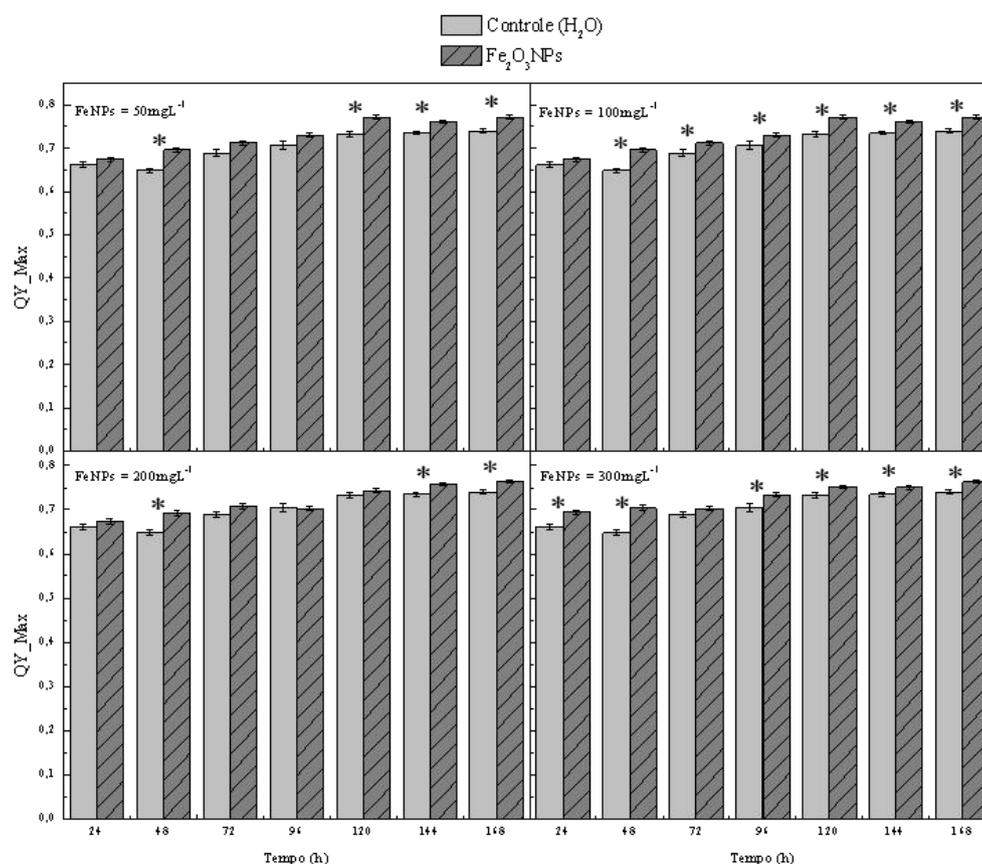


Figura 44: Q_y_{max} - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).

Para todas as concentrações do tratamento de Fe₂O₃NPs as médias foram superiores ao tratamento Controle, para todos os dias analisados. O rendimento quântico máximo é calculado como: Fv/Fm. Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão $Q_y_{max} = Fv/Fm$ deve variar entre 0,75 e 0,85 (BOLHÀR- NORDENKAMPF et al., 1989). Em todas as concentrações de Fe₂O₃NPs, o parâmetro (Q_y_{max}) obteve médias com diferenças significativas apontando que, a partir do período de 96 horas, o rendimento fotoquímico foi maior em relação ao tratamento Controle, indicando uma provável eficiência da dissipação de calor, em razão do aumento no gradiente de prótons entre o lúmen e o estroma do cloroplasto (GENTY et al., 1989; MAXWELL e JOHNSON, 2000).

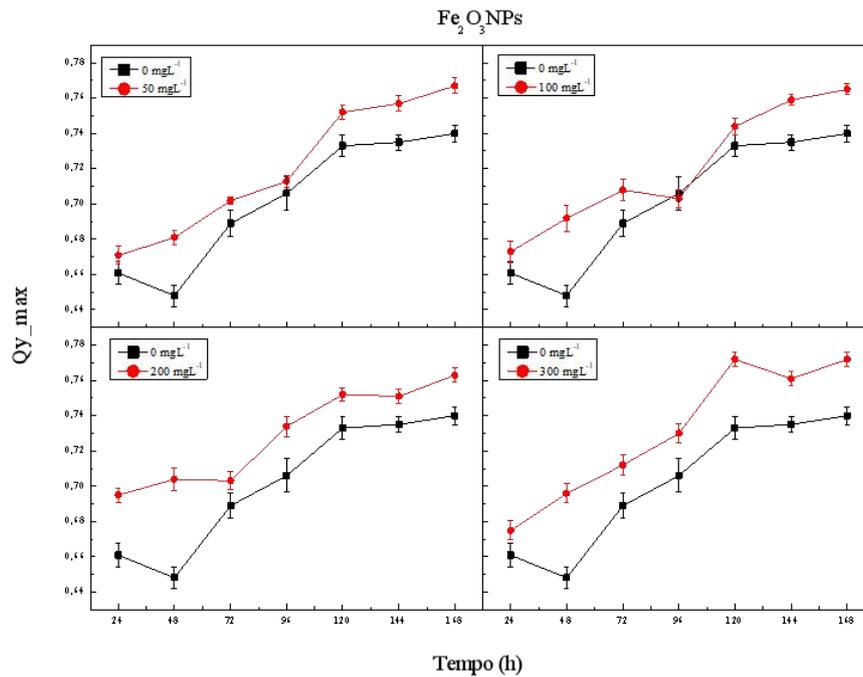


Figura 45: $Q_{y_max} = (F_v/F_m)$ - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mg L⁻¹ de Fe_2O_3NPs .

4.2.4 Eficiência fotoquímica (fv/fm) – folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram avaliadas por Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia utilizado no período de germinação. Foi avaliado a eficiência do rendimento fotoquímico da fotossíntese pelo parâmetro (Q_{y_max}) das plântulas de *Inga laurina* submetidas no período de germinação com concentrações de nanopartículas de oxido de ferro (Fe_2O_3NPs) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹. Nota-se que na concentração de 100 mgL⁻¹, após este período de 30 dias, a plântula se tornou mais sensível ao tratamento, apresentando a menor média de rendimento fotoquímico (Q_{y_max}). Para as outras concentrações o valor do Q_{y_max} ficou próximo ou superior ao Controle.

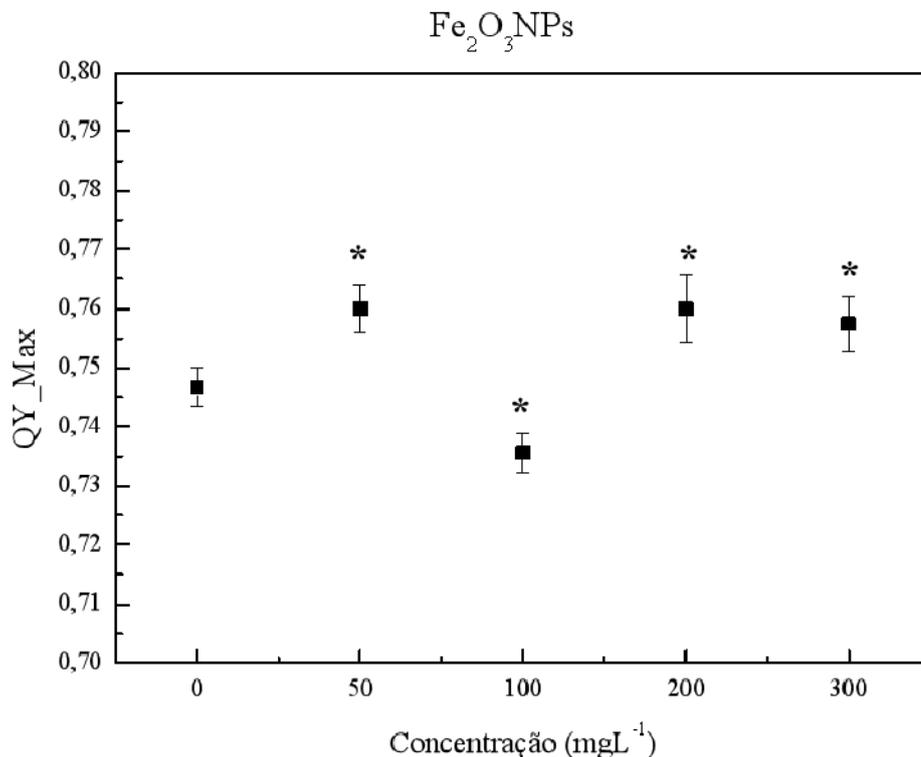


Figura 46: $Q_y\text{-max}$ - parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de plântulas de *Inga laurina*, após 30 dias de exposição a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$.

4.2.5 Supressão não-fotoquímica (NPQ_Lss) – sementes e plântulas

Na figura 47 são descritas as medias do *quenching* não-fotoquímico (NPQ_Lss) das sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$. O tratamento 50 mgL^{-1} após 24h do período de embebição, tem a média de (NPQ_Lss) maior que o tratamento Controle, e no período de 48h tem a média de NPQ_Lss inferior, depois volta a aumentar até as 168h, com diferença estatísticas nos períodos de 72h, 96 h e 144h. No tratamento 100 mgL^{-1} no período de 24h tem a média de NPQ_Lss superior, quando comparada a media da Controle. Em 48h, a média diminui e em 72h volta a ser superior ao Controle. No final do período de germinação, o parâmetro NPQ_Lss , diminui para a dose, ainda quando comparada com o Controle, houve diferença significativa em 72h, 120h e 168h. Para a dose de 200 mgL^{-1} , o parâmetro NPQ_Lss só foi superior a dose controle em 72h, com diferença significativa nos períodos de 48h,72, 144h e 168h. Nota-se que, o

tratamento com 300 mgL^{-1} , as médias de (NPQ_Lss) são menores que o tratamento Controle em 48h, 144h e 168h com diferença significativa nos períodos de 48h e 168h.

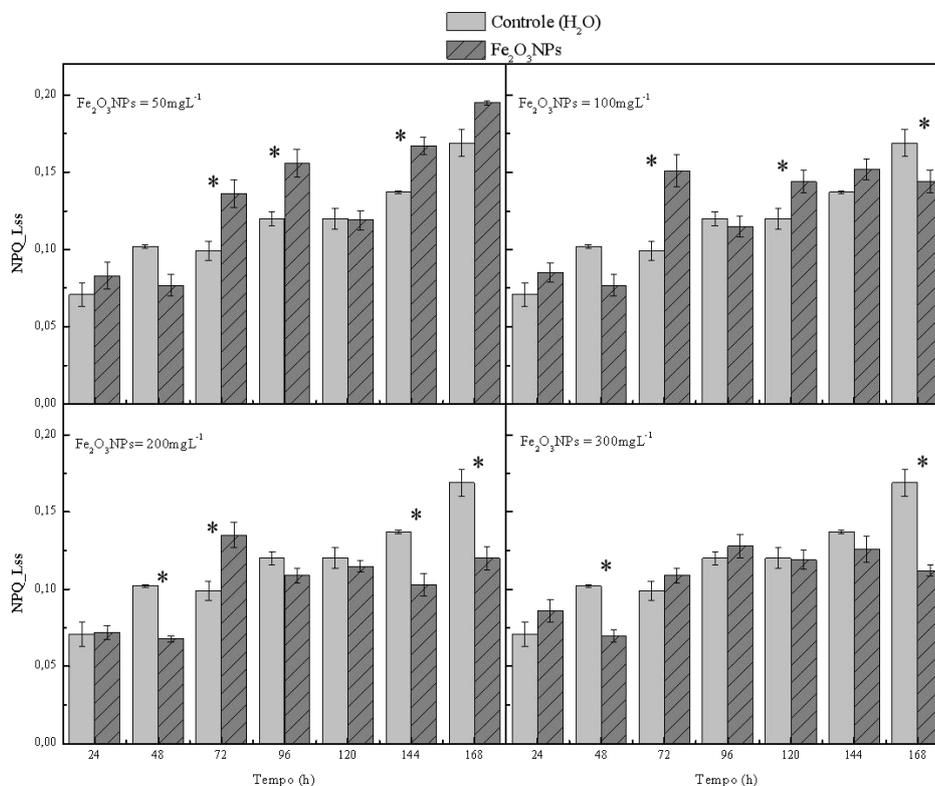


Figura 47: NPQ_Lss - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de Fe_2O_3NPs . * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$, $n = 10$).

Quando o tratamento 50 mgL^{-1} é comparado as demais concentrações pode observar que esta concentração, foi a mais suscetível em relação aos outros tratamentos, podendo indicar que esta concentração seja a mais nociva, e que possivelmente a semente/plântula apresentou eficiente sistema de dissipação energética do tipo não-fotoquímica, provavelmente influenciada pela presença de zeaxantina, cuja ação fotoprotetora ocorre nos complexos coletores de luz do FSII (HORTON et al.,1996).

Podemos observar na figura 48, que a dose controle apresenta um comportamento mais linear de dissipação não fotoquímica, e as doses com Fe_2O_3NPs apresentam um

comportamento oscilatório principalmente entre 72h e 96h, com pisos maiores de NPQ_{Lss} . Quando ocorre toxicidade severa por excesso de ferro, são observados danos aos complexos fotossintéticos através de redução nos valores da eficiência quântica do FSII (Fv/Fm), da taxa de transporte de elétrons (ETR) ou incremento na dissipação não fotoquímica do excesso de energia (SUH et al., 2002; PEREIRA et al., 2009; CASTRO et al., 2010). Porém, isso foi observado nas maiores concentrações, devido maior eficiência na dissipação de energia não fotoquímica, estando associado ao ciclo das xantofilas e à dissipação na forma de calor (BAKER et al., 2008). O ciclo das xantofilas é ativado pelo bombeamento de prótons para o lúmen que resulta na criação da diferença de potencial eletroquímico transmembrana. Essa diferença de potencial entre o estroma e o lúmen, ativa o ciclo das xantofilas, de modo que a violaxantina é convertida a zeaxantina e o excesso de energia é dissipado na forma de calor, atuando na proteção do aparelho fotossintético contra a super excitação e subsequente dano no centro de reação do FSII (BAKER, 2008; PEREIRA et al., 2013).

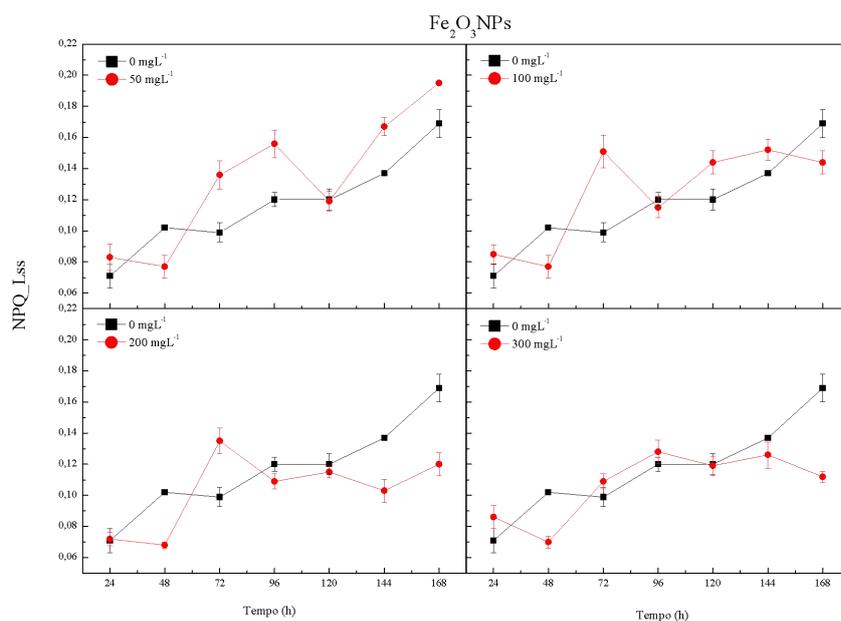


Figura 48: NPQ_{Lss} - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de Fe_2O_3NPs * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$; $n = 10$).

4.2.6 Supressão não-fotoquímica (NPQ_{Lss}) – folíolo

As análises dos valores médios do *quenching* não-fotoquímico (NPQ_{Lss}) das plântulas de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de Fe_2O_3NPs (Figura 49). Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram submetidas a

Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia realizada no período de germinação. É possível verificar que as plântulas, após 30 dias de sua exposição ao Fe₂O₃NPs, conseguem atingir a média da dissipação fotoquímica próxima ao tratamento Controle, apenas a concentração de 200 mgL⁻¹ é maior que o dose Controle, com diferença significativa em 50 e 200 mgL⁻¹.

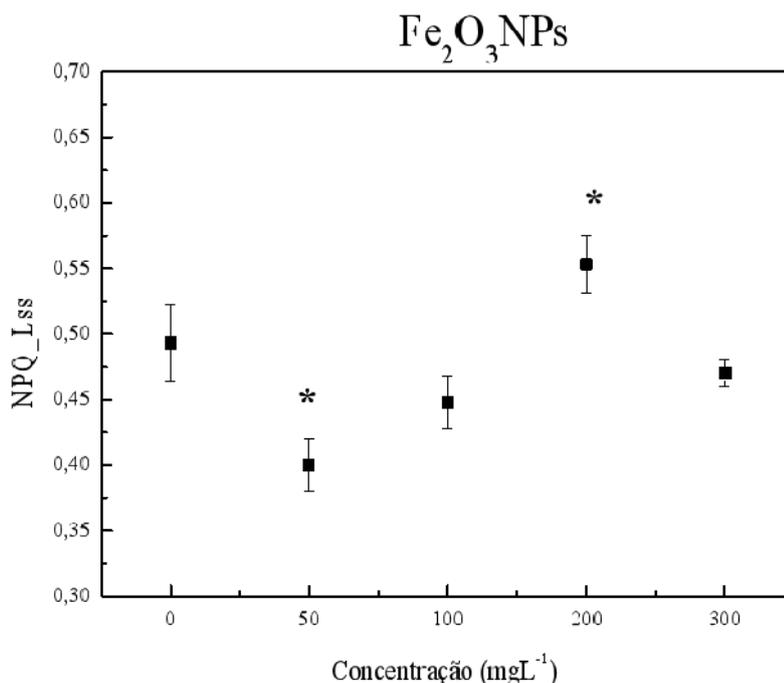


Figura 49: *NPQ_Lss*- dissipação não fotoquímica da média de plântulas de *Inga laurina*, depois de 30 dias, após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

4.2.7 Fluorescência estacionaria – sementes e plântulas

Os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas nos cotiledones das sementes, como mostra a Figura 11. Foi possível observar que o tratamento com 50 mgL⁻¹ apresentou um maior pico de fluorescência de moléculas de clorofila, logo após o tratamento com 200 mgL⁻¹, seguido pelo tratamento de Controle, e sendo o tratamento com 300 mgL⁻¹ com a menor fluorescência, apresentando esse comportamento desde 24h após exposição a doses de Fe₂O₃NPs, até o ultimo dia de germinação as 168h. A razão de fluorescência red-far depende do conteúdo da clorofila (CEROVIC et al., 1999). Estes resultados podem ser atribuídos pelo consumo de suas próprias moléculas de clorofila como reservas, pois quanto maior essa proporção, menor a concentração de clorofila devido à reabsorção seletiva do vermelho em relação à

fluorescência far-red pelas moléculas de clorofila (GITELSON et al., 1998; CEROVIC et al., 1999; CAIRES et al., 2010).

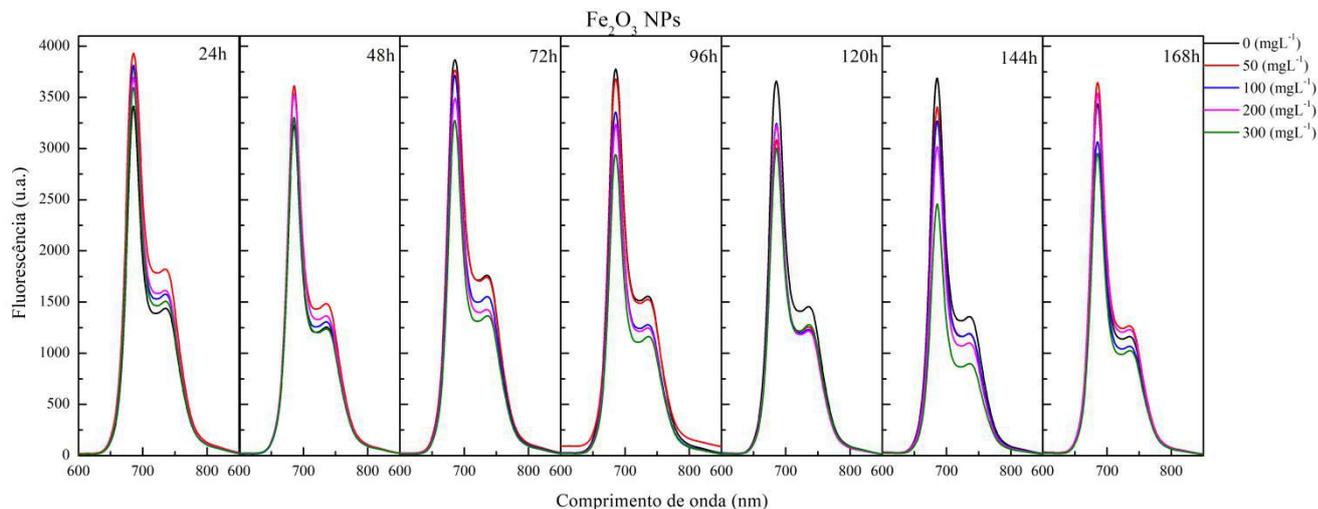


Figura 50: Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária ao longo do tempo da média de 10 sementes de *Inga laurina* após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

4.2.7.1 Razão de fluorescência 685/735

A análise dessa razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila *a*. Na Figura 51 revelam um aumento na relação F685/F735 em função do tempo. A razão de fluorescência red-far depende do conteúdo da clorofila (CEROVIC et al., 1999). Estes resultados podem ser atribuídos pelo consumo de suas próprias moléculas de clorofila como reservas submetidas a Fe₂O₃NPs. Podendo estar relacionado à degradação da clorofila de sementes devido à sua função de reserva (BILLA et al. 2003).

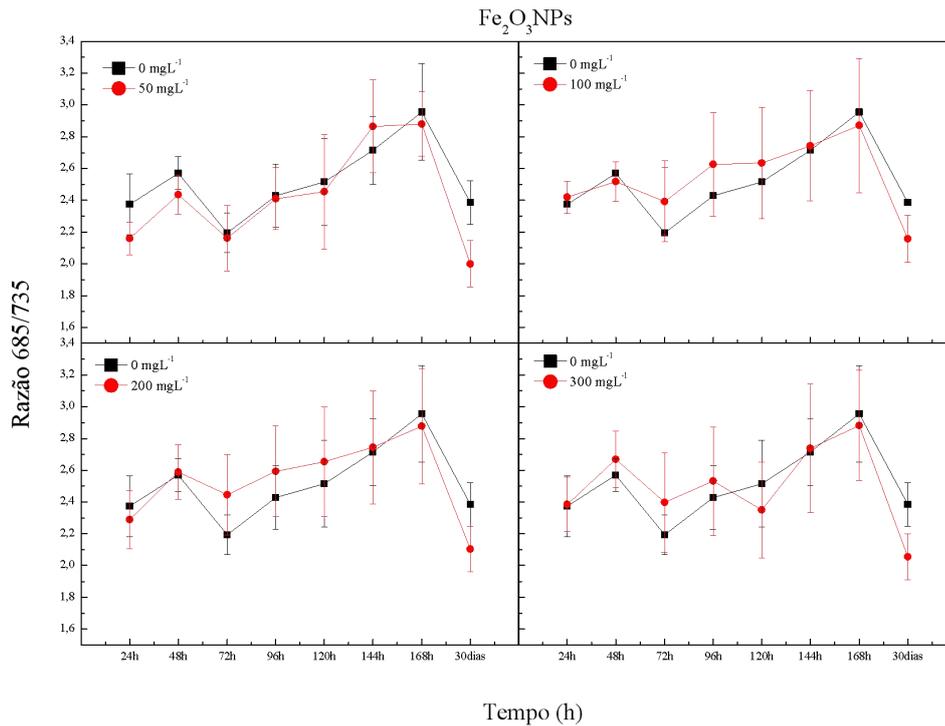


Figura 51: Razão F685/F735 em função da concentração de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, com excitação em 405 nm, durante o período de germinação (7 Dias) e 30 dias após o plantio.

4.2.8 Fluorescência estacionaria – folíolos

A Figura 52 mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas no 3° par de folhas de metáfilos, em plantas classificadas como Jovens, após o seu 30° dia após germinação. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente. Foi possível observar que para a dosagem de 50 e 100 mgL⁻¹ apresentou um maior pico de fluorescência de moléculas de clorofila, enquanto que o tratamento Controle apresentou o menor pico.

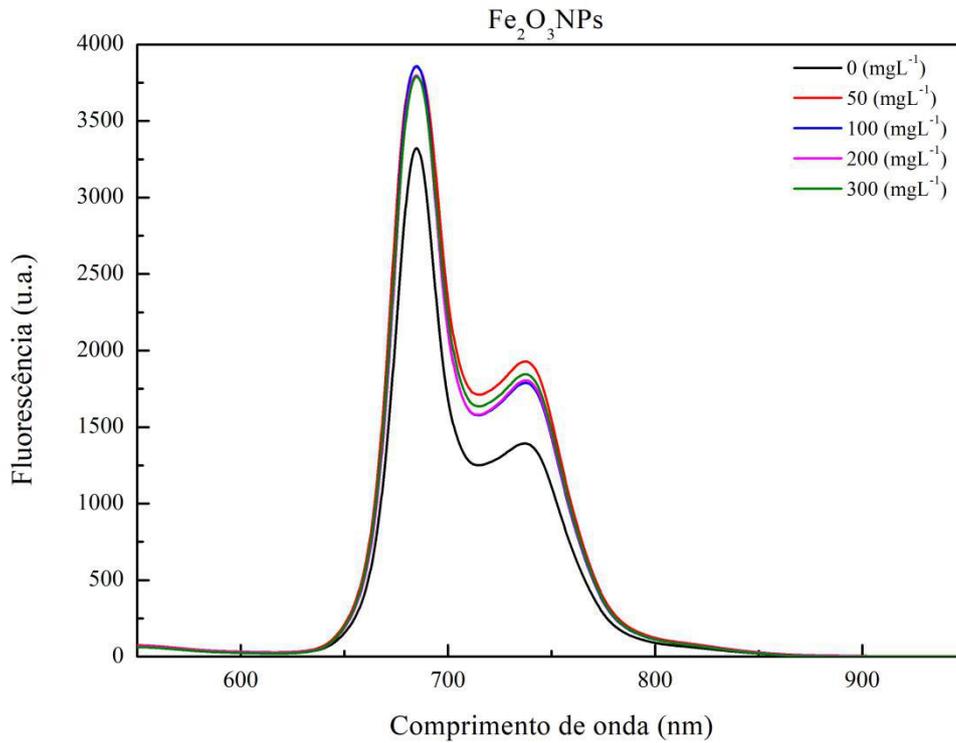


Figura 52: Espectro da Fluorescência estacionaria da média de 10 de plântulas de *Inga laurina*, após 30 dias de serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de Fe_2O_3 Nps.

4.2.8.1 Razão Fluorescência 685/735 - folíolo

Análise da razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila *a* (Figura 53). Nota-se que não houve alterações significativas na fluorescência de clorofila (Chla) das plântulas com nanopartículas, é que essa razão ficou maior para as doses Controle.

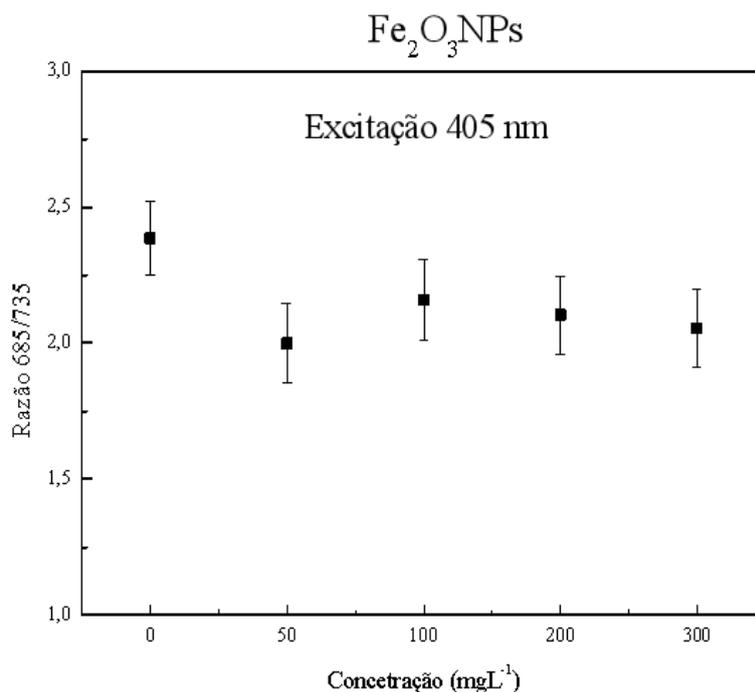


Figura 53: Razão F685/F735 em função da concentração de NPs de Ferro ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$), com excitação em 405 nm, após 30 Dias de exposição as nanopartículas.

4.2.9 Análises termográficas – sementes e plântulas

As análises da temperatura superficial (T_s), foram realizadas enquanto as sementes estavam adaptadas a 30 minutos no escuro no software Testo IRSoft 2.23 (Figura 54). No tratamento 50 mgL^{-1} , no período de 24h após a embebição, as médias com ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$) tiveram um aumento significativo, porém ao longo do período germinativo as médias se mantiveram próximas ao tratamento Controle. No tratamento 100 mgL^{-1} as médias de (T_s), foram significativas nas 24 e 72 horas, mas ao longo do período germinativo se mantiveram próximas. No tratamento 200 mgL^{-1} as médias de (T_s) foram significativas nas 24 e 96 horas, com o aumento da (T_s) com as sementes contaminadas e as 72 horas, houve uma redução. No tratamento 300 mgL^{-1} obtiveram 4 picos com diferença estatísticas com maiores médias de ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$) em 24h, 72h, 120h e 168h, sendo está concentração com maior temperatura superficial (T_s).

ROCHA PEREIRA et al., (2010) estudando descreveram uma diferença de até $3,5 \text{ }^\circ\text{C}$ entre a dose de 30g e a de 120g de glyphosate na planta inteira. A diferença entre temperatura

da folha e do ar foi de quase +2 °C quando a aplicação foi realizada na planta inteira com a dose 120g e -1,66 °C com a dose 30g. A temperatura do ar no momento das avaliações fisiológicas, realizadas 7 DAA estava em média 25 °C. A fotossíntese é o processo mais sensível as altas temperaturas, apresentando temperaturas ótimas que variam de 20 a 35 °C (BERRY & BJÖRKMAN, 1980; HIKOSAKA et al., 1997; SCHRADER et al., 2004)

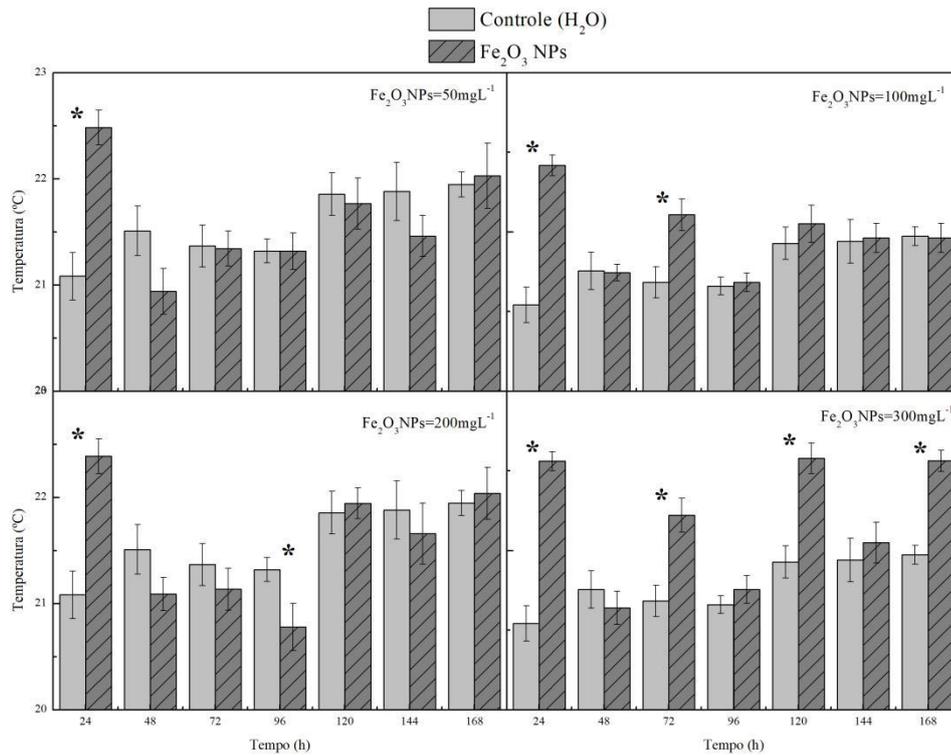


Figura 54: Análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).

4.2.10 Análises termográficas – folíolos

Após 30 dias em casa de vegetação com a mesma metodologia das sementes de *Inga laurina*, as folhas foram submetidas a análises da *temperatura superficial* (Ts), foram realizadas enquanto estavam adaptadas a 30 minutos no escuro. Após análise, verificou-se que o tratamento controle apresentou a média inferior a todas as concentrações de (Fe₂O₃NPs), sendo o tratamento com 200 e 300 mgL⁻¹ com a maior temperatura superficial (Ts). As maiores concentrações quando os parâmetros são analisados em conjunto comparados,

indicam que houve um aumento de temperatura (Ts) e diminuição de (Fm_iss) e aumento da dissipação de calor nestas concentrações (Figura 55).

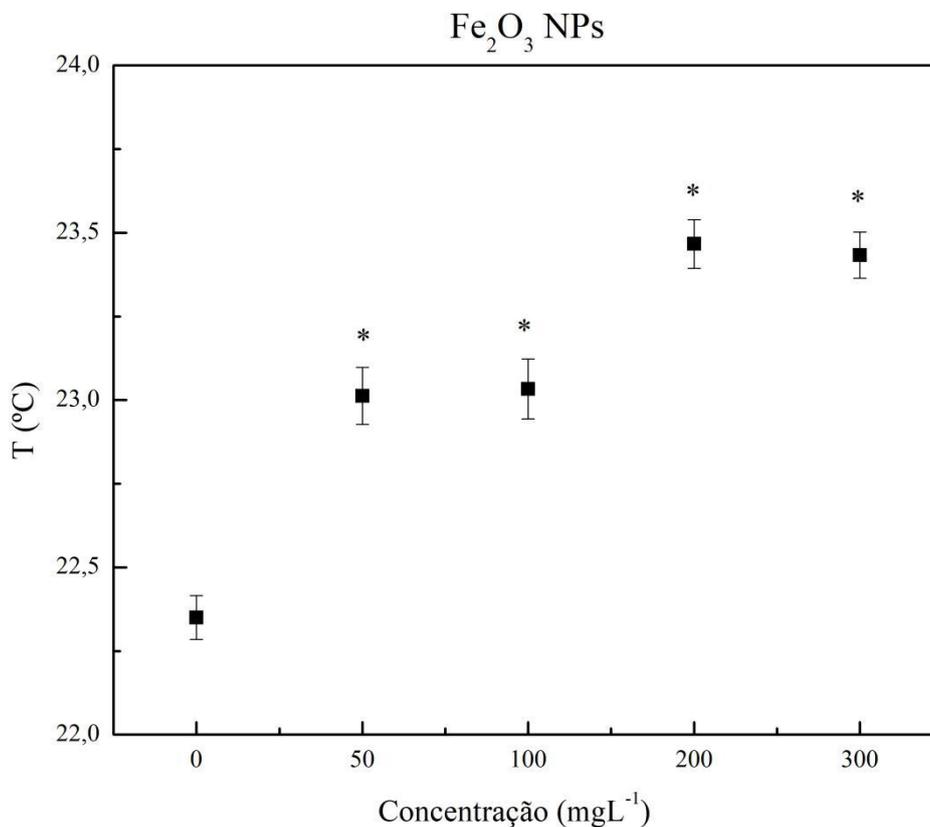


Figura 55: Temperatura superficial de plântulas de *Inga laurina*, após 30 dias de exposição à Fe_2O_3 NPs.

A energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila pode ser direcionada para três possíveis vias: aproximadamente 80-90% da energia absorvida é utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese; 5-15% é dissipada na forma de calor e 0,5-2% é refletida na forma de luz vermelha ou vermelho distante, que é a chamada fluorescência da clorofila *a* (MAXWELL e JOHNSON, 2000). Em condições de estresse, a conversão quântica da fotossíntese diminui, enquanto a emissão de calor e a fluorescência da clorofila aumentam consideravelmente (GUÉRA et al., 2004), e isso se reflete na diminuição dos valores de eficiência potencial dos fotossistemas, apresentada pelas plantas em estresse, quando comparadas as plantas controle. Em temperaturas elevadas há fechamento dos estômatos, contribuindo para a diminuição da concentração de CO_2 na câmara subestomática (C_i), e com

isso há redução na capacidade fotossintética devido ao aumento da fotorespiração. Outros fatores como danos nas estruturas dos fotossistema I e II, e na enzima de carboxilação podem contribuir com a efetiva diminuição da assimilação líquida (OGREN e OQUIST, 1984). Dentro deste contexto, outro importante evento que contribui para o balanço de carbono de uma folha, é a resposta da respiração ao aumento de temperatura, que responde aumentando de forma exponencial, colaborando para a redução da assimilação líquida de CO₂ (CLARK et al., 2004; MEIR et al., 2001; LOVEYS et al., 2003).

4.2.11 Índice de germinação e comprimento da radícula das sementes

Os resultados do índice de germinação foram de 100%, ou seja, todas as sementes utilizadas germinaram, conforme Figura 56. Verifica-se que as sementes de ingá apresentaram a mesma capacidade de germinação. Diante disto, reafirma-se a natureza recalcitrante e alta germinabilidade, características estas presentes nas espécies o gênero Ingá (RODRIGUES et al., 2007).

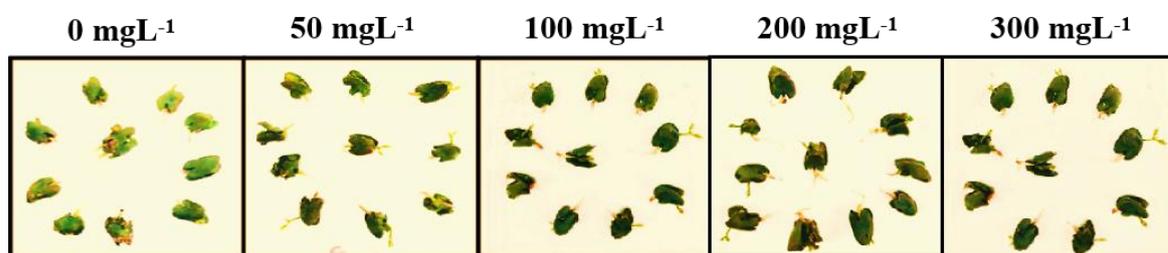


Figura 56: Imagem do último dia de germinação, 168h, de sementes de *Inga laurina* para concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs. Foto: Daniela Graciano

Ao analisar o comprimento da raiz após 168 horas do período de embebição das sementes de *Inga laurina*, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs (Figura 57). Observou-se que nos tratamentos 50 e 200 mgL⁻¹ houve aumento do comprimento da raiz após o período de germinação, sendo a maior média (CR) para o tratamento de 200 mgL⁻¹.

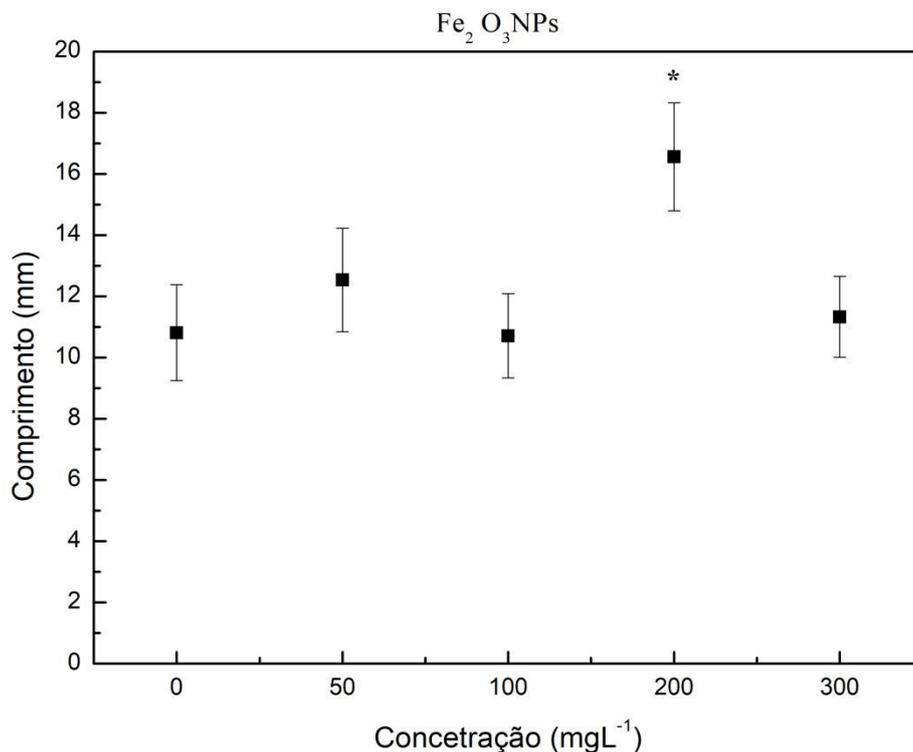


Figura 57: Comprimento da raiz após 168h do período de embebição das sementes de *Inga laurina*, em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

Não foi encontrado nenhum elemento visual de toxicidade da raiz, podendo a planta ter superado os baixos valores de fluorescência (*Fm_{lss}*) e altos valores de dissipação não fotoquímica (*NPQ_{Lss}*) sem danos ao sistema radicular, pois em plantas suscetíveis apresentam danos as raízes, como já estudado pela literatura. Ex: Plantas submetidas a concentrações elevadas de Fe absorvem e acumulam grandes quantidades deste elemento em seus tecidos, exibindo sintomas típicos de toxicidade, como amarelecimento e, ou bronzeamento das folhas e escurecimento das raízes (CHATTERJEE et al., 2006; SIQUEIRA-SILVA et al., 2012).

Sob esta condição, o Fe induz a formação de espécies reativas de oxigênio (JUCOSKI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2007), causando severas reduções no crescimento e na produtividade das plantas. O nível crítico de toxicidade de Fe em plantas depende da espécie, da idade da planta e de seu estado nutricional. Sintomas visíveis de toxicidade e redução do

crescimento foram observados em arroz e *Echinochloa crus-galli*, apresentando concentração de Fe nas folhas entre 300-500 mg kg⁻¹ (DOBERMANN e FAIRHURST, 2000).

4.2.10.1 Tamanho da raiz das plântulas

Após 30 dias, que as sementes foram embebecidas com diferentes concentrações Fe₂O₃NPs, verificou-se que não houve diferença significativa no comprimento das raízes das plântulas com os tratamentos comparadas com a Controle (Figura 57).

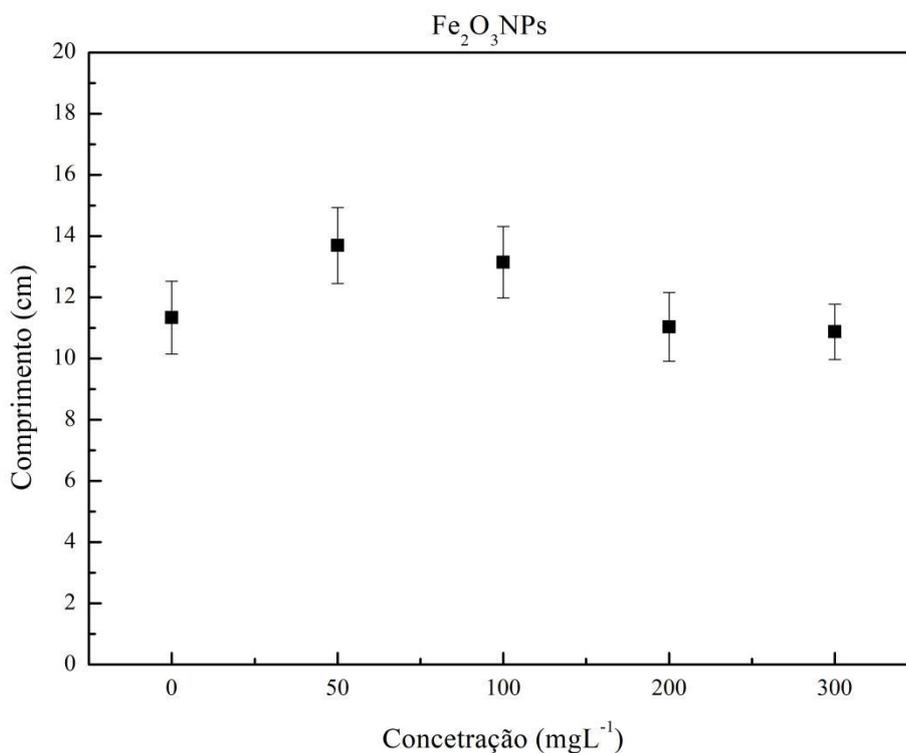


Figura 58:: Comprimento das raízes de plântulas de *Inga laurina* após 30 dias de germinação.



Figura 59: Plântulas de *Inga laurina* no tratamento com 0 e 300 mgL⁻¹ Fe₂O₃NPs, após 30 Dias de crescimento em casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano

4.2.12 Análise de Extrato Bruto

4.2.12.1 Análise do extrato

Observou-se que em todas as concentrações obtiveram média inferior ao tratamento Controle, sendo as maiores concentrações com menor absorção de fluorescência uv/vis e com menor teor de clorofila em relação aos outros contaminantes estudado (Figura 60).

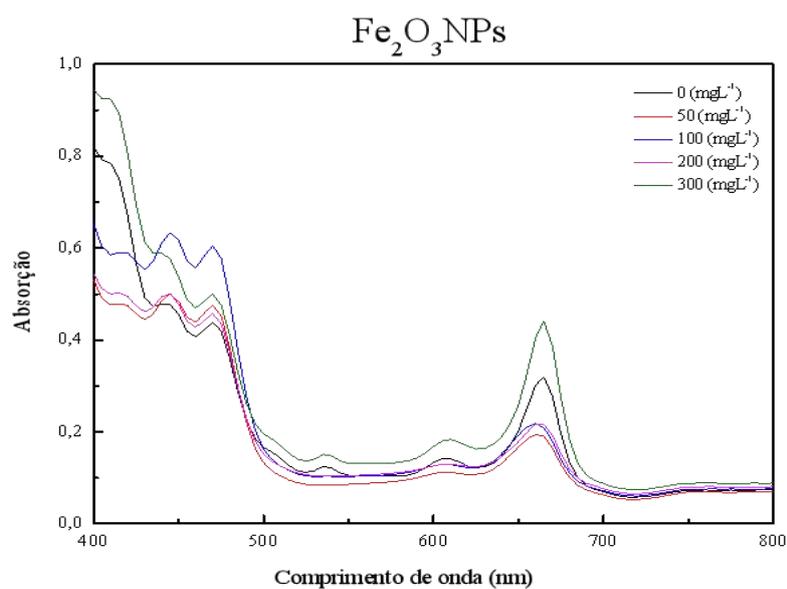


Figura 60: Absorção de fluorescência de plântulas de *Inga laurina* após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de Fe₂O₃NPs.

A literatura descreve que a prevenção da degradação da clorofila é comumente relacionada com a regulação do balanço do ferro nos tecidos, principalmente quando as plantas são submetidas a concentrações elevadas deste elemento (PEREIRA et al., 2013). Porém ao longo do tempo, foi observado redução nos teores de clorofilas, provavelmente em função da senescência foliar, acarretando redução na assimilação líquida de CO₂ (LIM, et al., 2007).

A elevada concentração de CO₂ também reduz a disponibilidade de N e/ou eleva a concentração de carbono na biomassa, resultando em menor teor de N na folha e consequentemente nos teores de clorofila, levando a um feedback negativo na capacidade fotossintética (REICH et al., 2006). Porém na concentração de 300 mgL⁻¹ houve um aumento do teor de clorofila que pode ter acionado o mecanismo de ação dos antioxidantes promovendo a interrupção das cadeias de reações oxidativas, devido ao bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, ou agindo como doadores de prótons e elétrons impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres (HALLIWELL et al., 2007; PEKAL et al., 2011).

4.2.12.2 Teor de Clorofila *a*

A figura 61 e 62 apresentam em todas as concentrações os valores de Teor de Clorofila são menores em relação ao tratamento Controle, porém a concentração de 100 mgL⁻¹ obteve a menor média.

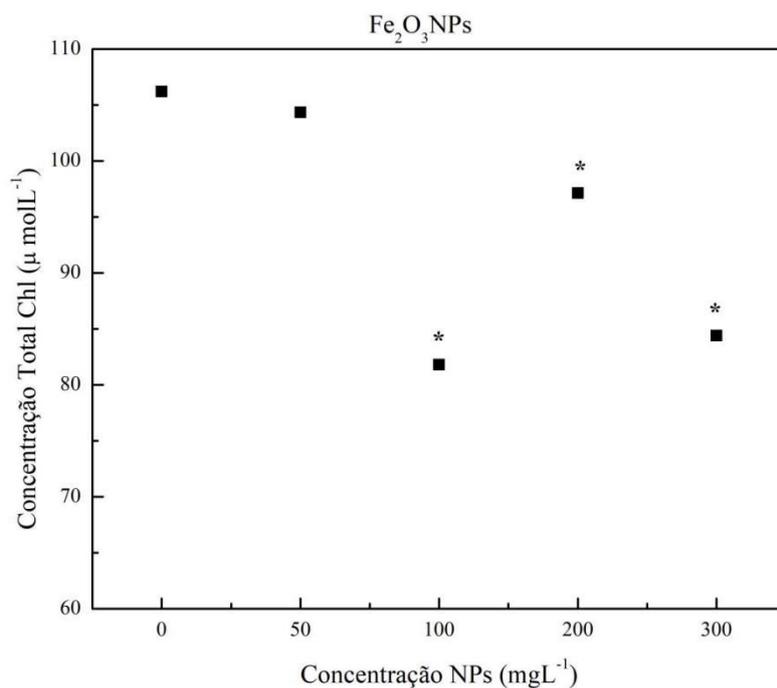


Figura 61: Teor de Clorofila *a* de *Ingá Laurina*, após 30 dias de Plantio - Fe₂O₃NPs nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹

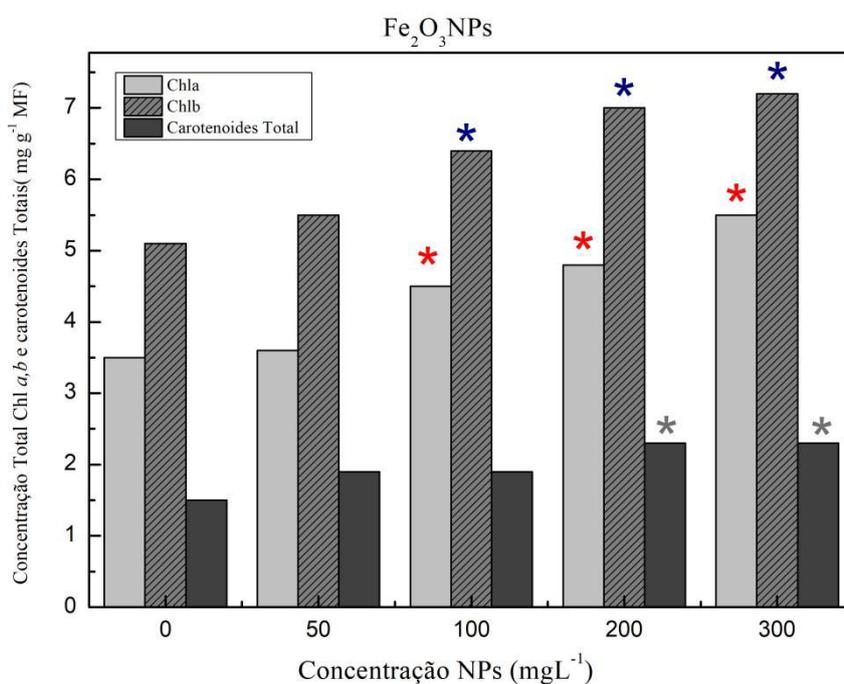


Figura 62: Teor de Clorofila *a,b* e carotenóides de plantas de *Inga laurina* após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de nanopartículas de ferro Fe₂O₃NPs.

Em estudos realizados com rabanete (*Raphanus sativus*), observou-se uma redução no desenvolvimento da cultura devido à adsorção das NPs na semente e à liberação de íons livres de ferro. (ZUVERZA-MENA et al., 2017). Já em estudos realizados com tomates (*Solanumlyco persicum*), expostos a 100 mgL⁻¹ de NP Fe₂O₃, estresse hídrico e também processo de oxidação com formação de EROs, devido à agregação das NPs nas raízes foi observado (MARTÍNEZ-FENÁNDEZ et al., 2016).

Avaliando todos os parâmetros é possível observar que as médias de (*Fm_iss*), (*Qy_max*), (*NPQ_Lss*), (Ts) e (CR) indicam que houve alteração nos parâmetros fisiológicos a partir de 100 mgL⁻¹ principalmente após o período de 30 dias para este contaminante (Fe₂O₃NPs), sendo possível afirmar que houve alterações na fisiologia da planta e diminuição no teor de clorofila. Aumento da clorofila *b* pode estar relacionado a capacidade. O aumento da clorofila *b* em plantas pode ser devido a um aumento da proporção do complexo coletor clorofila *a/b*-proteína, em relação ao complexo P-700-clorofila *a*-proteína. (MEBRAHTU et al.,1991).

4.3 ZnONPs

4.3.1 Fluorescência máxima no último pulso saturante (Fm_Lss) – sementes e plântulas

Sementes de *Inga laurina* apresentam distinção na emissão de Fm_Lss ao longo do tempo com aparente redução de intensidade a partir das 48h, independente da dose de ZnONPs. Exceto para a elevação da emissão observada na dose de 300 mgL^{-1} , decorrido 120h do início do experimento (Figura 63).

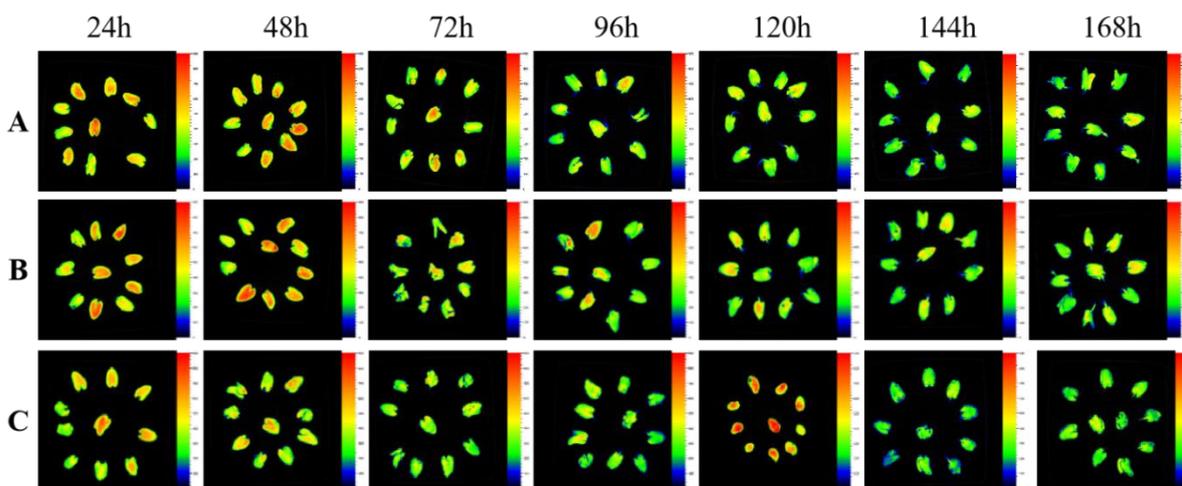


Figura 63: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila *a* em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro (Fm_Lss) no período de 24 a 168h, após a imersão em A) 0 mgL^{-1} (Controle); B) 50 mgL^{-1} e C) 300 mgL^{-1} de ZnONPs.

Quando comparamos a emissão da fluorescência da clorofila *a* da dose controle aos demais tratamentos de ZnONPs, foram observadas diferenças em todas as doses (Figura 64).

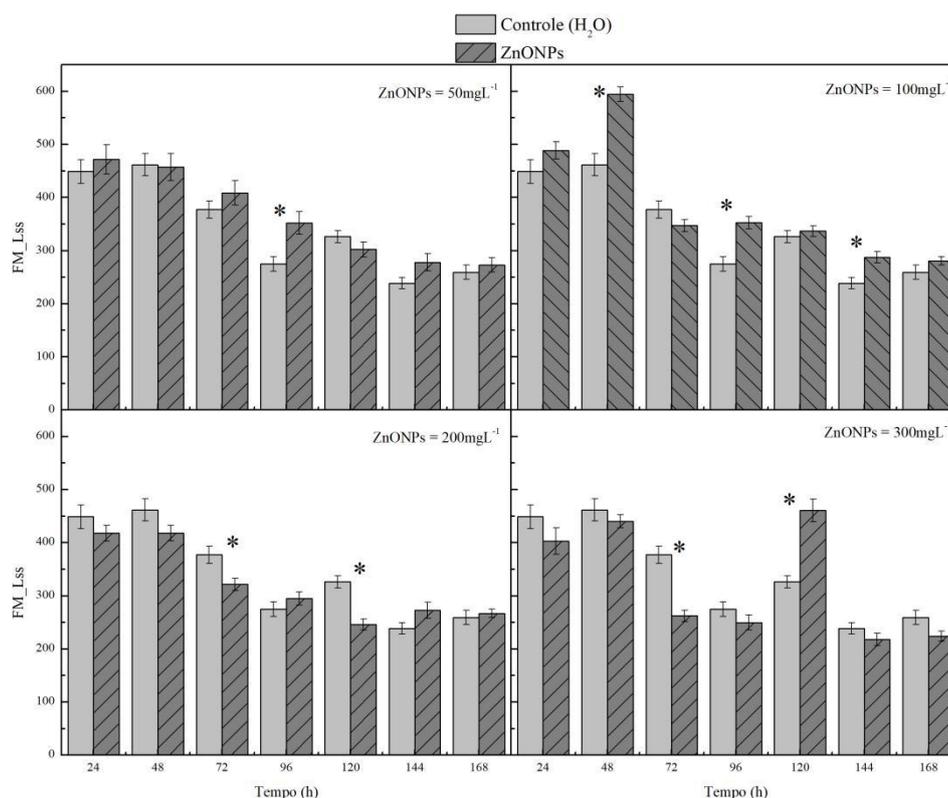


Figura 64: Parâmetro Fluorescência máxima no último pulso saturante (*Fm_Lss*) das sementes de *Inga laurina* submetidas no período de germinação com concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

Observou-se nos testes estatísticos, o tratamento 50 mgL⁻¹ ZnONP apresentou média com diferença estatística em 96h de germinação, tendo maior média de (*Fm_Lss*) quando comparada ao tratamento (0) Controle. No tratamento 100 mgL⁻¹ as médias com diferença estatística foram em 48h, 96h e 129h de germinação, tendo maior média de (*Fm_Lss*) quando comparada ao tratamento (0) Controle. No tratamento 200 mgL⁻¹, as médias com diferença estatística foram em 72h e 96h de germinação, sendo o tratamento Controle com a maior média de (*Fm_Lss*). O tratamento 300 mgL⁻¹, obteve média com diferença estatística em 72 e 120 horas de germinação, sendo em 72 horas, com o tratamento Controle com maior média (*Fm_Lss*) e em 120 horas a média maior de (*Fm_Lss*) para o tratamento 300 mgL⁻¹.

Em estudos com cultivares de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas com soluções nutritivas com 200 mgL⁻¹, não foi verificado efeito tóxico do Zn sobre a produção de clorofila *a* e *b* e

carotenoides e xantofilas. Os autores atribuíram esse efeito a ação das enzimas antioxidantes catalase e peroxidase que controlaram os níveis de espécies reativas de oxigênio na planta, evitando danos aos pigmentos (SAMART et al., 2017). Plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas com ZnONP também não apresentaram redução no teor de clorofila, nem alterações nas trocas gasosas (ZHAO et al., 2013). A ausência de fitotoxicidade nas doses estudadas pode estar relacionada a tolerância do metal a planta. Em plantas de trigo (*triticum ssp.*) foi constatado uma redução de quase 40% no teor de clorofila das plantas (DIMKPA et al., 2012).

De um modo geral durante o período germinativo as concentrações não apresentaram uma redução significativa do parâmetro (Fm_{Lss}) em relação ao tratamento Controle. Sementes e plântulas de *Inga laurina* pode apresentar tolerância nesta etapa, submetidas a ZnONPs, porém na dose de 300 mgL^{-1} há uma redução entre 48 e 120h, seguido por um aumento nas 120h, apresentando um comportamento oscilatório e já na dose de 50 mgL^{-1} ZnONP em comportamento linear para a Fm_{Lss} , conforme figura 64 e 65.

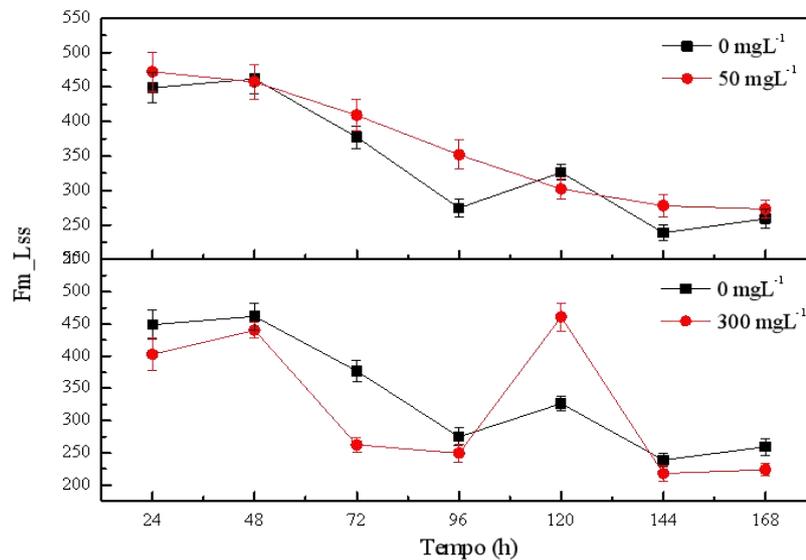


Figura 65: Fm_{Lss} de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo, após embebição de 24h de solução aquosa de 50 e 300 mgL^{-1} de ZnONPs.

4.3.2 Fluorescência máxima no último pulso saturante (FM_Lss) - folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram submetidas a Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia do período de germinação. Foram observadas diferenças na emissão da fluorescência *Fm_Lss* em plântulas de *Inga laurina* provenientes de sementes germinadas com diferentes concentrações de ZnONPs (Figura 66). A emissão foi menor nas concentrações 50 e 200 mgL⁻¹, sendo a menor média com relação a todos os tratamentos observada nesta concentração.

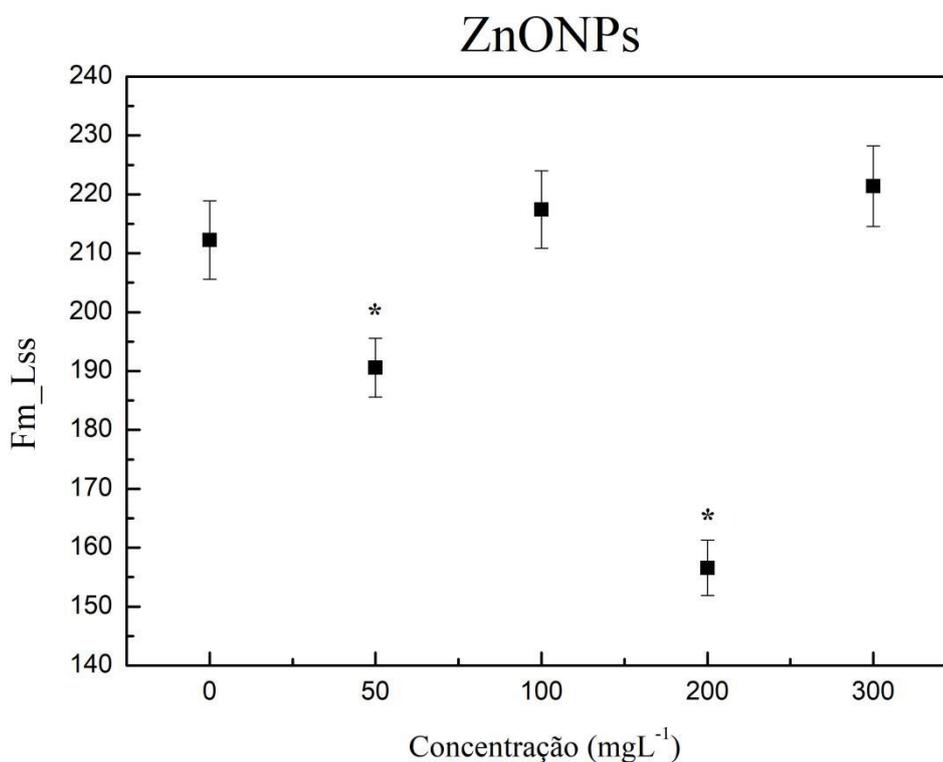


Figura 66: Parâmetro *Fm_Lss*, média de 10 plantas jovens de *Inga laurina*, em função do tempo, 30 dias após embebição de 24h de solução aquosa de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

Ainda que tenha sido observada uma redução de 33,12% de *Fm_Lss* na dose de 200 mgL⁻¹ em relação ao controle, não foi observada linearidade entre dose/resposta, uma vez que na maior (300 mgL⁻¹) não foi observada diferença com relação ao Controle. Já existem estudos que corroboram com esta hipótese, (Amde et al., 2017) em revisão realizada sobre NPs metálicas relatam que devido as características físico-químicas das NPs pode ocorrer

agregação/aglomeração, o que pode induzir à deposição deste material no sedimento, com consequente diminuição da concentração de NPs metálicas em suspensão ao longo do tempo.

A figura 67 apresenta a emissão de fluorescência para o Fm_{Lss} para plântulas de *Inga laurina* provenientes de sementes embebecidas em diferentes concentrações de ZnONPs, nota-se que houve pouca evidencia de diferença no padrão de pixels (escala de cores) nas diferentes doses.

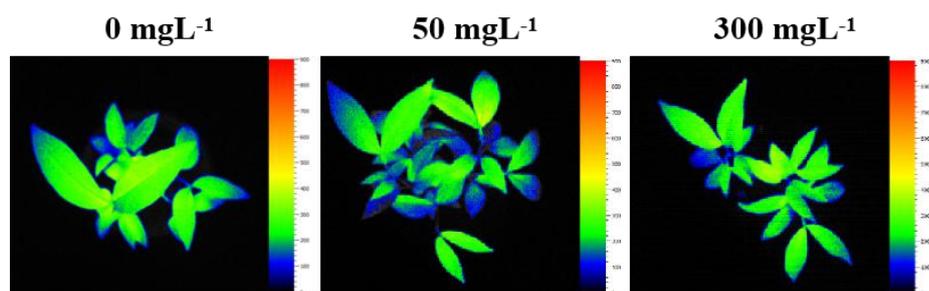


Figura 67: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em plântulas de *Inga laurina* para o parâmetro (Fm_{Lss}), 30 dias após a imersão em 0, 50 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

4.3.3 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm) – semente e plântulas sementes e plântulas

A Figura 69 mostram imagens representativas do rendimento quântico da conversão de energia fotoquímica em FSII (Qy_{max}) em função do tempo para sementes de *Inga lauriana* expostas a ZnONPs em (A) 0 mgL⁻¹, (B) 50 mgL⁻¹, (C) 300 mgL⁻¹.

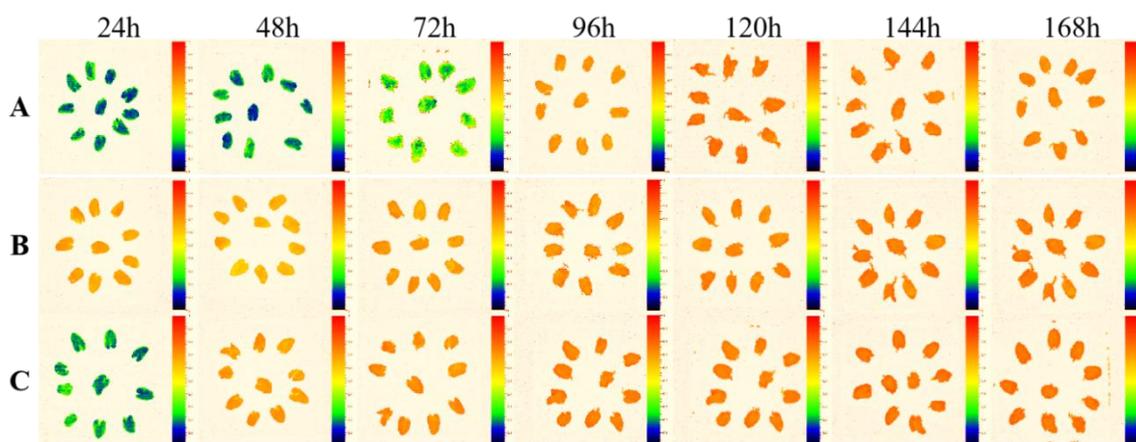


Figura 68: Imagem de emissão de fluorescência da clorofila a em sementes de *Inga laurina* para o parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica Fv/Fm : (A) 0 mgL⁻¹, (B) 50 mgL⁻¹ de ZnONPs, e (C) 300 mgL⁻¹ de ZnONPs

As alterações observadas também são dependentes de tempo e dose. Após a exposição na maior concentração de ZnONPs, a máxima eficiência da atividade fotoquímica do FSII, já está aumentando antes da protrusão do radicular. Este resultado sugere uma alta atividade metabólica em sementes, como uma possível forma de minimizar os impactos dos ZnONPs.

Na figura 69 apresentam as análises do rendimento fotoquímico. No tratamento 50 mgL⁻¹ ZnONP, as médias foram inferiores ou igual ao tratamento (0) Controle, com diferença estatística nos períodos de 24h e 168h de germinação. No tratamento 100 mgL⁻¹ ZnONP as médias também foram inferiores ou igual ao tratamento (0) Controle, com diferença estatística nos períodos de 72h e 168h de germinação. No tratamento 200 mgL⁻¹ ZnONP as médias do (*Q_y_max*) foram iguais ou superiores ao tratamento (0) Controle, com diferença estatística nos períodos de 72h e 120h de germinação, terminando com medias iguais os dois tratamentos. No tratamento 300 mgL⁻¹ ZnON apresentaram médias próximas no período de 24h e 48h de germinação superiores ao tratamento (0) Controle, inferior no período de 120h terminando com medias iguais no período de 168h.

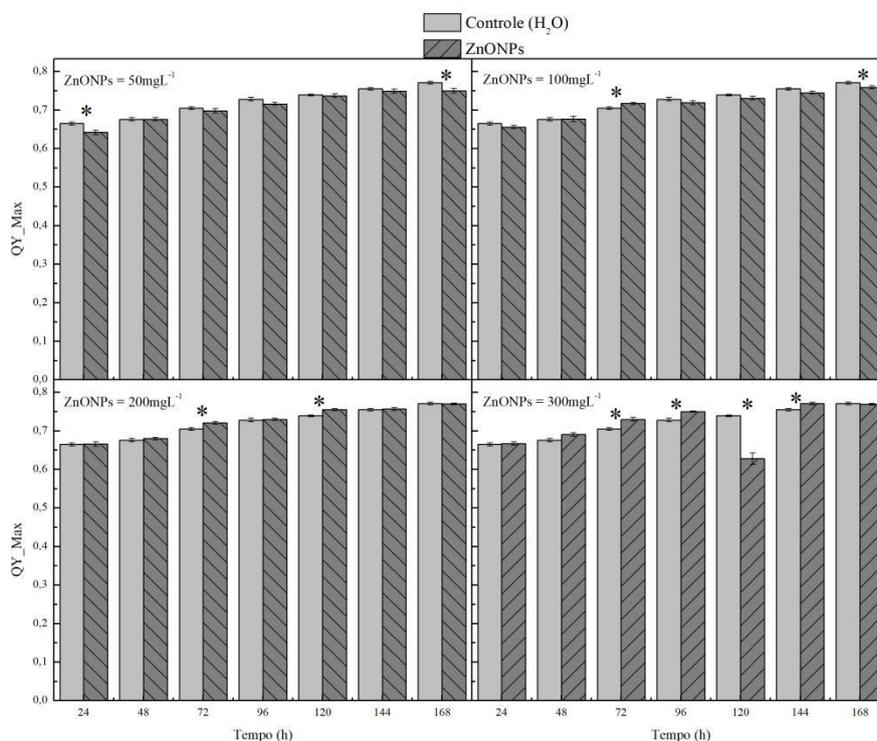


Figura 69: *Q_y_max*- parâmetro de rendimento da eficiência fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0, 05; n = 10).

Sandrin et al. (2017) estudando sementes de canola e trigo expostas a ZnONPs, mostrou que a canola foi sensível ao tratamento com nanopartículas de zinco quanto a germinação, sendo a dose limite foi (6,95 mgL⁻¹). A partir do qual observou-se decréscimo da porcentagem de plântulas normais, demonstrando efeito fitotóxico das ZnONPs às sementes de canola. Levando em conta características como o tamanho diminuto, a pequena quantidade de reservas e, portanto, capacidade de absorção de pequena quantidade de água das sementes de canola, possivelmente resultou em salinização da semente nas doses maiores do que 6,95mgL⁻¹, prejudicando a germinação das mesmas (SANDRIN et al.; 2017).

Nas maiores concentrações observa se que o rendimento fotoquímico ($Q_y_{max} = Fv/Fm$) foi maior que o tratamento (0) controle, sendo a concentração de 50 mgL⁻¹ com a menor média, sendo a esta dose menos nociva em relação a 300 mgL⁻¹, onde ocorre a maior degradação de clorofila ao longo do tempo, que será demonstrado na fluorescência estacionária.

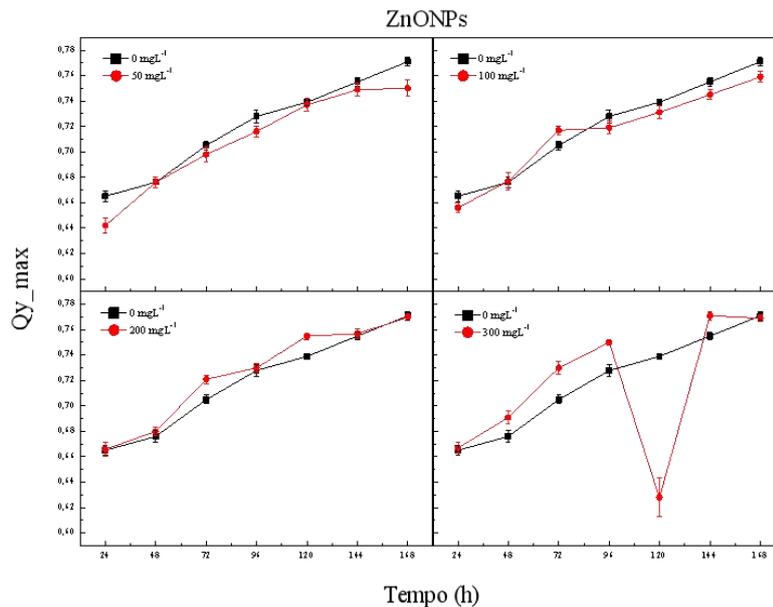


Figura 70: Parâmetro de rendimento fotoquímico (Q_y_{max}) das sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONP, durante o período de germinação.

A eficiência fotoquímica das doses de ZnONPs se apresentaram linearidade até a dose de 200 mgL⁻¹, porém na dose de 300 mgL⁻¹ houve uma queda as 120h de difícil interpretação

conforme figura 70. Verificou-se ainda que, nas doses mais baixas o valor do Qy_{max} é menor do que a Controle, porém nas maiores doses esse parâmetro foi maior que o Controle.

4.3.4 Eficiência fotoquímica (fv/fm) – folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram submetidas a Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia do período de germinação. Foi avaliado a eficiência do rendimento fotoquímico da fotossíntese através do parâmetro (Qy_{max}) das plântulas de *Inga laurina* submetidas no período de germinação com concentrações de ZnONPs nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹. Os resultados demonstraram que as concentrações de 50, 100, 200 mgL⁻¹ se mantiveram próximas ao controle, porém o tratamento 300 mgL⁻¹ teve o menor rendimento, mostrando-se mais sensível e com baixo rendimento fotoquímico.

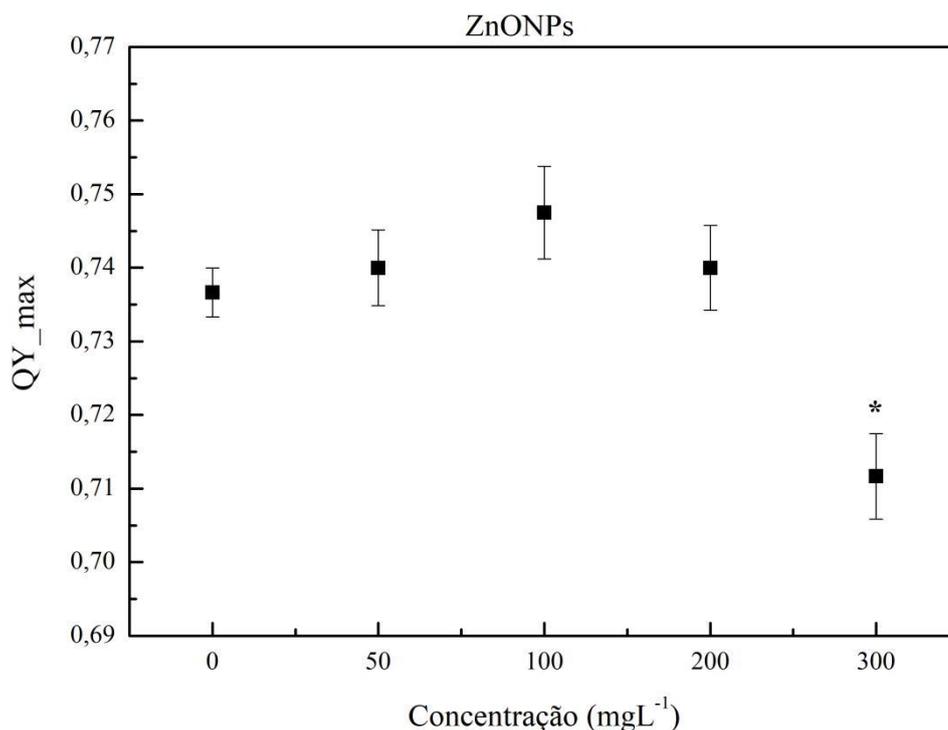


Figura 71: Parâmetro de rendimento fotoquímico (Qy_{max}) das plântulas de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50,100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONP, após 30 dias de plantio.

4.3.5 Supressão não-fotoquímica (NPQ_{Lss}) – sementes e plântulas

Na figura 72, são descritas as medias do quenching não fotoquimico no ultimo pulso saturante (NPQ_{Lss}) para as sementes de *Inga laurina* em função das concentrações de ZnONPs. Os valores demonstram para o tratamento 50 mgL^{-1} de ZnONP até as 48h tem a média maior que o tratamento (0) Controle, declina nos períodos de 96h e 144h com média inferior ao tratamento (0) Controle, terminando o período de germinação com a média de (NPQ_{Lss}) superior. Para a dose 100 mgL^{-1} ZnONP após o período de 24h tem a média de (NPQ_{Lss}) superior até o período de 96h, declinando nos períodos de 120h e 144h em relação ao Controle. O tratamento 200 mgL^{-1} ZnONP obteve a média de (NPQ_{Lss}) superior ao tratamento Controle até o período de 48h, declinando e permanecendo menor que o tratamento (0) Controle até o período final de germinação com diferença estatística nos períodos de 24h, 48h, 144h e 168h. O tratamento 300 mgL^{-1} ZnONP obteve as maiores médias de (NPQ_{Lss}) no período de 24h, 72h e 168h, e no período de 120h e 144h o tratamento Controle valor maior.

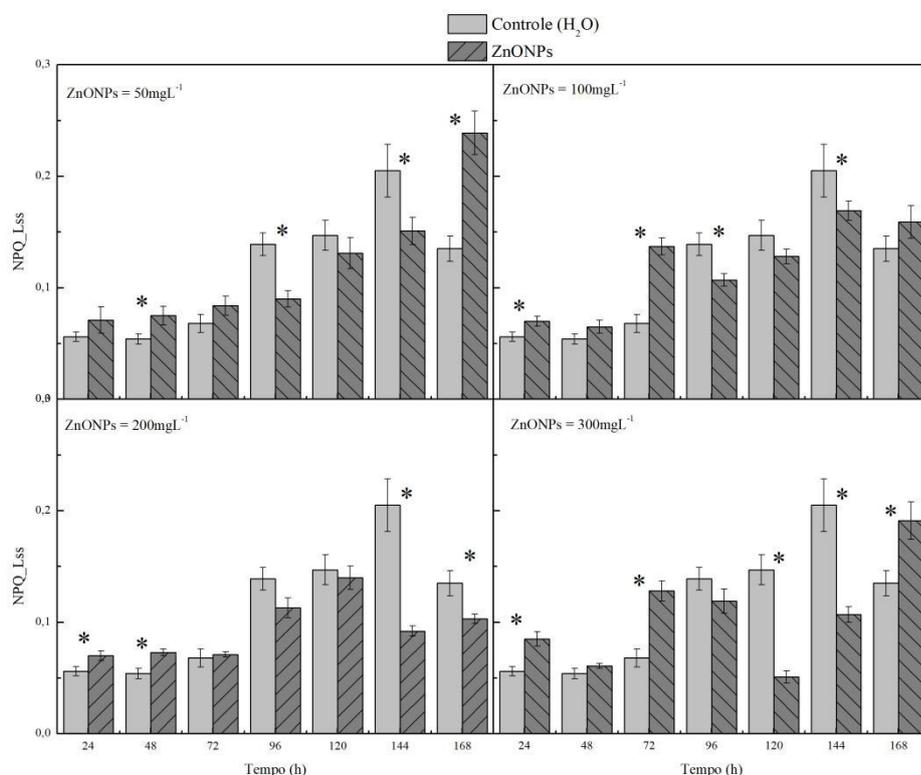


Figura 72: Valores médios do *quenching* não-fotoquímico (NPQ_{Lss}), das sementes de *Inga laurina* em função do tempo para as concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL^{-1} de nanopartículas de zinco ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, $p < 0,05$; $n = 10$).

Estudos realizados com 4 forrageiras demonstram valores altos e baixos de (NPQ_{Lss}) com espécies sucessíveis e outras resistentes. SILVA et al. (2006) relata que os valores observados dos quenchings apontaram para menores NPQ_{Lss} no capim-do-nilo e capim-setária quando avaliados no 10º dia após a suspensão da irrigação, em comparação ao início das avaliações, ou seja, sob maior déficit hídrico estas espécies parecem apresentar indícios de danos às proteínas do complexo fotossintético. Mesmo sob déficit hídrico intenso, os capins angola e hemárrhia mantiveram valores de qP (NPQ_{Lss}) elevados e, portanto, parecem ser menos susceptíveis ao estresse hídrico experimental. Vai depender da suscetibilidade das espécies e se tem ou não defesas contra os componentes químicos a quais são expostos.

Observou-se que nas primeiras 72h de germinação, as sementes de *Inga laurina* que foram expostas a ZnONPs, apresentaram um valor maior de NPQ_{Lss} quando comparadas com a Controle (Figura 74). Após as 96h essa dissipação de energia, em forma de calor, diminui, voltando a subir novamente nas dose 50 mgL^{-1} e 300 mgL^{-1} , em comparação com o tratamento Controle.

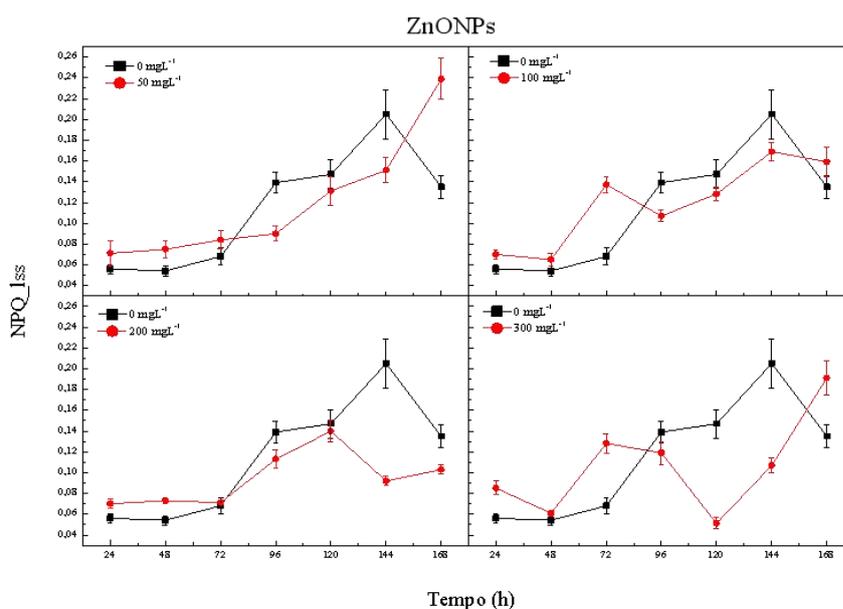


Figura 73: *NPQ_{Lss}* - dissipação não fotoquímica da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

Segundo Borkert, a elevada importância do Zn nas plantas deve-se à participação no processo de ação de um grande número de enzimas, como as desidrogenases, proteinases, peptidases e nas fosfohidrolases, que são reações fundamentais para as funções básicas da planta no metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos fosfatos, e na formação da estrutura das auxinas, do RNA e dos ribossomos (BORKERT et al.,1989). Também se constata a sua importância no metabolismo de fenóis, na formação de amido, na definição do tamanho e multiplicação celular e na fertilidade do grão do pólen (MALAVOLTA,1991).

4.3.6 Supressão não-fotoquímica (*NPQ_{Lss}*) – folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram submetidas a Imagem de Fluorescência da Clorofila *a*, com a mesma metodologia do período de germinação. Todas as concentrações apresentaram valores superiores de dissipação não fotoquímica em plântulas, decorrido 30 dias de embebição com ZnONPs (Figura 74).

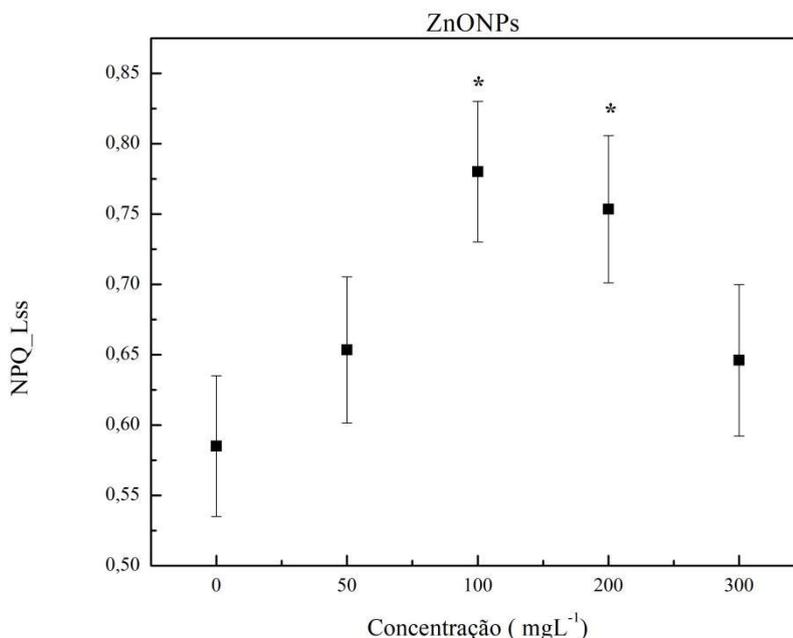


Figura 74: Valores médios do *quenching* não-fotoquímico (*NPQ_{Lss}*) de plântulas de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

Em condições de estresse, as plantas podem apresentar também redução acentuada na eficiência quântica máxima do FSII (Fv/Fm). O decréscimo deste parâmetro já foi observado em diversos estudos com videiras e plantas de cobertura (CAMBROLLÉ et al., 2013a; SANTANA et al., 2015; TIECHER et al., 2016a; 2016b) e se caracteriza como um estado de fotoinibição crônica (ALVES et al., 2002), a qual indica uma redução na proporção de centros de reação abertos (MAXWELL; JOHNSON, 2000), ou seja, aptos a receber elétrons. Nestas condições, geralmente ocorre o aumento da dissipação não-fotoquímica (NPQ_{Lss}), o que indica que as plantas dissipam a luz na forma de calor, protegendo assim a folha de maiores danos (MAXWELL & JOHNSON, 2000; CAMBROLLÉ et al., 2012). Esta dissipação da energia de excitação das clorofilas pode prevenir a formação de moléculas altamente reativas, a partir de oxigênio, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem danificar irreversivelmente proteínas, lipídeos e pigmentos de membranas fotossintéticas (HORTON & RUBAN, 2004).

4.3.7 Fluorescência estacionária – sementes e plântulas

Figura 75 mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila (Chla) quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas diretamente nas sementes, e nos últimos dias nas primeiras folhas que se formam do embrião. Foi possível observar picos de fluorescência entre 72 e 96h para as ZnONps de 0, 50, 100, 200 mgL^{-1} . Porém o tratamento de 300 mgL^{-1} desde 24h após exposição permaneceu com a menor redução ao longo do tempo. Evidenciando a maior degradação de clorofilas quando expostas a esta dosagem de ZnONPs.

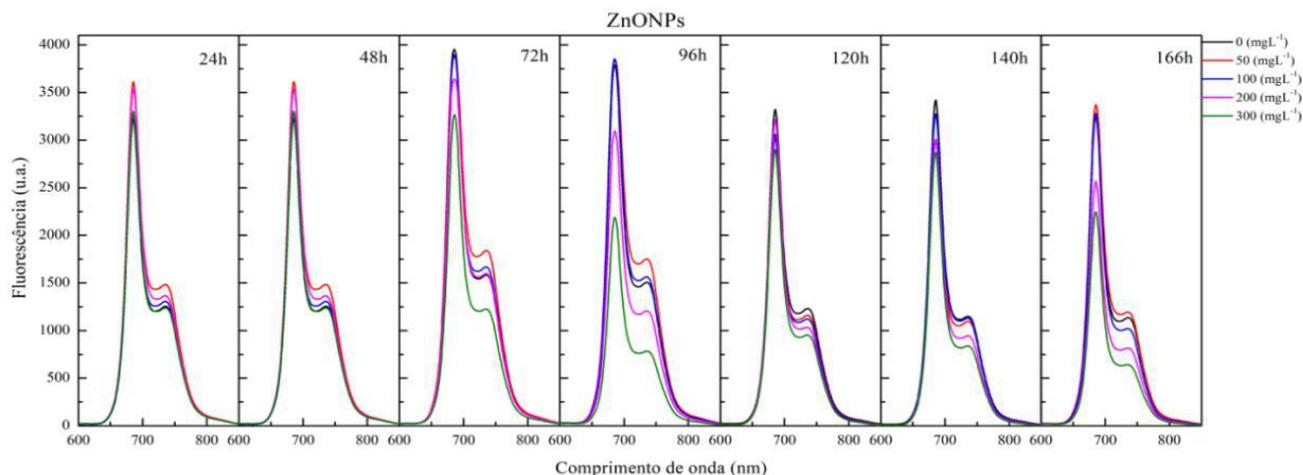


Figura 75: Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária ao longo do tempo da média de 10 sementes de *Inga laurina* em função do tempo após serem submetidas a 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

4.3.7.1 Razão Fluorescência 685/735

A análise dessa razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos de clorofila *a*. Na Figura 76, nota-se que houve alterações significativas na fluorescência de clorofila (Chla) nas sementes com ZnONPs para todas as doses, principalmente as 72h e um aumento a partir das 96h para as doses de 100, 200 e 300 mgL⁻¹. Resultando em uma tendência de consumo de clorofila como plastos de reserva a partir das doses de 100 mgL⁻¹. Devido a degradação da clorofila nas maiores concentrações.

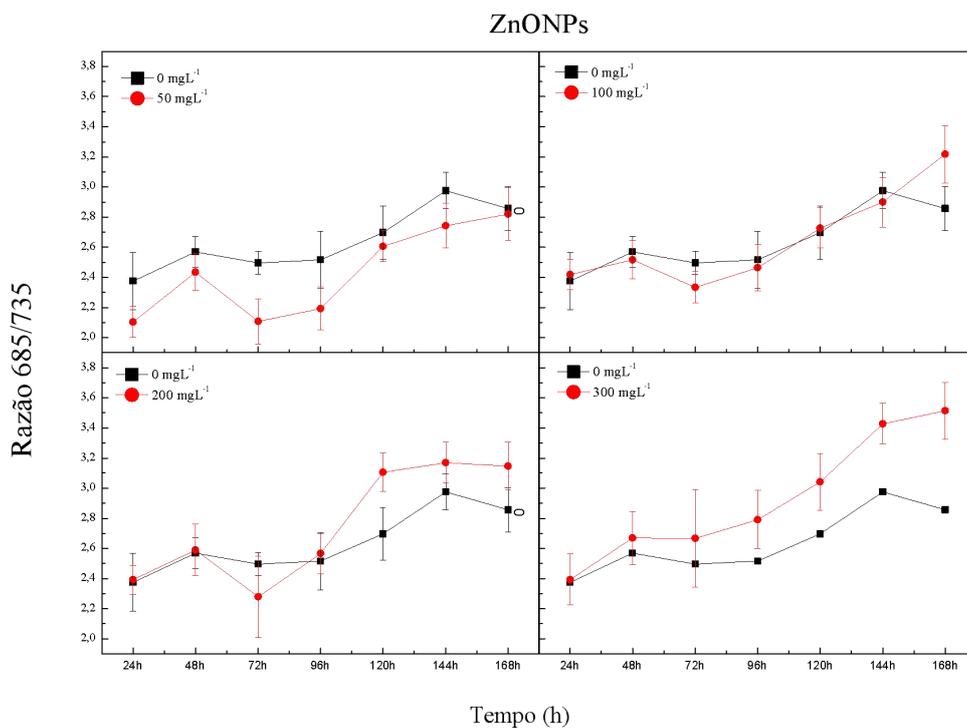


Figura 76: Razão F685/F735 em função da concentração de ZnONPs, com excitação em 405 nm, em 168h de germinação (7 Dias).

4.3.8 Fluorescência estacionária – folíolos

A Figura 77 mostra os espectros típicos da fluorescência de moléculas de clorofila quando excitado em 405 nm. As medidas foram realizadas no 3º par de folhas de metáfilos, em plantas classificadas como Jovens, após o seu 30º dia após germinação. Duas bandas de emissão podem ser observadas entre 625 e 800 nm: as bandas no vermelho e no vermelho-distante com máximo em 685 e 735 nm, respectivamente. Foi possível observar que o tratamento com 300 e 50 mgL⁻¹ apresentou um maior pico de fluorescência de moléculas de clorofila (Chl_a), enquanto que o tratamento Controle apresentou o menor pico. Podendo a plântula ter conseguido ajustar seu metabolismo após 30 dias de exposição.

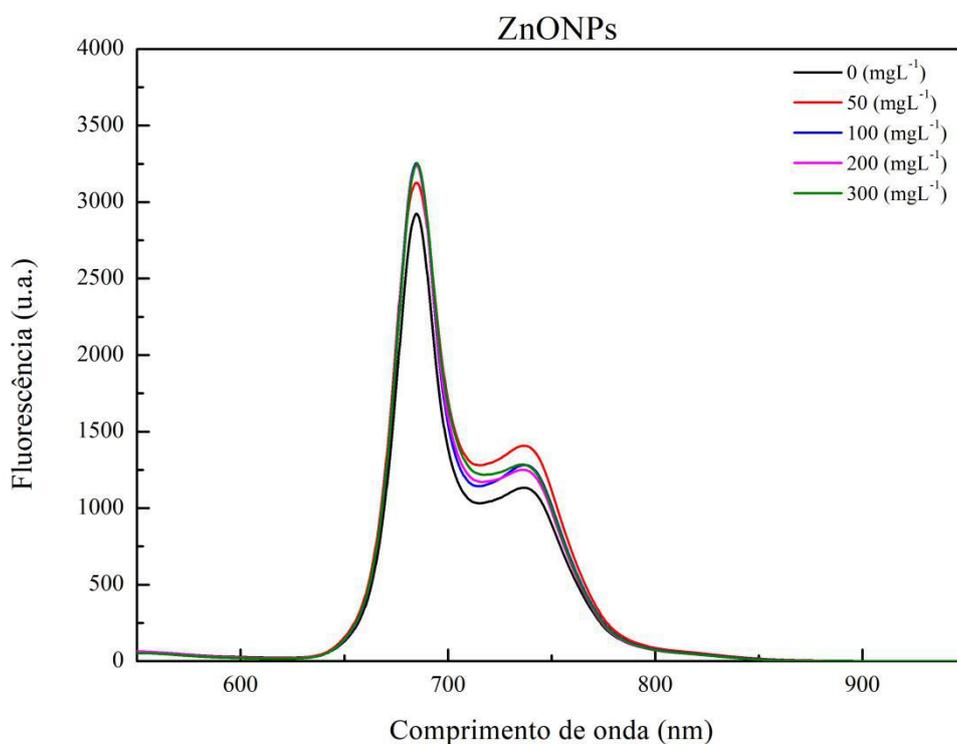


Figura 77: Espectro do Parâmetro da Fluorescência estacionária ao longo do tempo da média de plântulas de *Inga laurina*, em função da concentração, decorridos 30 dias de exposição a ZnONPs.

3.8.1 Razão Fluorescência 685/735

Na figura 78, nota-se que não houve alterações significativas na fluorescência de clorofila (Chla) das plântulas que foram germinadas com concentrações de ZnONPs, com a menor redução na dose de 50 mgL⁻¹. Com isso, podemos perceber uma indicação que as plântulas estão buscando ajustar o conteúdo de clorofilas do FSII, principalmente nas maiores concentrações.

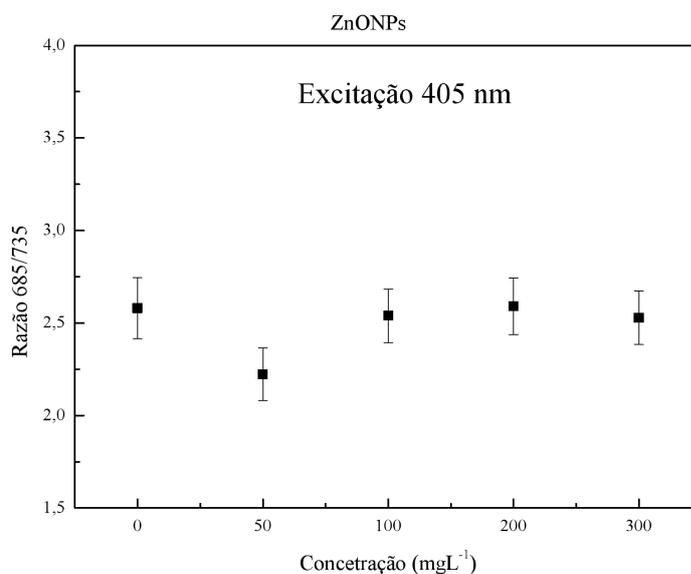


Figura 78: Análise de razão F685/F735, intensidade de fluorescência dos picos característicos da clorofila *a*, após 30 dias de exposição com ZnONPS.

4.3.9 Análises termográficas – sementes e plântulas

Na figura 79, as análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de *Inga laurina*. As análises da temperatura superficial (Ts), foram realizadas enquanto as sementes estavam adaptadas a 30 minutos no escuro, no software Testo IRSoft 2.23. No tratamento 50 mgL⁻¹ teve média (Ts), inferior ao tratamento (0) Controle, com diferença significativa as 48h, e ao longo do período germinativo, as temperaturas, se mantiveram próximas. No tratamento 100 mgL⁻¹ a média (Ts) só foi inferior ao tratamento (0) Controle nas 48 horas, após as 96 horas a (Ts) foi maior no tratamento embebido com (ZnONPs), apresentando diferença estatística nas 48h, 96h, 120h, 144 h e 168h. No tratamento 200 mgL⁻¹ a média de (Ts) do tratamento (0) Controle se iniciou com maior (Ts) às 48h, mas às 120 horas o tratamento embebido com (ZnONPs) obteve as maiores médias, com isso as médias

de (Ts) com diferença estatística nas 120, 144 e 168 horas. Apresentando um comportamento oscilatório de difícil interpretação. Podendo ser atribuído a fase de desenvolvimento da plântula e não mais da semente, entre 120 e 168h.

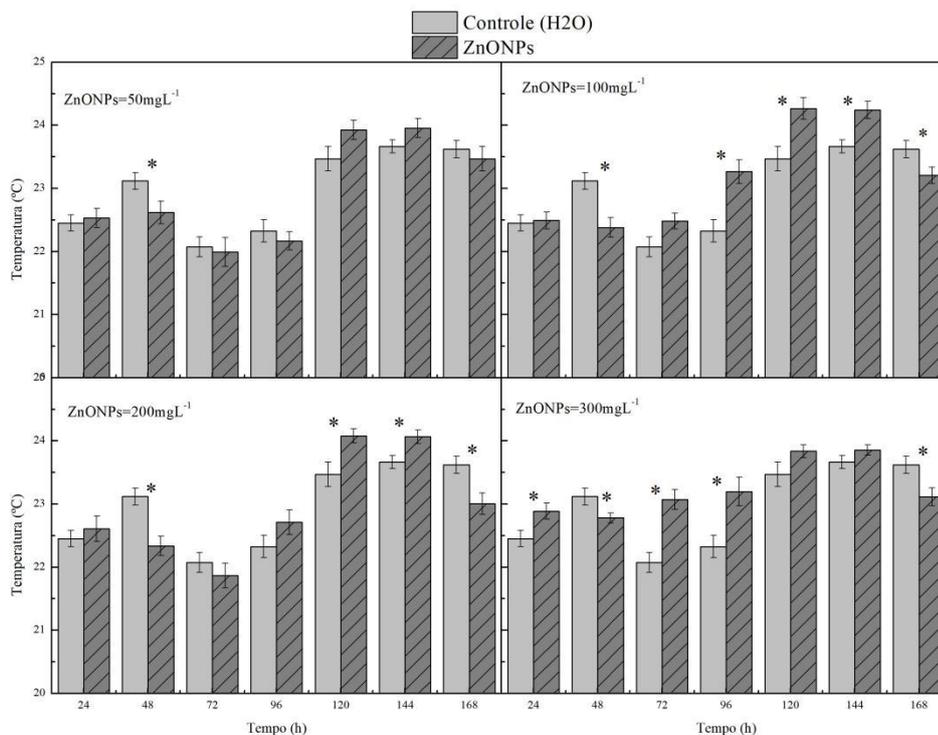


Figura 79: Análises dos valores médios da temperatura superficial das sementes de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs. * Diferença significativa (teste T, p < 0,05, n = 10).

4.3.10 Análises termográficas – folíolo

Após 30 dias em casa de vegetação com a mesma metodologia das sementes de *Inga laurina*, as folhas foram submetidas a análises da temperatura superficial (Ts), foram realizadas enquanto estavam adaptadas a 30 minutos ao escuro (Figura 80). O tratamento Controle obteve a média superior em todas as concentrações de ZnONPs, sendo o tratamento com 200 e 300 mgL⁻¹ com a menor (Ts). O tratamento com ZnONPs, nas maiores concentrações apresentaram menor (Fm_{lss}), menor (Qy_{max}) e maior (NPQ_{Lss}), corroborando com os resultados de temperatura, apresentando a menor temperatura foliar nas

concentrações de 200 e 300 mgL⁻¹, em relação ao tratamento Controle. Corroborando com a diminuição de temperatura causada pelas ZnONPs, o parâmetro de dissipação não fotoquímica (*NPQ_Lss*) teve aumento significativo, resultando em uma temperatura foliar menor que o tratamento (0) controle, podendo a planta ter um mecanismo mais eficiente em dissipação não fotoquímica (*NPQ_Lss*) de ZnONPs, quando comparado ao Fe₂O₃NPs e CuONPs.

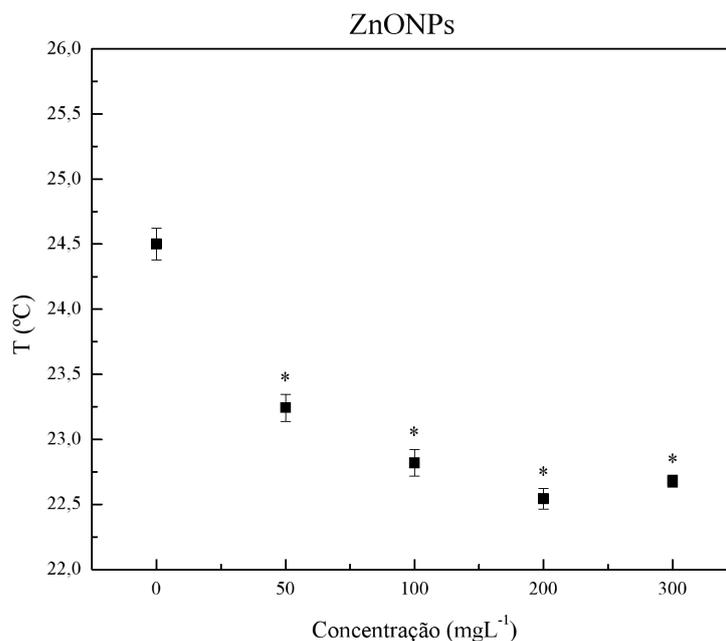


Figura 80: Análises dos valores médios da temperatura superficial das plântulas de *Inga laurina* em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

4.3.11 Índice de germinação e comprimento da raiz, sementes e plântulas

Os resultados do índice de germinação foram de 100%, ou seja, todas as sementes utilizadas germinaram(Figura 82). Verifica-se que as sementes de ingá apresentaram a mesma capacidade de germinação.

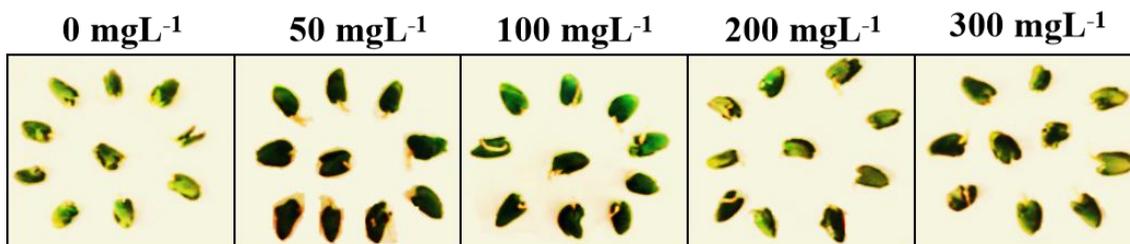


Figura 81: Imagem do último dia de germinação 168h de sementes de *Inga laurina* para concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs. Foto: Daniela Graciano

Na figura 82, foi possível observar que em todos os tratamentos houve redução do comprimento da raiz após o período germinação. As menores médias foram para os tratamentos de 100 e 300 mgL⁻¹. O sistema radicular das plantas são os primeiros pontos de exposição aos estresses abióticos transmitidos pelo solo, como concentrações tóxicas de íons essenciais e não essenciais, alumínio, pesticidas, constituindo fatores limitantes ao crescimento das plantas, e quando absorvidos, esses compostos tendem a acumular-se nas raízes, acarretando alguns efeitos como o escurecimento, engrossamento e inibição do crescimento radicular (SHABALA et al., 2006).

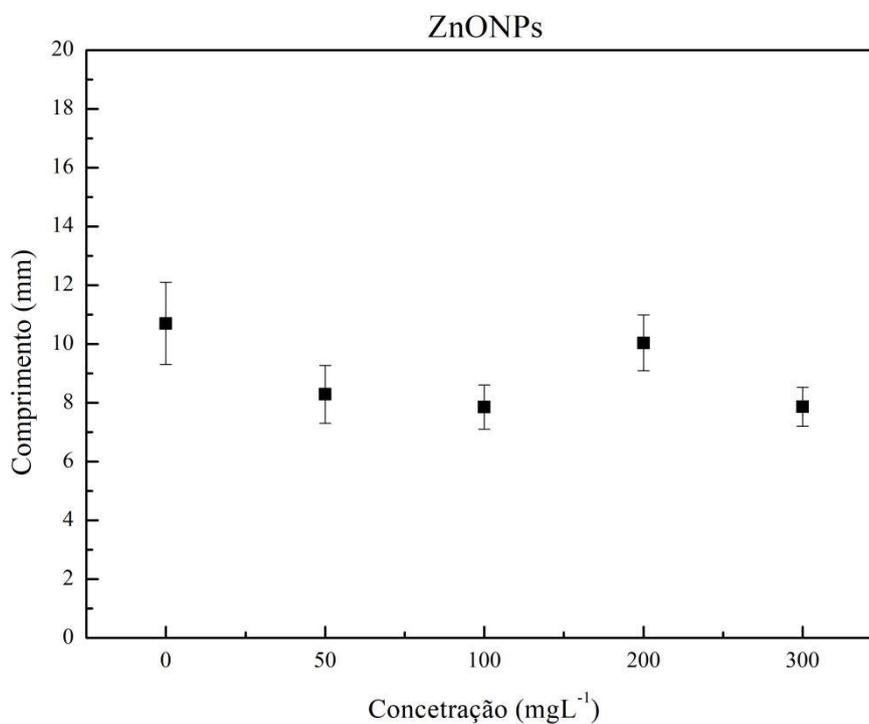


Figura 82: Comprimento da raiz (CR), após 168h do período de embebição das sementes de *Inga laurina*, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

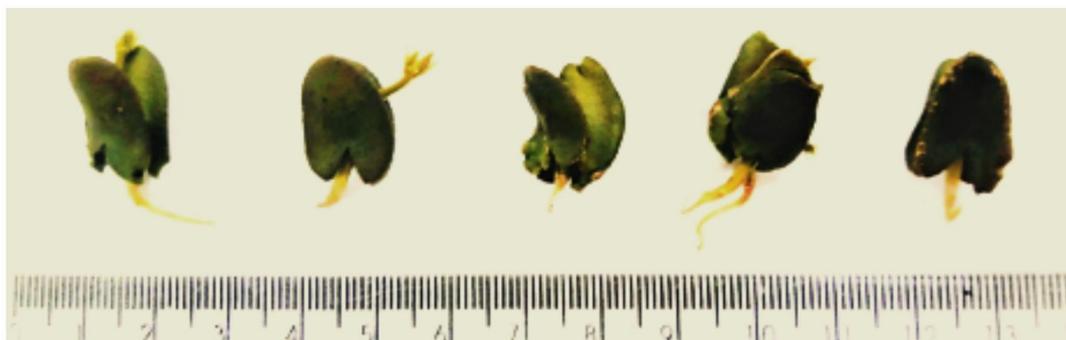


Figura 83: Sementes germinadas de *Inga laurina*, após 168h de embebição nas soluções de ZnONPs com concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹.

Estressores associados à fitotoxicidade normalmente promovem a redução do comprimento das raízes pela inibição do crescimento por inibirem a divisão e o alongamento celular (AIDAR et al.; 2003). No presente estudo, a exposição às NPs esteve associada ao crescimento das raízes e não sua inibição. O mecanismo de indução do tamanho (CR) pode ser indireto, ou seja, estar relacionado aos efeitos das NPs ao aparato fotoquímico nos tecidos fotossintetizantes, resultando em maior assimilação e consequentemente das raízes. Sendo possível observar as diferenças visualmente (Figura 83).

4.3.11.1 Tamanho da raiz das plântulas

Após 30 dias, que as sementes foram embebecidas com diferentes concentrações Fe₂O₃NPs, verificou-se que não houve diferença significativa no comprimento das raízes das plântulas com os tratamentos de 200 e 300 mgL⁻¹ quando comparadas com a Controle (Figura 84).

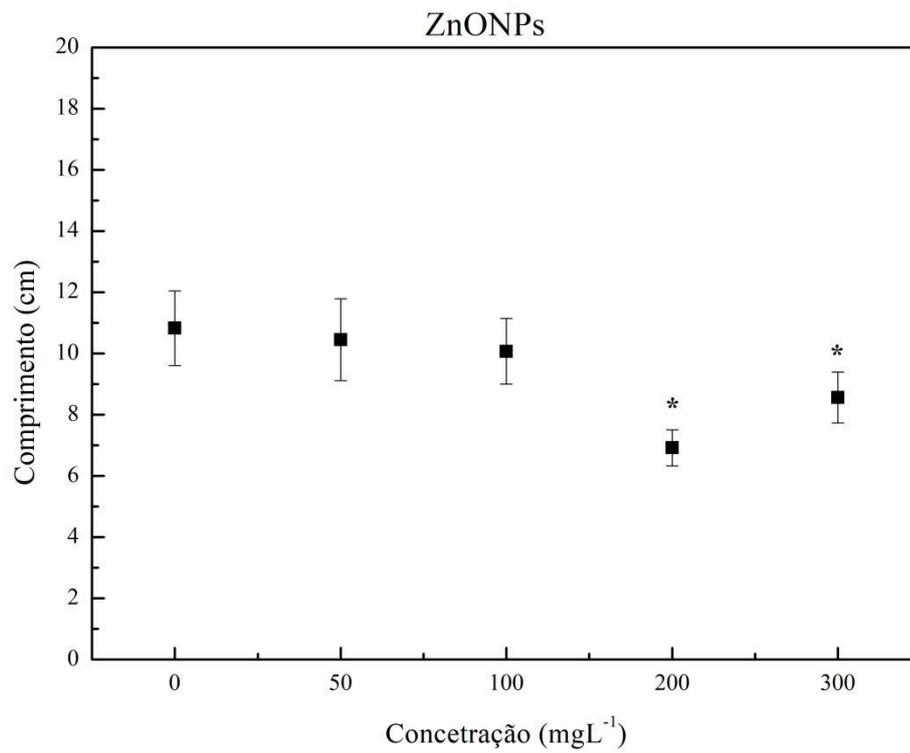


Figura 84: Comprimento das raízes após 30 dias de embebição das sementes de *Inga laurina*, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.



Figura 85: Plantas de *Inga laurina* no tratamento com 300 mgL⁻¹ ZnONPs, após 30 Dias de crescimento em casa de vegetação. Foto: Daniela Graciano

.3.12 Análise do extrato

4.3.12.1 Analise do extrato

Observou-se que o tratamento (0) Controle obteve a menor média em relação a todas as concentrações, a maior foi a concentração 300 mgL⁻¹, quando comparado com os resultados dos parâmetros após 30 dias de crescimento para a concentração de 300 mgL⁻¹, obteve como resultados a maior média de fluorescência (*Fm_Lss*), maior média de dissipação não fotoquímica (*NPQ_Lss*), e menor média de absorção uv/vis em relação as outras concentrações, evidenciando que este tratamento produziu alterações fisiológicas na planta nesta concentração em relação aos demais tratamento tanto negativamente para a menor concentração e positivamente nas maiores concentrações aumentando a *Fm_Lss* e teor de Chla. Porem em todas as concentrações houveram danos as raízes. O estresse por Cu e Zn pode danificar a estrutura das raízes (AMBROSINI et al., 2015; BOCHICCHIO et al., 2015), o que pode reduzir a absorção de água e nutrientes minerais do solo e, assim, diminuir o crescimento das plantas (TOSELLI et al., 2009; AMBROSINI et al., 2016).

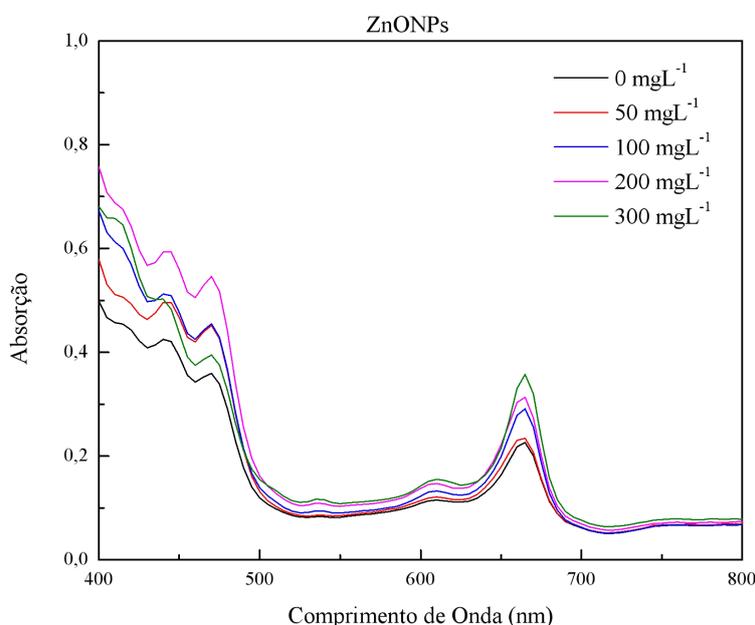


Figura 86: Absorção de fluorescência de plantas de *Inga laurina* após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

4.3.12.2 Teor de clorofila *a*

A figura 87, foi possível observar que neste parâmetro é de aumento crescente do teor de clorofila nas concentrações. A concentração de 50 mgL⁻¹ apresentou a média de teor da clorofila mais próxima da (0) controle e nas demais concentrações os teores foram bem maiores que o tratamento (0) controle. Alterações foram encontradas em outros parâmetros como NPQ_Lss e Fm_lss e CR que indicam que a planta utilizou mecanismos de defesa.

Em um estudo com nove cultivares de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas em solução nutritiva com 20 mgL⁻¹ de ZnONP, não foi verificado efeito tóxico do Zn sobre a produção de clorofila *a*, *b*, caretenoides e xantofilas. Os autores atribuíram esse efeito a ação das enzimas antioxidantes catalase e peroxidase que controlam os níveis de espécies reativas de oxigênio na planta, evitando danos aos pigmentos (SAMART et al., 2017).

Plantas de Pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em solo com ZnONP (400 e 800 mgL⁻¹) também não apresentaram redução no teor de clorofila, nem alterações nas trocas gasosas (ZHAO et al., 2013).

Porém fitotoxicidade foi encontrada em planta de trigo (*Triticum ssp.*) cultivadas em areia lavada com 500 mg kg⁻¹ ZnONP, e foi constatado uma redução de quase 40% no teor de clorofila das plantas (DIMKPA et al., 2012).

Em nossos estudos, nas maiores concentrações houveram uma redução no teor de clorofila e também em outras variáveis, apresentando alterações nas em (*Fm_lss*), (*Fm/Fv*), (*NPQ_Lss*), (*Ts*) e (*CR*), indicando que houve interferência no aparato fotossintético e mecanismos de defesa principalmente nas concentrações acima de de 100 mgL⁻¹.

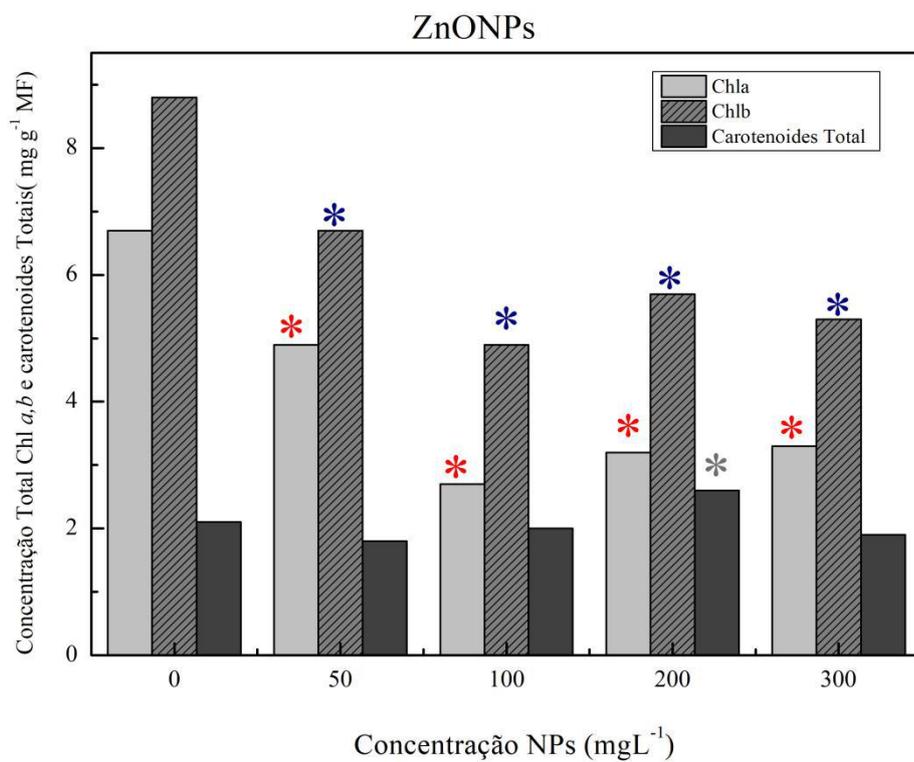


Figura 87: Teor de Clorofila *a* de plantas de *Inga laurina* após 30 dias de crescimento em casa de vegetação, em função das concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mgL⁻¹ de ZnONPs.

5. CONCLUSÕES

As respostas de emissão de fluorescência, elevação de temperatura superficial, supressão não fotoquímica e crescimento da raiz em sementes e plântulas de *Inga laurina* variam de acordo com a concentração e tipo de nanopartícula;

O aumento de fluorescência máxima no último pulso saturante e o teor de Chl_a em função da intensidade das concentrações de CuONPs, Fe₂O₃NPs e ZnONPs em relação ao Controle, sugerindo a potencialização da eficiência fotoquímica, associado a capacidade antioxidante das sementes de *Inga laurina*;

A germinação e o IVG de *Inga laurina* não foram influenciados pelas nanopartículas de CuO, Fe₂O₃ e ZnO;

O comprimento das radículas e raízes de *Inga laurina* foram menores com a aplicação de nanopartículas de óxido de cobre, mas não influenciaram por nanopartículas de óxido de ferro e óxido de zinco;

De modo geral, as sementes verdes de *Inga laurina* mostram relativa tolerância as nanopartículas metálicas testadas, estas respostas, podem estar relacionadas aos sistemas antioxidantes não enzimáticos.

6. REFERENCIAS

- ADAM, N., et al. A captação e eliminação de nanopartículas ZnO e CuO em *Daphnia magna* cenários de exposição crônica. Pesquisa da Água, p. 249-261, 2015.
- ADAM, N., et al. Distribuições de sensibilidade aguda espécie aquáticas de nanopartículas de ZnO e CuO. A ciência do ambiente total, v. 526, p. 233-242, 2015.
- ADAMS, G.T.; et al. Tolerância ao frio de *Picea* usando a imagem de fluorescência Botânica experimental. 33: 377. 1993.
- ADREES M., et al. O efeito do excesso de cobre no crescimento e fisiologia de importantes culturas alimentares: uma revisão. Pesquisa de Ciência Ambiental e Poluição, 22 (11) 8148-8162, 2015.
- ALVAREZ, S.G., MALDONADO, M., PERTH, A., KUSCHK, P. Caracterização de Agua Residual de Curtiduría e o de Estudo do Lírio aquático em Recuperação de Cromo. Información Tecnológica 15 : 75-80. 2004.
- ALVES, P. L. C. A.; MAGALHÃES, A. C. N.; BARJA, P. R. O fenômeno de fotoinibição da fotossíntese e sua importância no reflorestamento. O Botânico Resenha, v. 68, n. 2, p. 193-208, 2002.
- AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B. de; SOARES, C. R. F. de S.; COMIN, J. J.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Redução da fitotoxicidade do cobre por liming: um estudo da anatomia raiz de jovens videiras (*Vitis labrusca L.*). Fisiologia vegetal e Bioquímica, v. 96, p. 270-280, 2015.
- AMDE, M., et al. Óxido nano fluido de zinco à base de líquido iônico para micro extração líquida assistida de vórtice de mercúrio inorgânico em águas ambientais antes da espectroscopia de vapor frio. Talanta 149, 341e346. 2017.
- ANDRADE, H.P. Análise cienciométrica global em bioindicadores: um panorama das tendências entre os anos 1998 a 2007. Dissertação de Mestrado, Universidade Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Setor de Ciências Biológicas, Goiás, 2010.
- ANDRADE, J.; TAVARES, S.; MALHER, C. Fitorremediação: o uso na melhoria de qualidade ambiental. São Paulo: Oficina de Textos, 2007.
- BAKER, N. R. Fluorescência clorofila: Uma sonda de fotossíntese in vivo. Revisão Anual de Biologia Vegetal, 59, 89-113. 2008
- BAKER, N. R. Um possível papel para o fotosistema II em perturbações ambientais da fotossíntese. Fisiologia Plantarum, Copenhagem, v. 81, n. 4, p. 563-570, 1991.

BAKER, N.R. Fluorescência de clorofila: uma sonda de fotossíntese in vivo. *Revisão Anual Biologia vegetal*, 59:89-113, 2008.

BALL, M. C. et al. Aplicações de fluorescência da clorofila a ecologia florestal. *Fisiologia da planta de diário australiano*, v. 22, p. 311-319, 1994.

BANZATTO, D. A.; et al. *Experimentação agrícola*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 237p. 2006.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolução da pesquisa sobre sementes recalcitrantes. *Scientia Agricola*, v.55, n. especial, p.121-125, 1998.

BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Ciência Agrícola* 55:249-259. 1998.

BARBEDO, C.J. & MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botânica Brasilica*12:145-16, 1998.

BARRENA, R.; CASALS, E.; COLÓN, J.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.; PUNTES, V.; *Chemosphere*. 75, 850, 2009.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. 1998. Geração radical livre de oxigênio dependente do ferro em plantas sujeitas ao estresse ambiental: toxicidade e proteção antioxidante. *Planta e Solo*. 201, 137-147.0.

BETRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. Semente. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Orgs.). *Anatomia vegetal*. Viçosa: UFV, 2003.

BEWLEY, J. D.; PRETO, sementes de M.: fisiologia do desenvolvimento e da germinação. 2ed. Nova Iorque: Plenum Press, 445p. 1994.

BIANCHI, L., GERMINO, G.H., SILVA, M.A., *Adaptação das Plantas ao Déficit Hídrico Acta Iguazu, Cascavel*, v.5, n.4, p. 15-32, 2016.

BIANCHINI, E.; POPOLO, R.S.; DIAS, M.C.; PIMENTA, J.A. Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, Sul do Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, v.17, n.3, p.405-419, 2003.

BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis*. *Hook. & Arn. Científica*, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 379-391, 1997.

BILIA, D.A.C., BARBEDO, C.J., CICERO, S.M. & MARCOS FILHO, J. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas ripárias, com sementes interessantes para a ciência. *Informativo ABRATES* 13:26-30, 2003.

BOCCUNI, F. et al. Exposição ocupacional potencial a nanopartículas fabricadas na Itália. *Journal of Cleaner Production*, v. 16, p. 949-956, 2008.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; et al. Fluorescência de clorofila como sonda da fotoinibição, competência das folhas no campo: uma revisão do instrumento atual. *Ecologia Funcional*, v.3, p.497-514, 1989.

BONNER, J.; GALSTON, A., W. *Cultura de Fisiologia Vegetal*. Tradução ao espanhol de: Federico Portillo. Madrid: 5º Ed, Aguilar, 483p, 1967.

BORGHI, M., R. TOGNETTI, G. MONTEFORTI E SEBASTIANI Respostas do clone de *Populus x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) dada ao aumento das concentrações de cobre. *Environ. Exp. Bot.* 61:66-73, 2007.

BOTELHO, A. L. M. Análise da Contaminação por Óleo na APA de Guapimirim: Aspectos Geoquímicos e Socioambientais. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 94 f. 2003.

BOUWMEESTER, H.; et al. Estudos dos aspectos de segurança de saúde das nanotecnologias em produção alimentar. *Regulamentar toxicologia e farmacologia*, v. 53, n. 1, p. 52-62, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 365p., 1992.

BRAYNER, R; FIÉVET, F; CORADIN, T. *nanomateriais: Um perigo ou uma promessa? Químicas e perspectiva biológica*. Springer, Londres. DOI 10.1007/978-1-4471-42133. 2013.

BRIAT, J. F.; DUBOS, C.; GAYMARD, F. Nutrição de ferro, produção de biomassa e qualidade do produto vegetal. *Tendências Plant Sci.* 20,33-40, 2015.

BRIAT, J. F.; LOBRÉAUX, S. Transporte de Ferro e armazenamento em plantas. *Tendências em Ciência vegetal.* 2, 187-193, 1997.

BRITO, MARCOS EDÉZIO BATISTA. Estudos Biogeoquímicos sem Manguezal da Região Estuarina de Valença – Bahia. Dissertação (Mestrado), Instituto de Geoquímica e Meio Ambiente, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 172 f, 2006.

BROADLEY, M., et al. Função dos nutrientes: micronutrientes, em: Marschner P (Ed) *Nutrição mineral de plantas mais altas*, 3 (Eds). Academic Press, London, pp. 191–248, 2012.

BUSCHMANN, C. Toxicidade aguda do excesso de mercúrio no desempenho fotossintético de cianobacterium, *S. platensis* – avaliação por análise de fluorescência de clorofila. *Quimosfera*, v. 92, p. 261 - 271, 2007.

BUSCHMANN, C., et al. Variabilidade e aplicação da razão de emissão de fluorescência de clorofila vermelho/muito vermelho de licença. *Pesquisa de fotossíntese*, v. 92, p. 261- 271, 2007.

CAIRES A.R.L., et al. Resposta ao estresse hídrico de plantas de soja convencional e transgênica monitoradas por clorofila a fluorescência. *J. Fluorescência* 20: 645-649, 2010.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Avaliando a tolerância da videira selvagem à toxicidade do cobre. *Quimosfera*, v. 120, p. 171-178, fev. 2015b.

CAMBROLLÉ, J.; GARCIA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Crescimento e respostas fotossintéticas ao cobre em videira silvestre. *Quimosfera*, v. 93, n. 2, p. 294-301, setembro de 2013.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLES, S.; FIGUEROALUQUE, E.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Avaliação da tolerância e potencial de acumulação de zinco do arbusto costeiro *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Botânica Ambiental e Experimental*, v. 85, p. 50-57, jan. 2013a.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Tolerância e acúmulo de zinco no arbusto de pântano salgado *Halimione portulacoides*. *Quimosfera*, v. 86, n. 9, p. 867-874, 2012.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; CARNEIRO, R.M.A. Bioindicadores vegetais de poluição atmosférica: uma contribuição para uma saúde da comunidade. Dissertação, Universidade de São Paulo. Riberão Preto. P.146. 2004.

CARNIEL, B. F. Avaliação de Impactos Ambientais e Sociais e o uso de Nanotecnologias na Agricultura: Uma Proposta Metodológica. Tese (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 189 f, 2013.

CARVALHO, N. M. & NAKAGAWA, J. Sementes: Ciências tecnologia e produção. 4. Ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 588p, 2000.

CASCIANO, P. N. S. Eletrodeposição e caracterização de revestimentos de Co-Mo e avaliação frente à corrosão e à reação de desprendimento de hidrogênio. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 76 F. 2009.

CASTRO, L. N; et al. Avaliação ecofisiológica do impacto causado pelo areosol marinho e pela deposição de ferro particulado em *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2010.

CASTRO, M. A.; et al. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CEROVIC, Z.G; et al. Fluorescência induzida por ultravioleta para monitoramento de plantas: estado presente e perspectivas. *Agronomia* 19:543–578, 1999.

CHAERLE, L., LEINONEN, I., JONES, H. G., STRAETEN, D.V.D. Monitoramento e triagem das populações das plantas com imagens combinadas de fluorescência térmica e clorofila. *Jornal Experimental de Botânica*, 58 (4):773-784, 2007.

CHATTERJEE C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impacto da biomassa, rendimento, metabolismo e qualidade da batata (*Solanumtuberosum L.*). *Scientia Horticulturae*, v. 108, p. 1-6, 2006.

CHATTERJEE C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. Impacto do estresse do ferro na biomassa, rendimento, metabolismo e qualidade da batata (*Solanum tuberosum L.*). *Scientia Horticulturae*, v. 108, p. 1-6, 2006.

CLARK, D. A., et al. Fontes ou pias? As respostas das florestas tropicais ao clima atual e futuro e à composição atmosférica. *Transações Filosóficas da Sociedade Real de Londres*, v.359, n.1443, p.477-491, 2004.

CLARK, D. A.; PIPER, S. C.; KEELING, C. D.; CLARK, D. B. Crescimento de árvores de floresta tropical e dinâmica de carbono atmosférico ligada à variação de temperatura interanual durante 1984 - 2000. *Processo da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América*, v.100, n.10, p.5852-5857, 2003.

DAMIÃO-FILHO, C.F. *Morfologia vegetal*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 243p, 1993.

DE LAS RIVAS, J.; BARBER, J. Estrutura e estabilidade térmica do sistema fotográfico II centros de reação estudados por espectroscopia infravermelha. *Bioquímica*, v.36, p.8897-8903, 1997.

DEMMIG-ADAMS, B & ADAMS, III. Fotoproteção e outras respostas de plantas ao estresse de alta luz. *Revisão Anual da Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular vegetal*. 43. 599-626. 10.1146/annurev.pp.43.060192.003123. 2003.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Fotoproteção e outras respostas das plantas ao alto estresse leve. *Revisão Anual da Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular vegetal*, v. 43, p. 599-626, junho de 1992.

DIETZ, K. J.; BAIER, M.; KRÄMER, U. Radicais livres e espécies de oxigênio reativo como mediadores da toxicidade do metal pesado nas plantas. In: *Estresse por metais pesados em plantas*. Springer, Berlim, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_4 p. 73-97, 1999.

DIMKPA CO. et al., As nanopartículas CuO e ZnO afetam de forma diferente a secreção de sideróforos fluorescentes no colonizador raiz benéfico. *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Nanotoxicology* 6:635–642, 2012.

DIMKPA, C. O. et al. CuO nanopartículas: fitotoxicidade, especiação metálica e indução de estresse oxidativo no trigo cultivado na areia. *Jornal Pesquisa em Nanopartículas*, Dordrecht, v.14, n.9, 2012.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Arroz: desordens de nutrientes e manejo de nutrientes. Manila: Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz. 191 p, 2000.

DURÃES, F. O. M., et al. Adaptação de Milho às Condições de Seca: 2. Florescimento e Maturidade Fisiológica de Sementes de Linhagens Contrastantes para o Parâmetro Fenotípico IFMF. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23. Resumos. Uberlândia, MG. ABMS; CNPMS. 2000.

DWIVEDI, R. D., et al. Destino de nanopartículas engenharia: absorção e toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre implicações no meio ambiente em astrócitos cerebrais primários culta. *Comentários de química de coordenação*, v. 287, p. 64-78, 2015.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciências, p.549. 1998.

EULLAFFROY, P., et al. Fluxos de energia e forças motrizes para fotossíntese em *Lemna* menores expostos a herbicidas. *Botânica Aquática*, Amsterdã, v. 90, p. 172-178, 2009.

FADEEL, B; PIETROIUSTI, A; SHVEDOVA; Efeitos adversos de engenharia nanomateriais: exposição, toxicologia e impacto na saúde humana. Imprensa acadêmica de Elsevier, 2012.

FALCO, W. F. et al. Interação entre a clorofila e nanopartículas de prata: uma análise detalhada de temperatura de fluorescência de clorofila. *Diário de fotoquímica e Fotobiologia: química*, v. 299, p. 203-209, 2015.

FANG, W.; WANG, J.; LIN, C.; KAO, C. Indução de ferro de peroxidação lipídica e efeitos sobre as atividades enzimáticas antioxidantes nas folhas de arroz. *Crescimento vegetal* Regulamento. 35, 75-80, 2001.

FARIA, J.M.R., VAN LAMMEREN, A.A.M. & HILHORST, H. W. M. Sensibilidade à dessecação e aspectos de ciclocell em sementes de *Inga vera* subsp. *Affinis*. *Pesquisa e Ciência de sementes*, 14:165-178, 2004.

FIGLIOLIA, M.B. & KAGEYAMA, P.Y. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook et Arn. Em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. *Revista do Instituto Florestal* 6:15-52, 1994.

FIGUEROA, M. E. Tolerância e acúmulo de zinco no arbusto de pântano salgado *Halimione portulacoides*. Quimosfera, v. 86, n. 9, p. 867-874, 2012.

FILARDIL, F. L. R., et al. Padrões de distribuição geográficas de espécies arbóreas de leguminosas ocorrentes no Cerrado. Revista Brasileira de biociências. 5 (2): 1116-1118, 2007.

FLOEGEL, A.; et al. Comparação dos ensaios ABTS/DPPH para medir a capacidade antioxidante em alimentos populares ricos em antioxidantes dos EUA. Jornal de composição e análise de nutrição, Holanda, 2011.

FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Controle fotossintético do transporte de elétrons e regulação da expressão genética, 63 (4), 1637-1661, 2012.

GABRIELE KLUMPP, CLAUDIA M. FURLAN, MARISA DOMINGOS, ANDREAS KLUMPP. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra Cogn.* exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil, Science of The Total Environment, V1 246, Issue 1, p. 79-91, 2000.

GARCIA, S. P.; DINIZ, I. S. S. Comportamento germinativo de três espécies de *Vellozia* da Serra do Cipó. Acta Botânica Brasília, v. 17, n. 4, p. 487-494, 2003.

GENTY B, et al. As relações *Minanos situpatterns* de fotossíntese e fotoinibição entre o rendimento quântico de transporte de elétrons fotossintéticos em arroz cultivado em campo. Fisiologia vegetal 119.553-563, 1989.

GITELSON A.A., et al. Fluorescência de clorofila folha corrigida para reabsorção por meio de medidas de absorção e reflectância. J Plant Physiol 152:283–296, HK.1998.

GOMES CORADIN et al., Frans Germain Corneel (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. Brasília, DF: MMA (Série Biodiversidade; 51). 2002.

GUÉRA, A.; CALATAYUD, A.; SABATER, B.; BARRENO, E. Envolvimento do Complexo Thylakoidal NADH-Plastoquinona-Oxidoreductase nas primeiras respostas à exposição ao ozônio da cevada (*Hordeum Vulgare L.*) Seedling. J. Exp. Bot v.56, p.205–218, 2004.

GUERRA, R., et al. Efeito antimicrobiótico de nanopartículas: ouro e prata para os casos de *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Microporous e Materiais de mesoporos, v. 170, p. 62-66, 2013.

GUIMARÃES, P. R.; AMBROSINI, V. G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Crescimento da aveia preta (*Avena strigosa Schreb.*) e alterações anatômicas

radiculares no solo arenoso com diferentes concentrações de cobre e fósforo. *Poluição de Água, Ar e Solo*, v. 227, n. 192, p. 1-10, 2016.

HAEHNEL, W.; et al. Cinética de fluorescência pico-segundo e transferência em cloroplasto e algas. *Bioquímica e Biofísica Acta*, Amsterdã, v. 680, n. 1, p. 161-173, jan. 1982.

HALLIWELL B., et al. Polifenóis são antioxidantes ou pró-oxidantes? O que aprendemos com a cultura celular e os estudos in vivo? *Arch Biochem Biophys.*; 476(2):107–112. doi: 10.1016/j.abb.2008.01.028. 2007.

HENDRY, G.A.F., et al. Indicadores de estresse: clorofilas e carotenóides. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME J.P. (Eds.) *Métodos em ecologia vegetal comparativa*. Londres: Chapman & Hall, p.148-152, 1993.

HIPKINS, M. F; et al. Espectroscopia, Em Transdução de Energia na Fotossíntese (M. F. Hipkins e N. R. Baker, Eds.), IRL, Oxford, pp. 51-101,1986.

HORTON P., Relações entre transporte de elétrons e assimilação de carbono medição simultânea da fluorescência de clorofila, gradiente de pH transtilakoide e evolução de O₂ em cloroplastos isolados. *Proc R Soc Lond Ser B* 217:405–416. 1983.

HORTON, P.; RUBAN, A. Design molecular do fotosistema II de colheita de luz antena: fotossíntese e fotosproteção. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 441, p. 365-373, 2004.

HORTON, P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. Regulação da colheita de luz em plantas verdes. *Revisão Anual Fisiologia vegetal, Biologia Molecular vegetal*, v.47, p.655-684, 1996.

HULLA, J. E., et al. História da Nanotecnologia e futuro. *Toxicologia humana & experimental*, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

HUSSEIN, A. K., et al. Aplicações da nanotecnologia em energias renováveis- visão abrangente e compreensiva. *Comentários de energia renovável e sustentável*, v. 42, p. 460-476, 2015.

HÜTT, M.-TH. & LÜTTGE, U. Dinâmica não linear como ferramenta para modelagem em fisiologia vegetal. *Biologia Vegetal* 4:281-297, 2002.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. *Regras Internacionais para Testes de Sementes*. Bassersdorf: ISTA, p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50. 2004.

JACKSON, R. D.; KUSTAS, W.P.; CHOUDHURY, B. J. Um reexame do índice de estresse hídrico da cultura. *Ciência da Irrigação*, v. 9, n. 4, p. 309 – 317, 1988.

JENSEN, P. E.; LEISTER, D. Evolução do cloroplasto, estrutura e funções evolução do cloroplasto, estrutura e funções. *F1000 Prime Reports*, 2014.

- JIANG Y, et al. MGA2 está envolvido na indução hipóxica dependente de elemento de baixo oxigênio dependente de genes em *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia de célula molecular* 21(18):6161-9, 2001.
- JIANG, W.; LIU, D.; LIU, X. Efeitos do cobre no crescimento da raiz, divisão celular e nucleares de *Zea mays*. *Biologia Plantarum*, v. 44, n. 1, p. 105-109, 2001.
- JIMENEZ-BELL, M.A., et al. Desenvolvimento e validação de um processo automático de imagem térmica para avaliação do estado da água da planta. *Gestão Agrícola da Água*, 98:1497-1504. 2011.
- JING, X., et al. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre em pilhas epithelial do pulmão expostas ao ar – interface líquido comparado com avaliação in vivo. *Toxicologia in Vitro*, v. 29, n. 3, p. 502-511, 2015.
- JOLIOT P., et al. Regulação do fluxo de elétrons cíclicos e lineares em plantas mais altas. *Proc natl acad sci USA* 108, 13317-13322, 2011.
- JOLIOT, P., JOLIOT, A. Fluxo de elétrons cíclicos em plantas C3. *O Biochim. Biofis. Acta* 1757, 362-8, 2006.
- JOVANOVIC M et al., Perfil dinâmico do ciclo de vida da proteína em resposta a patógenos. *Ciência*. V. 347. Doi: 10.1126/science.1259038, 2015.
- JUCOSKI, G. O. et al. Impacto da toxicidade do ferro no metabolismo oxidativo em plantas jovens eugenia uni *Àora L*. *Acta Fisiologia Plantarum*, v. 35, p. 1645-1657, 2013.
- JUDY, J. D., et al. Evidências para bioamplificação de nanopartículas de ouro dentro de uma cadeia alimentar terrestre. *Ciência ambiental e tecnologia*, v. 45, n. 2, p. 776-781, 2011.
- JULIEN, C., et al. Nanotecnologia para armazenamento de energia. Em: *Baterias de lítio*. Publicação internacional de Springer, p. 461-497, 2016.
- K. B. MISHRA & R. GOPAL. Detecção de estresse induzido por níquel usando assinaturas de fluorescência induzida por laser a partir de folhas de mudas de trigo, *Jornal Internacional de Sensoriamento Remoto*, v. 29, n. 1, p. 157 - 173, 2010.
- KITAJIMA, K; et al. Relação entre fotossíntese e espessura de cotilédones para espécies de árvores tropicais. *Ecologia Funcional*, v.6, n.5, p.582-589, 1992.
- KOPITTKE, P. M.; et al. Efeitos tóxicos do Cu²⁺ no crescimento, nutrição, morfologia radicular e distribuição de nas raízes da grama de Sabi. *Ciência do Meio Ambiente Total*, v. 407, n. 16, p. 46164621, agosto de 2009.
- KRAUSE, G. H.; WEIS, E; *Fluorescência de clorofila e fotossíntese: o básico*. Revisão Anual de Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular vegetal, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

- KRAUSE, G.H., WEIS, E; Fluorescência de clorofila como ferramenta na fisiologia vegetal. *Fotosynth Res.* 5, 139–157, 1984.
- KRAUSE, H.; WEIS, E. In: Aplicações de fluorescência de clorofila. (ed.) Lichtenthaler, H.K.. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1975.
- KUMAR, A. L. I. C.; PORTIS JÚNIOR, A. R. *Arabidopsis thaliana* expressando um quimérico termoestável *Rubisco activase* exibe crescimento aprimorado e taxas mais elevadas de fotossíntese a temperaturas moderadamente altas. *Pesquisa de fotossíntese*, v.100, p.143-153, 2009.
- LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: OEA, 174p, 1983.
- LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Resposta ao excesso de cobre em *Arabidopsis thaliana*: Impacto na arquitetura do sistema radicular, distribuição hormonal, acúmulo de lignina e perfil mineral. *Fisiologia Vegetal e Bioquímica*, v. 48, n. 8, p. 673-682, agosto de 2010.
- LI, H.; ZHOU, Q.; WU, Y.; FU, J.; WANG, T.; JIANG, G.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 684, 2009.
- LIN, D.; XING, B. Fitotoxicidade de nanopartículas: Inibição da germinação de sementes e crescimento radicular. *Poluição Ambiental*, p. 243-250, 2007.
- LINARES J.C., et al. Efeitos interagindo das mudanças climáticas e da cobertura florestal sobre a mortalidade e o crescimento das florestas de abetos mais ao sul da Europa. *Glob. Biogeogr.*, 18, 485-497, 1999.
- LOKVAM, j., Estratégias defensivas divergentes de folhas jovens em duas espécies de Inga. *Jornal de Ecologia Química*, Vol.86, Ed.10. doi.org/10.1890/04-1283, 2005.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 352p, 1998.
- LOVEYS, B.R.; et al. Aclimação térmica da respiração de folhas e raízes: uma investigação comparando espécies vegetais inerentemente rápidas e de crescimento lento. *Biologia da Mudança Global*, v.9, n.6, p.895-910, 2003.
- LU, C. M, CHAU, C. W., ZHANG, J. H. Toxicidade aguda do excesso de mercúrio no desempenho fotossintético de cianobacterium, *S. platensis* – avaliação por análise de fluorescência de clorofila. *Quimosfera*, v. 41, p. 191 - 196, 2000.
- MACHADO, C.F.; CÍCERO, S.M. Aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) (Engl. – *Anacardiaceae*) avaliação da qualidade das sementes pelo teste de raio-X. *Ciência Agrícola*, v.60, n.2, p.393-397, 2003.

MAGUIRE, J.D., et al. Velocidades de seleção e avaliação de ajuda à germinação para o surgimento e vigor das mudas. *Crop. Science, Madison*, v.2, p. 176-177, 1962.

MALINOSKI, F., et al. A aliança de nanomedicines: uma perspectiva da indústria na nanomedicina. *Nanomedicina: nanotecnologia, biologia e medicina*, v. 10, n. 8, p. 1819-1820, 2014.

MANUSADŽIANAS, L., et al. Toxicidade das suspensões de nanopartículas de óxido de cobre 439 para biota aquática. *Toxicologia e Química ambiental*, 31(1): 108-114. 440. 2012.

MARCGRAVE, J. *História Natural do Brasil*. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 1942:111. Ficha de catalogação das práticas – patrimônio imaterial Código: [005].1942.

MARCOS FILHO, J., et al. Dormência de sementes. *J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ. p. 253-289, 2005.

MARKERT, B.A., BREURE, A.M. & ZECHMEISTER, H.G. Definições, estratégias e princípios de Biomonitoramento do ambiente. Em: MARKERT, B.A., BREURE, A.M. & ZECHMEISTER, H.G. *bioindicadores e Biomarcators: princípios, conceitos e aplicações*. Oxford: Elsevier. p. 3-40. 2003.

MARSCHNER, H., et al. *Nutrição mineral de plantas mais altas*. 3.ed London: Elsevier, 643p, 2012.

MARSCHNER, P. *Nutrição Mineral de Plantas Superiores de Marschne*. 3ª ed. London: Academic Press, 651 p, 2012.

MARTINEZ, C. A.; et al. Mecanismos de defesa das plantas a estresses. In: PRADO, R. M.; CECÍLIO FILHO, A. B.; CORREIA, M. A. R.; PUGA, A. P. (Eds.) *Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças*. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/Fundunesp. p.63-90, 2010.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, D.*, KOMÁREK, M. Efeitos comparativos de nanopartículas de ferro zero valente (nZVI) e Fe₂O₃ em nanoescala na condutividade hidráulica radicular de *Solanum lycopersicum* L. *Environmental and Experimental Botany* 131, 128-136, 2016.

MATEOS-NARANJO E, ANDRADES-MORENO L, CAMBROLLÉ J, PEREZ-MARTIN A. Avaliando o efeito do cobre sobre o crescimento, acúmulo de cobre e respostas fisiológicas das espécies de pastagem *Atriplex halimus*: implicações ecotoxicológicas. *Ecotoxicologia e segurança ambiental* 90:136-142, 2013.

MATEOS-NARANJO., et al, Desenvolvimento e validação de um processo automático de imagem térmica para avaliação do estado da água da planta. *Gestão Agrícola da Água*, 98:1497-1504., 90 (2013), pp. 136-142, 2013.

- MAXWELL DP, et al. O crescimento de uma baixa temperatura imita a climatização de alta luz em *Chlorella vulgaris*. *Fisiologia vegetal* 105,535–543. 1994.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Fluorescência de clorofila – Um Guia Prático. *J. Exp. Bot*, n.51, p.659-668, 2000.
- MEBRAHTU, T. & MOHAMED, A. & MERSIE, W. Rendimento do pod verde e traços arquitetônicos de genótipos de soja vegetal selecionados. *jpa*. 4. 395. 10.2134/jpa1991.0395. 1991.
- MEBRAHTU, T.; HAVOVER, J. W. Efeitos da idade da folha sobre fotossíntese e distotal de misitância de mudas de blacklocust. *Fotosynthetica*, Praga, v. 25, n. 4, p. 537-544, 1991.
- MEIR, P.; et al. Respiração de folhas em duas florestas tropicais: restrições à fisiologia por fósforo, nitrogênio e temperatura. *Ecologia Funcional*, v.15, n.3, p.378-387, 2001.
- MELO JÚNIOR, J.C.F. & BOEGER, M.R.T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. *Hoehnea* 42: 207-232. 2012.
- MELO, C.C. Síntese e investigações estruturais de arranjos supramoleculares formados por metaloporfirinas e metalofterocianinas. São Carlos. Universidade Federal de São Paulo. Tese de Doutorado, p. 113, 2012.
- MICHAELS, H J, B BENNER, AP HARTGERINK, TD LEE & S RICE. Variação do tamanho das sementes: magnitude, distribuição e correlações ecológicas. *Ecologia Evolutiva*, 2: 157-166, 1988.
- MILLAR, C. E.; TURK. L. M.; FOTH. H. D. *Fundamentos de La Ciência Del Suelo*. Cía. Editorial Continental. 513p, 1975.
- MILTON, K., et al. Teor de ácido ascórbico de partes de plantas neotropicais disponíveis para macacos selvagens e morcegos. *Experiência*, Basileia, v.43, p.339-342, 1987.
- MIOTTO, A.; MELO, G. W. B. de; SOARES, C. R. F. S.; COMIN, J. J.; BRUNETTO, G. Liming como um melhorizador de toxicidade de cobre em aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.). *Revista de Nutrição Vegetal*. 2016.
- MÍQUEL; et al. Transfer proteico de fosfatidatolína de lipossomos para membranas envelope de cloroplasto de espinafre. *Bioquímica e Biofísica*. *Acta* 937: 219-228. 1987.
- MISHRA A, et al. Ambas as superfícies de interação dentro do domínio da dobradiça de Coesão essenciais para sua associação cromossômica estável. *Curr. Biologia* 20(4):279-89, 2010.

MISHRA, M., et al. Nanotecnologia na medicina. O jornal indiano de coração, v. 68, n. 3, p. 437, 2016.

MORAIS, M.B. Introdução em aves cativas. *Melopsittacus*, Belo Horizonte, v. 2, n. 2/4, p.67-68, 1999.

MORTIMER, M. et al. Alta transação cinética *Vibrio fischer* teste de inibição de bioluminescência para estudo de efeitos tóxicos de nanopartículas. *Toxicologia in Vitro*, v. 22, p.1412-1417, 2008.

NACZK, M., et al., Extração e análise de fenólicos em alimentos. *Revista de Cromatografia A*, 1054:95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extração e análise de fenólicos em alimentos. *Jornal de Cromatografia*, Amsterdam, v. 1054, n.1-2, p. 95-111, 2004.

NAIR, A.P. Métodos massivamente paralelos para aprendizado de reforço profundo. Na Oficina de Deep Learning, ICML, M. Riedmiller. Instalado neuralmente. *Arabidopsis thaliana* expressando um quimérico termoestável Rubisco activase exibe crescimento aprimorado e taxas mais elevadas de fotossíntese a temperaturas moderadamente altas. *Pesquisa de fotossíntese*, 2015.

NAIR, Prakash M. Gopalakrishnan; CHUNG, Ill Min. Alterações no crescimento, Status redox stress e expressão oxidativa relacionados a Genes em grão de bico (*Cicer arietinum L.*) em resposta à exposição de nanopartículas de óxido de cobre. *Jornal Regulação do crescimento vegetal*, v. 34, n. 2, p. 350-361, 2015.

NEL, A.; et al. Potencial tóxico de materiais no nanonível. *Science*, v. 311, n. 5761, p. 622 - 627, 2017.

NELLIS, S. C., CORREIA, A. F. K., SPOTO, M. H. F. Extração e quantificação de carotenóides de mini-tomates desidratados (Uva Doce) aplicando diferentes solventes. *Braz. J. Food Technol.*, v. 20, e2016156, 2017.

NELSON, N., et al. Evolução do fotosistema I e o controle da entalpia global em uma palavra oxidante. *Fotossíntese Res*, 116 145-151, 2013.

NELSON, N.; JUNGE, W. Estrutura e transferência de energia em fotosistemas de oxigênio fotossíntese, *Revisão Anual da Bioquímica*, Vol. 84: 659-683, junho de 2015.

NILSSON, H.E. Sensoriamento remoto e análise de imagem em patologia vegetal. *Jornal Canadense de Patologia de plantas*. 17:154-166,1995.

NISHIKAWA, M., et al. Simulação de elemento finito para modelagem de placas compostas submetidas a impacto de corpo macio e alta velocidade para aplicação ao problema de ataque

- de pássaros de lâminas de ventilador compostas. *Estruturas Compostas*, 93(5),1416-1423. doi: 10.1016/j.compstruct.2010.11.012, 2012.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I., MURATA, N. Estrutura e Transferência de Energia em Fotosistemas de Fotossíntese Oxigena. *O Annu. Rev. Biochem.*, 84, 659-683, 2015.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I., MURATA, N. A síntese de proteínas é o principal alvo das espécies reativas de oxigênio na fotoinibição do fotossistema II. *Physiology. Plant.* 142, 35–46. 2011.
- NOBEL, P. S. Fotoquímica da fotossíntese. In: *Fisiologia fisiológica e ambiental*, Academia Press. Inc. Nova York. p. 245-296, 1991.
- OGREN, E.; OQUIST, G. Fotoinibição da fotossíntese em *lemna-gibba* induzida pela interação entre luz e temperatura 2. Transporte de elétrons fotossintético. *Fisiologia Plantarum*, v.62 n.2, p.187-192, 1984.
- OLIVEIRA, I. V. de M.; COSTA, R. S.; ANDRADE, R. A. de & MARTINS, A. B. G. Influência do tamanho da semente na emergência das plântulas de longan (*Dimocarpus longan*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, 27 (1): 171 – 172, 2005.
- OLIVEIRA, N. J. F. et al. Hemograma, bioquímica séptica e características histológicas hepáticas em bovinos após administração de polpa cítrica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57 (3): 418-422. 2005.
- OTTO, R; et al. Fitomassa de raízes e da parte aérea da cana-de-açúcar relacionada à adubação nitrogenada de plantio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.44, n.4, p.398-405, 2007.
- OUZOUNIDOU, G., et al. Respostas das plantas de milho (*Zea mays L.*) ao estresse de cobre I. Crescimento, conteúdo mineral e ultraestrutura de raízes. *Botânica Ambiental e Experimental*, v. 35, n. 2, p. 167-176, Apr. 1995.
- PASCHOALINO, M., et al. "Os nanomateriais e uma questão ambiental". *Química Nova*, v. 33, n. 2, p.421-430, 2010.
- PEIXOTO, P.H.; PIMENTA, D.S. & CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia*, 66:17-25, 2007.
- PEKAL, A., BIESAGA, M. & PYRZYNSKA, K. Interação da quercetina com íons de cobre: complexação, oxidação e reatividade a radicais. *Biometals* 24, 41–49, 2011.
- PENNINGTON, T.D., et al. *O gênero Inga*. The Royal Botanic Garden. Kew. 839p, 1997.

PEREIRA, E. G. Efeito tóxicos do ferro: alterações fisiológicas e morfológicas em plantas cultivadas e de restinga. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2009.

PEREIRA, E. G., et al. O excesso de ferro afeta a fotossíntese do arroz através de limitações estomatal e não estomatal. *Planta Sci.* 201-202, 81-92, 2013.

PHUTHONG, W. et al. O uso da microscopia de força atômica do modo de contato no meio aquoso para análise estrutural de complexos fotossintéticos de espinafre. *Fisiologia Vegetal*, 69(2):1318-32, 2015.

POPINIGIS, F., et al. Fisiologia da semente. AGIPLAN, Brasília, DF, 289p, 1985.

PRADO, R. M. Nutrição de plantas. São Paulo: Editora Unesp, 407 p, 2008.

PRITCHARD, H.W.; HAYE, A.J.; WRIGHT, W.J. & STEADMAN, K.J. Estudo comparativo da viabilidade das sementes nas espécies de Inga: tolerância à dessecação em relação às características físicas e composição química do embrião. *Sementes Ciência e Tecnologia* 23: 77-89, 1995.

QUEIROZ, A. M. et al. Supressão de fluorescência de clorofila induzida por nanopartículas de prata. *Espectroquímica Acta parte r: Molecular e espectroscopia Biomolecular*, v. 168, p. 73-77, 2016.

RAMÍREZ, A. J. F.; COELHO, R. D.; PIZANI, M. A. M.; SILVA, C. J. S. Determinação do índice de estresse hídrico em tomateiros cereja (*Lycopersicon Solanum var. cerasiforme.*), com câmara infravermelha. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada* v.9, nº.4, p.218 - 224, ISSN 1982-7679. 2015.

REICH, P., Limitação de nitrogênio restringe a sustentabilidade da resposta do ecossistema ao CO₂. *Nature* 440, 922–925, 2006.

RESSEL, K. et al. Ecologia morfofuncional de plântulas de espécies arbóreas da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 311-323, abr./jun. 2004.

RIZWAN, et al. Uma revisão crítica sobre efeitos, mecanismos de tolerância e gestão do cádmio em vegetais. *Quimiosfera*. 182. 10.1016/j.chemosphere.2017.05.013. 2017.

ROCHA PEREIRA et al., Efeito da deriva de glyphosate sobre algumas características fisiológicas em plantas de eucalipto. *Interciência [en linea]* , 35 ISSN 0378-1844, 2010.

RODRIGUES, H.S.; et al. Peso da amostra para determinação de umidade através do método de estufa em sementes de olerícolas. In: XIV Congresso de Iniciação Científica 2007.

RUBAN, A. V. Evolução o sol: otimização da colheita de luz na fotossíntese. *Jornal de Botânica Experimental*, 2014.

SALAMANCA-BUENTELLO, F., et al. Uma paisagem de nanotecnologia, Nanoethics e desenvolvimento sustentável. Em: bioética Global: O impacto do Comitê Internacional de Bioética UNESCO. Publicação internacional de Springer, p. 101-123, 2016.

SAMART, SUTICHAJ & CHUTIPAIJIT, SUTEE & PHAKAMAS, NITTAYA. Avaliação do efeito de nanopartículas de óxido de zinco nas respostas fisiológicas de nove cultivares de arroz não sensíveis ao fotoperíodo. *Materials Today: Proceedings*. 4. 6430-6435. 10.1016, 2017.

SANDRIN, N.; POZZER, E. É.; FERRAZZA, A. C.; LOPES, A. C.; RESCHKE LAJÚS, C.; LOPES DA LUZ, G.; SILVA L. L. Qualidade fisiológica de sementes de culturas agrícolas tratadas com nanopartículas de óxido de zinco (Zno). *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE AGRONOMIA*. N 32, – Periódico Semestral. ISSN: 1677-0293, 2017.

SANTANA, N. A.; FERREIRA, P. A. A.; SORIANI, H. H.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Interação entre fungos micorrízais arbusculares e vermicomposta em fitoremediação de cobre em solo arenoso. *Ecologia do Solo Aplicado*, v. 96, p. 172-182, novembro de 2015.

SAQUIB, Q.; et al. Genotoxicidade de nanopartículas de óxido férrico em *Raphanus sativus*: Decifrando o papel dos fatores de sinalização, estresse oxidativo e morte celular. *J. Environ. Sci.* 47, 49, 2016.

SCHREIBER, U.; et al. In: Resposta da planta ao estresse. (ed.) Tenhunen, G.D. Springer Verlag, Berlin, 1987.

SEJIMA T., et al. A luz repetitiva de pulso curto inativa principalmente o fotosistema I em folhas de girassol. *Physiol*, 55: 1184-1193, 2014.

SEJIMA, T., TAKAGI, D., FUKAYAMA, H., MAKINO, A., MIYAKE, C., 2014. A luz repetitiva de pulso curto inativa principalmente o fotosistema I em folhas de girassol. *Physiol de Células Vegetais*. 55, 1184-1193, Doi:10.1093/pcp/pcu061. 2006.

SHABALA, L.; ROSS T.; MCMEEKIN, T.; SHABALA, S. medições não-invasivas de fluxo de íons microeletrodos para estudar as respostas adaptativas de microorganismos no ambiente. *(FEMS) Microbiology Reviews*, v. 30, p. 472-486, 2006.

SHARMA S, et al. Papel de *Saccharomyces cerevisiae* TAN1 (tRNA acetyltransferase) no fator de iniciação eucariótica 2B (eIF2B) - controle de tradução mediado e resposta ao estresse. *3 Biotecnologia*7(3):223. 2017.

SHARMA, S.; UTTAM, K. N. Análises rápidas do estresse das nanopartículas de óxido de cobre em plantas de trigo em estágio inicial por laser induzem fluorescência e refletores totais

atenuados Fourier transformam espectroscopia infravermelha. Espectroscopia vibracional, Amsterdam, v. 92, p. 135-150, 2017.

SHARMA, V. et al. DNA danificando potencial de nanopartículas de óxido de zinco em células epidérmicas humanas. Cartas Toxicológicas, v. 185, n. 3, p.211-218, mar. 2009.

SHAW, A. K; HOSSAIN, Z.; Avaliação de stress da nano-CuO em arroz (*Oryzasativa L.*). Chemosphere, v. 93, n. 6, p. 906-915, 2013.

SHI J, et al. Perfil de proteômica comparativa da levedura oleagiosa lipídica-acumulada: uma análise lc-MS/MS acoplada a iTRAQ. PLoS One 8 (12): e 85532. 2013.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. Química Inorgânica. Bookman, ISBN: 9788577801992, 2008.

SILVA A. D.; KLINK, C. A. Dinâmica de foliação e perfilhamento de duas gramíneas C4 e uma C3 nativas do Cerrado. Revista Brasileira de Botânica. 24,441-446, 2001.

SILVA, M. M. P.; VASQUEZ, H. M. V.; BRESSAN-SMITH, R.; COELHO DA SILVA, J.F.; D'AVILA ERBESDOBLER, L.; ANDRADE JUNIOR, P. S. C. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. R. Bras. Zootec., v.35, n.1, p.67-74, 2006.

SILVEIRA, V. C., et al. Influência do ferro sobre o estado mineral de duas cultivares de arroz (*Oryza sativa L.*). Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 12, p. 127-139, 2007.

SIQUEIRA-SILVA, A. I., et al. Formação de placa de ferro e morfoanatomia de raízes de espécies de repouso submetidas ao excesso de ferro. Ecotoxicologia e Segurança Ambiental, v. 78, p. 265-275, 2012.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Ed. Bookman, Porto Alegre, 2009.

SMOLIKOVA, G., A atividade fotoquímica muda acompanhando a embriogênese da ervilha (*Pisum sa-tivum*) com cotiledons amarelos e verdes. Biologia Funcional de Plantas 45(2):228–235. 2017b.

SMOLIKOVA, G., et al. Regulação genética e hormonal da degradação de cloro-rophyll durante a maturação de sementes com embriões verdes. Revista Internacional de Ciência Molecular, 18: E1993. 2017a.

STAMPOLIS, D. SINHA, S.K; WHITE, J. C. Fitotoxicidade dependente de ensaios de nanopartículas para plantas. Ciência Ambiental & Tecnologia, Washington, v.43, p. 9473-9479, 2009.

STIRBET A., GOVINDJEE. Sobre a relação entre o efeito Kautsky (clorofila uma indução de fluorescência) e o Fotosistema II: Noções básicas e aplicações do transitório de fluorescência OJIP. *Revista de Fotoquímica e Fotobiologia B: Biologia*, 104:236-257, 2011.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Medição de transitórios de fluorescência rápida para abordar questões ambientais: O teste jip. In: mATHIS, P. (Ed.). *Pho-tossíntese: da luz à biosfera*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 977-980, 1995.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Análise da clorofila *a*. In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (Ed.). *Clorofila transitória de fluorescência uma fluorescência: uma assinatura de fotossíntese*. Países Baixos: Primavera. v.14, p. 321-362, 2004.

SUH, H.; KIM, C. S.; LEE, J.; JUNG, J. Efeito fotodinâmico do excesso de ferro no fotosistema II função em plantas de ervilha. *Fotoquímica e Fotobiologia*.75, 513-518, 2002.

SUN, Y.; XIA, et al. Síntese controlada pela forma de nanopartículas de ouro e prata. *Science*, Washington, United States of America, v. 298, p. 2176-2179, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, Artmed. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed. 918p, 2013.

TAY, H., et all. Encomenda orbital de carga em estruturas de baixa temperatura de magnetita: GGA+Uinvestigations. *Revisão Física B74*, 195115, 2006.

TIECHER, T. L., et al. Estado fisiológico e nutricional da aveia preta (*Avena strigosa Schreb.*) Cultivada no solo com interação de altas doses de cobre e zinco. *Fisiologia Vegetal e Bioquímica*, v. 106, p. 253-263, 2016b.

TIECHER, T. L., et al. O potencial de *Zea mays* L. na reparação de solos contaminados de cobre e zinco para a produção de uvas. *Geoderma*, v. 262, p. 52-61, jan. 2016a.

TREVIZM, A.R. SILVA, M.L.S. Interações iônicas e seus efeitos na nutrição das plantas. *Jornal de Informações Agronômicas*. Brasil, n ° 149, p. 10-16, 2015.

TSUTAE, F.M.Y. Processos ópticos e interação entre nanopartículas e sistemas moleculares. São Carlos. Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado, p. 89, 2011.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. O uso de nomenclatura de fluorescência de clorofila na fisiologia do estresse vegetal. *Pesquisa de fotossíntese*, Haia, v. 25, n. 1, p. 47-150, jan. 1990.

VIEIRA JÚNIOR, P. A.; et al. Relações entre o potencial e a temperatura da folha de plantas de milho e sorgo submetidas a estresse hídrico. *Acta Scientiarum Agronômica*, v.29, p.555-561, 2007.

WANG, B., et al. Acute toxicidade de escala nano e micro pó de zinco em adultos saudáveis ratos. *Letras de toxicologia*, v. 161, n. 2, p. 115-123, 2006.

WANG, S., et al. O efeito de CuO NPs em espécies reativas de oxigênio e ciclo celular expressão gênica em raízes de arroz. *Química e toxicologia ambiental*, v. 34, n. 3, p. 554-561, 2015.

WILHELM, C.; SELMAR, D. A dissipação de energia é um mecanismo essencial para sustentar a viabilidade das plantas: Os limites fisiológicos da fotossíntese melhorada. *Jornal da Fisiologia de plantas*, 168(2), 79-87, 2011.

YAMORI, W., MAKINO, A., SHIKANAI, T. Um papel fisiológico do transporte de elétrons cíclicos em torno do fotosistema I na sustentação da fotossíntese luz flutuante no arroz. *Sci. Rep.* 6, 20147, Doi:10.1038/srep20147. 2016.

YAMORI, W.; SHIKANAI, T. Funções fisiológicas do transporte de elétrons cíclicos em torno do fotosistema I na sustentação da fotossíntese e crescimento vegetal. *Revisão Anual de Biologia Vegetal*, 81-106, 2016.

YANG J, et al. O tamanho da célula e a taxa de crescimento são os principais determinantes da vida útil replicativa. *Ciclo celular* 10(1):144-55, 2011.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ACHAL, V. Crescimento e respostas fisiológicas da uva (*Vitis vinifera* *Acta Physiologiae Plantarum*) ao excesso de zinco. *Acta Physiologiae Pantarum*, v. 33, n. 4, p. 1483-1491, julho de 2011.

YRUELA I., et al. Metais de transição na fotossíntese de plantas. *Metalomics* 5(9) 1090-1109, 2013.

ZABRIESKI, Z., et al. Atividade pesticida de nanopartículas de óxido de metal em isolados patogênicos de plantas de *Pythium*. *Ecotoxicologia*, v. 24, n. 6, p. 1305-1314, 2015.

ZENGİN, F. K.; MUNZUROĞLU, O. Efeitos de alguns metais pesados sobre o conteúdo de clorofila, prolina e alguns produtos químicos antioxidantes em mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biológica Cracoviensia Series Botânica*, v. 47, n. 2, p. 157-164, 2005.

ZHAO P, et al. Maigo2 está envolvido em resposta abscisa mediada por ácido a estresses abióticos e transporte retrógrado Golgi-to-ER. *Plano Fisiológico* 148(2):246-60, 2013.

ZHAO, L; et al. Influência de nanopartículas de CeO₂ e ZnO em marcadores fisiológicos de pepino e bioacumulação de Ce e Zn: Um estudo do ciclo de vida. *Jornal de Agricultura e química nutricional*, Washington, v.61, p. 11945-11951, 2013.

ZHU, X.; TIAN, S.; CAI, Z. Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro em fases iniciais da vida do peixe-zebra (*Danio rerio*). *PLoS One* . 7, 2012.

ZIVCAK, M.; et al. Transporte de prótons e elétrons fotossintéticos em folhas de trigo estresse prolongado e moderado de seca. Revista de Fotoquímica e Fotobiologia, B, Biologia, 137, 107-15. 2014.

ZUVERZA-MENA, N.; et al. Exposição de nanopartículas em plantas: Estudos de Respostas fisiológicas e químicas. Plantas Fisiologia e Bioquímica.110, 236, 2017.

ANEXO 1
Artigo publicado em 2021



An Acad Bras Cienc (2021) 93(3): e20190739 DOI 10.1590/0001-3765202120190739

Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences

Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690

www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

ECOSYSTEMS

Effects of copper oxide nanoparticles on germination of *Sesbania virgata* (FABACEAE) plants

ELIENE S. DOS SANTOS, DANIELA E. GRACIANO, WILLIAM F. FALCO, ANDERSON R. LIMA CAIRES & EDUARDO J. DE ARRUDA

Abstract: Nanotechnology is a field that, over the years, has been growing in several research areas, such as medicine, agriculture and cosmetics, among others. As a result, there is a continuous increase in the production, use and disposal of these materials in the environment. The behaviour and (bio) activity of these materials in the atmosphere, water and soil are not fully studied. Therefore, it is necessary to carry out an analysis of the risks of contamination, as well as the possible effects and impacts of nanoparticles (NPs) on the ecosystem. In an attempt to investigate these effects on plants, the present study aimed to investigate the impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) on the seed germination process of *Sesbania virgata*. For this, the *Sesbania virgata* seeds were subjected to different concentration of CuO NPs (0, 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹) and their germination and development were monitored by optical analysis (thermography and chlorophyll *a* fluorescence). The results show that the CuO NPs induced a reduction on the maximum emission of chlorophyll *a*, which was concentration-dependent. The data also showed that CuO NPs promoted an increase in the energy dissipated by non-photochemical pathways and the surface temperature of the seeds. Additionally, our findings revealed that CuO NPs caused a root growth inhibition. In summary, the present study demonstrates, for the first time, that CuO NPs can negatively affect the physiological status and development of the *S. virgata* plant, by altering the efficiency of the functioning of photosystem II in its initial developmental stage, depending on the concentration of CuO NPs.

Key words: root growth, oxidative stress, metals, chlorophyll fluorescence, nanomaterials.

INTRODUCTION

Nanotechnology is revolutionary, applicable in various sectors and has the potential to benefit human health and the environment; however, it is necessary to consider the risks and impact of the production and disposal of nanoparticles (NPs) on the environment and organisms (Carniel 2013). The most accepted definition for the term *nanomaterials* (NMs) includes natural or man-made particles with at least one dimension less than 100 nm; NPs are widely accepted as materials with at least two

dimensions less than 100 nm (Klaine et al. 2008). The possible interactions with ecosystems and organisms occur when commercial products are released into the environment, for example silver nanoparticles (Ag NPs) used in the textile industry or titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) in cosmetics. Thus, the studies with NPs carried out to date should be regarded as a hypothesis because, on the level of exposure that occurs today, these results would not be observable naturally (Brayner et al. 2013). However, an increasing concentration of NPs in

the environment (bioaccumulation) should be expected over the time, as mostly engineered NPs are not biodegradable.

A previous study reported that the chlorophyll *a* fluorescence of Soybean (*Glycine max* L. Merr.) plants was impacted when subjected to gold nanoparticles (Au NPs) during the seed germination stage. Au NPs induced a suppression of the chlorophyll *a* fluorescence, and that was dependent on the size and concentration of NPs. This phenomenon was mainly attributed to the effect of the transfer of electrons (e^-) through photoinduction of chlorophyll molecules (Chl) contacting Au NPs, resulting in a decrease in the chlorophyll fluorescence signal. The smallest Au NPs (5 nm) induced the highest fluorescence suppression (Falco et al. 2011). In another study, leaves of fava bean (*Vicia faba* L.) had their chlorophyll fluorescence impacted when subjected to Ag NPs. In addition, the interaction between Chl and Ag NPs was dependent on the size and concentration of the metal NPs (Queiroz et al. 2016). Therefore, the particle size and distribution are of the great importance for the adverse effects of NPs on plants. On the nanometric scale, the effective area available is considerably increased, changing the nature of the interactions between the molecular forces of the material. This affects the impacts that these processes or nanotechnological products can cause to the environment, human health and society in general.

The impacts caused by the release of pollutant loads with NPs and/or NMs and intervention scenarios is an area of interest for researchers, mainly those investigating plants, which are an important part of the ecosystem; plants may be able to remove, immobilise or even reduce the availability of nanomaterials (Andrade et al. 2007). In addition to the relevance of plant-NP interactions as trophic relationships, they have potential uses as bioindicators of

environmental contamination, through the evaluation of sensitivity responses depending on the type, size and/or concentration of NPs.

Bioindicators or environmental indicators are important tools used to correlate a given anthropic factor (human-made changes) or a natural factor with a potential impact. This may include an important assessment of ecological integrity, as in the condition of an area or organism. These studies can be performed by comparing individuals, the structure and function of a biological community between an impacted area and reference areas (Andrade 2010). For example, *Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes* are indicator species of polluted aquatic environments because they develop in places with high concentrations of organic matter, micronutrients and macronutrients. These species are used as indicators of pollution levels, because they have a high growth rate and an excellent ability to absorb and concentrate metallic pollutants in aquatic systems; moreover, they do not show symptoms of poisoning at high pollutant concentrations (Bettinelli et al. 2000). Species such as *Utricularia breviscapa* (utricularia), *Nymphaea elegans* (water lilies) and *Nymphoides indica* (nymph) are also bioindicators of environmental pollution (Pompêo 2008). Research conducted with the plant *Cicer arietinum* L. (chickpea) exposed to different concentrations of copper (II) oxide NPs (CuO NPs) showed that the NPs interfered in the growth of the plant, causing a delay in the growth of roots and stems (Nair & Chung 2015a). Another study showed that the growth of rice (*Oryza sativa* CV. *Swarna*) was affected at three different levels of stress caused by copper II oxide (CuO NPs) (0.5 mM, 1.0 mM and 1.5 mM CuO NPs, < 50 nm particle size). Based on these results, it was concluded that the rate of germination of the plant was significantly reduced. In addition, it was evident

that, in leaves, oxidative eruptions occurred (Shaw & Hossain 2013).

Another study examined the effects of CuO NPs on the germination of seedlings of green peas (*Pisum sativum* L.) at different concentrations (0, 50, 100, 200, 400 and 500 mgL⁻¹). The experimental results demonstrated that there was a significant reduction in plant growth (shoot and root length), increased generation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, and oxidative degradation of lipids induced by NPs (Nair & Chung 2015b, Nair & Chung 2017).

In Van et al. (2016), strains of transgenic cotton (Bt-29317) and conventional cotton (Jihe 321) were subjected to different concentrations (0, 10, 200 and 1000 mgL⁻¹) of CuO NPs. They found that CuO NPs significantly inhibited the growth and development of transgenic and conventional cotton, impacting the height, root length, number of roots and biomass production when subjected to CuO NP concentrations over 10 mgL⁻¹. They also demonstrated that the CuO NPs mainly aggregated in the root outer epidermis. Nevertheless, CuO NPs aggregates were found in the leaf epidermis, and also reached leaf cells by endocytosis.

Metal-oxide nanoparticles (NPs) such as copper oxide (CuO NPs) offer promising perspectives for the development of novel agro-chemical formulations of pesticides and fertilisers. (Simonin et al. 2018) showed that CuO NPs can have detrimental effects on microbial activity in soils with different physicochemical properties that had been previously exposed to various agricultural practices. The experiments showed that CuO NPs had detrimental effects on soil microbial activities, but most effects occurred at the highest concentration tested (100 mgkg⁻¹). Similar to previous studies, they observed that the negative effects of CuO NPs increase over time, indicating that short-term

studies (hours, days) may underestimate the risks posed by these contaminants. The presence of plants influences the microbial response to CuO NPs exposure but does not mitigate or compensate for the effects.

Mosa et al. (2018) investigated toxicity on the physiological, phenotypical, biochemical and genomic levels. It was found that Cu NPs in the size range of 10-30 nm (50, 100 and 200 mgL⁻¹ of Cu NP powders) were toxic to *Crocus sativus*. Cu NPs showed a decrease in the total biomass of the treated *C. sativus* plants. The analysis demonstrated that Cu NPs accumulated in *C. sativus* plant tissues, with higher accumulation levels in root tissues. The genotoxic effect of Cu NP induced genomic DNA modifications in *C. sativus*. Additionally, Cu NP led to a significant decrease in chlorophyll a and b contents, an increase in H₂O₂ and MDA contents, as well as an increase in electrolyte leakage which induced damage to the cucumber root plasma membrane. They demonstrated that Cu NP induced oxidative stress in *C. sativus* and Cu-Zn SOD gene expression was induced under Cu NP treatment.

Sesbania virgata (Cav.) Pers. belongs to the family Leguminosae (Fabaceae), the subfamily Faboideae (Papilionoideae) (Shuguang et al. 2009). The species is popularly known as Sesbania, bean, sarazinho and mother-jose. The genus *Sesbania* is characterised by species tolerant of poor soils with a high content of heavy metals and a high level of adaptability when subjected to biotic and abiotic stresses (Yang et al. 2003). *S. virgata* is a fast-growing pioneer species, a perennial weed that reproduces by seeds, with a shrubby habit that can achieve 2 to 4 m tall. It is a native species with quick growth and hardiness, showing its potential for planting in degraded areas or in recovery, as well as desertified areas and for the restoration of riparian forests (Delarmelina et al. 2014, Araújo

et al. 2004). In addition to bringing physical benefits to the soil with its highly branched root system, it prevents erosion and serves to support reforestation and the maintenance of areas in recovery (Zanandrea et al. 2009). It produces a large number of seeds with high viability, which are scattered within indehiscent fruits that can float in the water for the dispersal of the species (Pott & Pott 1994). The seeds of the species undergo rapid germination and are homogeneous, an unusual feature among the seeds of native plants. They present dormant endosperm seeds that accumulate tegmental galactomannan as a polysaccharide in the cell wall. The germination process of these seeds occurs on the second or third day after soaking (Buckeridge & Dietrich 1996, Tonini et al. 2007).

In this context, the present study aimed to detect changes in the functioning of the photosynthetic apparatus of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. induced by CuO NPs. For this, non-destructive optical methodologies were applied for investigating the phytotoxicity effects of NPs on *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. seedlings when subjected to different concentrations of NPs.

METHODOLOGY

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs)

Copper (II) oxide nanoparticles (CuO NPs were acquired from Aldrich (USA) in powder - cod. 544868 - 5g - Copper(II) oxide - nanopowder < 50 nm particle size (TEM) (www.sigma-aldrich.com)). The specification of the product does not indicate the purity of the nanoparticles. Transmission Electron Microscopy (TEM) - Morgagni 268D 100 kV (FEI) was used to determine the morphology and mean diameter of the nanoparticles.

Prior to the TEM image collection, the CuO NPs were sonicated for 15 min in isopropyl alcohol solution. Then, samples were prepared by

placing a drop of isopropyl alcohol nanoparticle solution on a holey carbon grid and dried in vacuum during 3 h before the microscopy analysis. The nanoparticle size distribution was estimated from the measurement of about 100 particles. The analyzed material was extremely agglomerated, which made it difficult to count a larger number of nanoparticles. The morphology and diameter of the CuO NPs were determined by means of ImageJ software.

Dynamic Light Scattering (DLS) technique was used to determine the hydrodynamic size of the CuO NPs, as well as to calculate their mean hydrodynamic size distribution, Polydispersity Index (PDI), and Zeta Potential (ZP). The analysis was performed using the Zetasizer Nano ZSP equipment (Malvern instruments), using the following parameters: laser wavelength of 633 nm (He-Ne), scattering angle of 173°, temperature of 25°C and average refractive index of 1.390. The samples were prepared with ultrapure water and DMSO at concentration of 1% (v/v) and then placed in a cuvette. For each sample, three measurements were performed and the mean value was recorded.

The CuO NPs (~50 nm), in powder, were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) with a dispersive x-ray energy spectroscopy system (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy - EDS). The equipment is a bench system, brand Phenom-World, model Phenom Pro X. The system has a nominal resolution ≥ 14 nm, magnification of 80 - 130000x, elementary detection range that varies from Carbon (C) to Amerício (Am), source electron CeB6, color navigation camera with 20 to 135x zoom and variable voltage acceleration from 5 - 15 kV. The equipment has an EDS detector of the SDD type (Silicon Drift Detector) with integrated software for determining the elemental composition, simultaneously identifying the different elements of the sample.

The measurements were carried out using carbon tape for conductivity and deposition of the samples.

Seed selected in this study

We used the seed of *S. virgata* collected in the Pantanal-MS, Passo da Lontra 184, Corumbá / MS in October 2015. The processing of the seeds was manual. The seeds were obtained from plants, in a number exceeding 20 individuals for the maintenance of genetic diversity. The tested seed lot was kept in a dark seed dispersal box under refrigeration. Prior to germination, the seeds underwent a mechanical scarification process by sanding, which consisted of submitting the seeds to friction, wear and tear with sandpaper, to damage the skin. This is one of the most efficient processes to enhance hydration, permeation and germination in this species (Camargos et al. 2008).

For the bioassays, the CuO NPs were dispersed in aqueous solutions using ultra-pure water and agitated in an ultrasonic bath for 30 minutes. The seed was scarified by sanding, to facilitate the hydration of the reserve, and then soaked in CuO NPs dispersion at concentrations of 0 (control group), 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹. Each group was kept submerged in 5 mL of the solution in a beaker for 12 h in an orbital agitator (TECNAL) with a 5 rpm rotation adjustment to facilitate soaking the seeds and for better absorption/internalization of the NPs.

Evaluation of germination

After immersion, the seeds were placed in Petri dishes with moistened double filter paper and kept in a germination chamber with controlled temperature, humidity and photoperiod, providing ideal conditions for the germination and growth of the species. The seeds were maintained at 25°C with a 12 / 12 h dark / light photoperiod and 65 / 70% humidity with an

actinic intensity of approximately 300 μmolm⁻²s⁻¹. For each concentration of NPs used, 12 seeds were evaluated. *In vivo* analyzes were performed for 6 days. The first 24 h were immersed and, from the second day on, thermal image measurements were performed, the kinetics of the chlorophyll fluorescence image and the stationary fluorescence were evaluated in 5 days and after 5 days, the root size of each seed was measured. After the collected data, the average for each seed lot was applied and the standard deviation for concentration was applied. The data presented will be relative to the means of each group (0, 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹). These procedures were applied to the study of the proposed material, copper oxide nanoparticles (CuO NPs).

OPTICAL TECHNIQUES USED FOR DETECTING STRESS IN PLANTS

Infrared thermography

Thermal images obtained through a thermographic Testo® camera with an infrared detector with a 2.3-megapixel resolution, in which the temperature scale is indicated by false-colour gradients. The equipment has a temperature range between -20 to 350°C. An image was collected for each Petri dish containing 12 seeds for each concentration tested. From the Testo® software, the average temperature of each seed was obtained from the analysis of the temperature in different parts of the 12 seeds. These data were subsequently submitted to analysis of variance; the comparisons between means were performed using Student's t-test with 95% reliability. These measures were carried out after a period of adaptation to the dark for 30 minutes, to avoid any temperature changes influenced by light irradiation and with a control temperature at 25°C.

Kinetics of chlorophyll a fluorescence imaging

To conduct the study on the influence of NPs on the photosynthetic apparatus of plants *in vivo*, the kinetic fluorescence imaging technique was applied, using a closed FluorCam FC-800 C Mark Photon Systems instrument. Composed basically of panels of LEDs used as an excitation source with actinic light intensity above $2500 \mu\text{mol}$ (photons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a CCD camera collecting plant fluorescence in the region between 400 to 1000 nm, this apparatus provides images with a resolution of 512 x 512 pixels at a rate of 50 frames per second. The system is close, allowing the adjustment of the dark seed, before it was exposed to radiation. Before the measurements, the seeds were adapted to the dark for 30 minutes to ensure that all reaction centres were open, allowing for a more effective measure of fluorescence. For the kinetic fluorescence imaging technique, white light was used as an excitation source and a filter was used to select only the emission of chlorophyll a, in the region of 680 nm; the measurements were performed on one side of the seed. The parameters observed in the analysis of chlorophyll fluorescence were F_m' (maximum fluorescence of dark-adapted measurement) and NPQ' (non-photochemical quenching).

Stationary fluorescence

Fluorescent analyses of *in vivo* seeds were performed using a portable spectrophotometer consisting of two lasers, operating at 405 and 532 nm, a monochromator SB 2000 (FL-OceanOptics), a Y-type optical fibre and a laptop, to obtain the spectra. The samples were excited at 405 nm and the spectra were obtained from 450 nm to 800 nm. The analyses were carried out directly on the top of each seed and were performed on all days of the germination process (five days).

Root size

After 5 days of germination, the root length was determined with the aid of a calliper (Digimess®), to an accuracy of 0.05 mm.

RESULTS AND DISCUSSION

CuO NPs Characterization

The EDS results show the characteristic copper peaks of greater relative intensity: at 0.929 keV, referring to the $L\alpha_{1.2}$ transition; 0.949 keV for the $L\beta_1$ transition; 8.047 keV referring to the $K\alpha_1$ transition and 8.905 keV referring to the $K\beta_{1.3}$ transition. From the data it is also possible to verify the existence of a characteristic oxygen peak at 0.525 keV of the $K\alpha_{1.2}$ transitions, confirming that the samples are composed of copper (II) oxide (CuO).

Although the manufacturer reported that the CuO NPs (powder) were composed of particles with a diameter smaller than 50 nm, the results revealed that the CuO NPs had a large diameter size with different populations (in the range of 28-70 nm) with an average diameter of 48.26 ± 8.0 nm. In addition, the TEM results also demonstrated that CuO NPs had predominantly regular spherical shapes (see Figure 1).

The DLS results revealed that CuO NPs were highly polydispersed, with average hydrodynamic diameter, PDI and ZP of 410.9 ± 147.4 nm, 0.7 ± 0.1 and -14.1 ± 2.7 mV, respectively. These results demonstrate that a higher hydrodynamic diameter ($D_{\text{hidrodinamica}}$; 410.9 ± 147.4 nm) was obtained when compared to the diameter determined by TEM, an expected result because the DLS measures the total diameter of the NPs together with molecules and ions (layers) adsorbed on the nanoparticles of surface when they are placed in a solution (Kass et al. 2017). The data also show that CuO NPs are not monodispersed, as the obtained PDI was 0.7

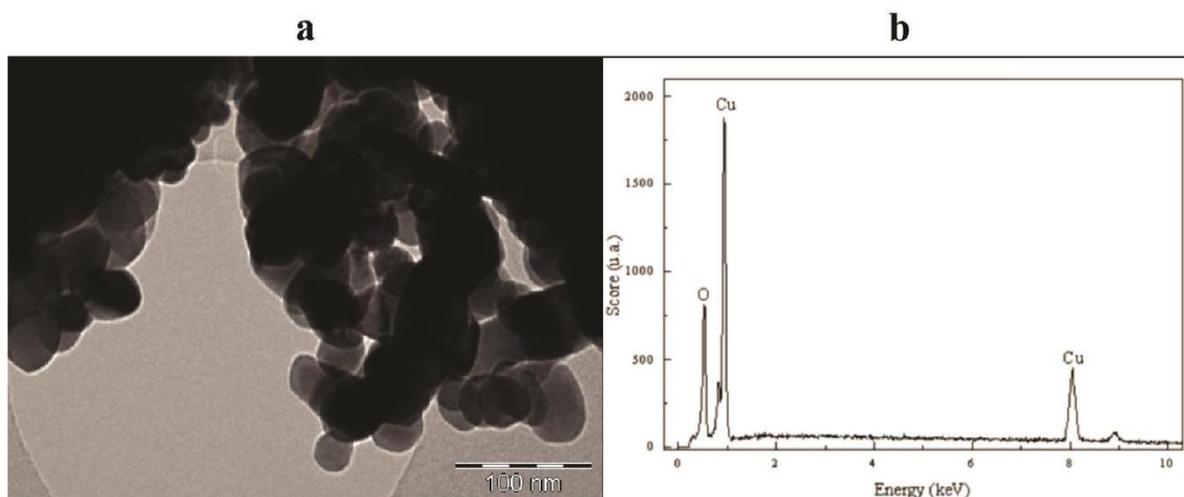


Figure 1. (a) Transmission electron microscopy micrography and (b) EDS spectrum of CuO NPs.

± 0.1 , being classified as highly polydispersed. A sample is defined as highly monodispersed when $PDI \leq 0.1$, almost monodispersed for values between 0.1 and 0.7, and highly polydispersed for values > 0.7 (Stetefeld et al. 2016). In addition, the results demonstrate that CuO NPs have a ZP value of -14.1 ± 25 mV, indicating that CuO NPs dispersed in aqueous solution are relatively stable. Guidelines classifying NP dispersions with ZP values of $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV and $> \pm 30$ mV as highly unstable, relatively stable, moderately stable and highly stable, respectively. (Bhattacharjee 2016)

CuO NPs Effects on *Sesbania virgata* Seeds

Infrared thermography

The thermal image analyses performed showed a significant increase in temperature, especially in seeds subjected to CuO NPs in the first days of germination, but the seeds recovered, as is common in living organisms, possibly due to homeostasis, when compared with the control (0 mgL^{-1}). The average temperature of twelve points for each seed and the average of the 12 seeds was analysed for each concentration.

Figure 2 shows that the temperature of the seeds was significantly changed after subjected to the CuO NPs (t-test, $p < 0.05$; 95% degree of confidence). However, due to the temperature behaviour of the germination and hydrolysis processes, there was a slight difference in temperature as a function of time, and this was clearly not linear, presenting oscillatory behaviour between 72 and 96 h. This may be because the germination process can be affected by several internal and external (environmental) factors at the same time, which act alone or jointly, which when act as trigger internal signals at the molecular level, which can induce the activation or inactivation of various compounds and metabolic reactions (Kerbaui 2008, SEO et al. 2009). More studies on the temperature of seeds during germination are needed, because this is still lacking bibliographic references.

Fluorescence kinetics of chlorophyll a

A kinetic fluorescence image analysis of the top seeds of *S. virgata* was performed after 120 h of soaking, at concentrations of 0, 100, 200, 300 and 400 mgL^{-1} . The parameters presented are F_m' and

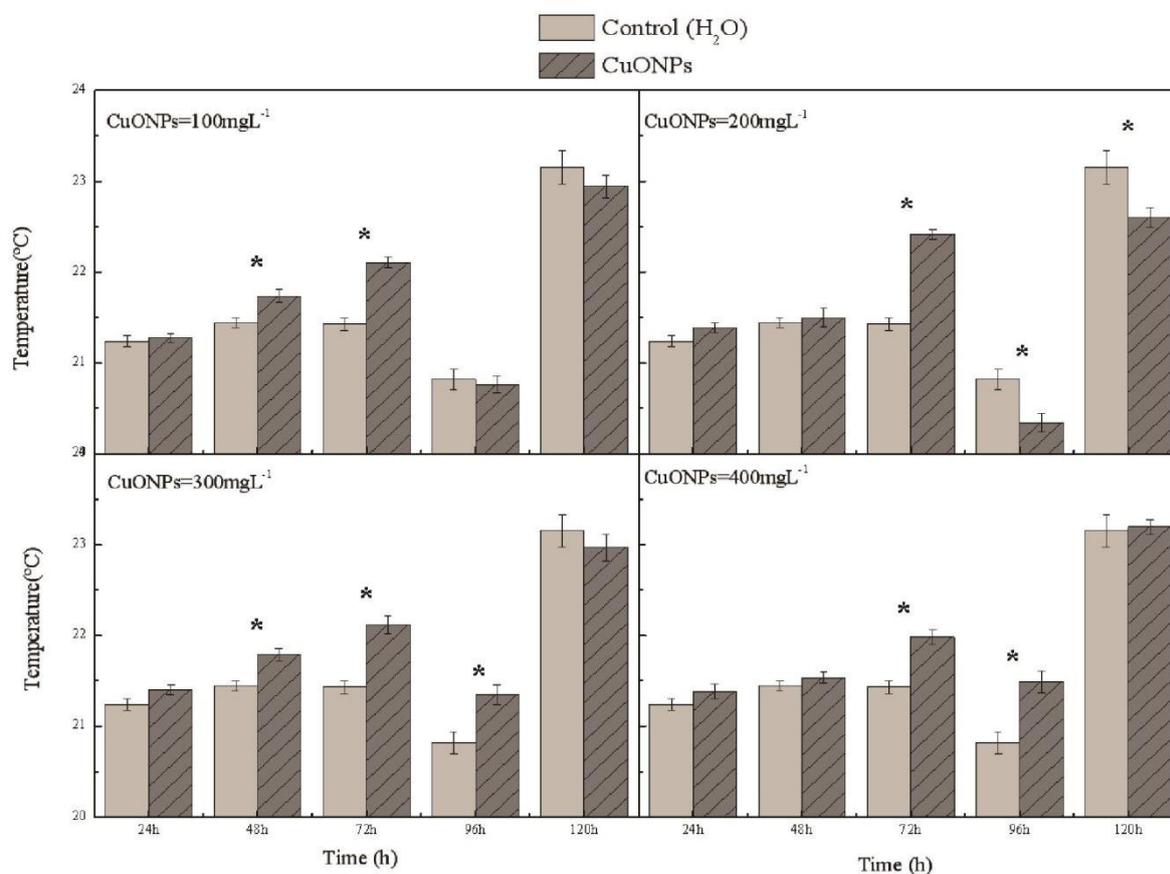


Figure 2. Mean temperature of 12 seeds of *Sesbania virgata*, as a function of time at all concentrations of CuO NPs (< 50 nm) compared with the control (0 mgL⁻¹). * Significant difference (t-test, $p < 0.05$, $n = 12$).

NPQ', measures obtained in the saturating pulse, when the seeds were already adapted (Figure 3).

Figures 4a and 4b illustrate a comparison, in relation to time, of seeds subjected to the presence of CuO NPs and control seeds, as F_m' (maximum fluorescence in the light-adapted state) and NPQ' (indicative of excess radiant energy dissipation in the form of heat in PSII). The analysis of NPQ' i.e the last saturated light pulse, when the seeds were already adapted to darkness, shows that CuO NPs induced changes in this parameter at all concentrations, evaluated relative to the control, causing a significant increase at 48 and 72 h when cotyledons are being formed. In a study carried out with *Vicia faba*, it was showed that the NPQ'

values increased in the leaves containing the Ag NPs, which demonstrates that NPs may cause an increase in the dissipation of light energy by non-photochemical forms, instead of photochemical processes (Falco et al. 2020). However, after 72 h, a reversal in the behaviour of the NPQ occurred, where a significant decrease after 120 h was observed; this may be due to the formation of the first leaves and the transformation of the seed into seedling, being the plant able to performing self-adjustment. Morphological or physiological adjustments, presented by plants under stress, allow them to maintain their metabolism and promote the conditions that enable growth even under continued stress (Bohnert et al. 1995).

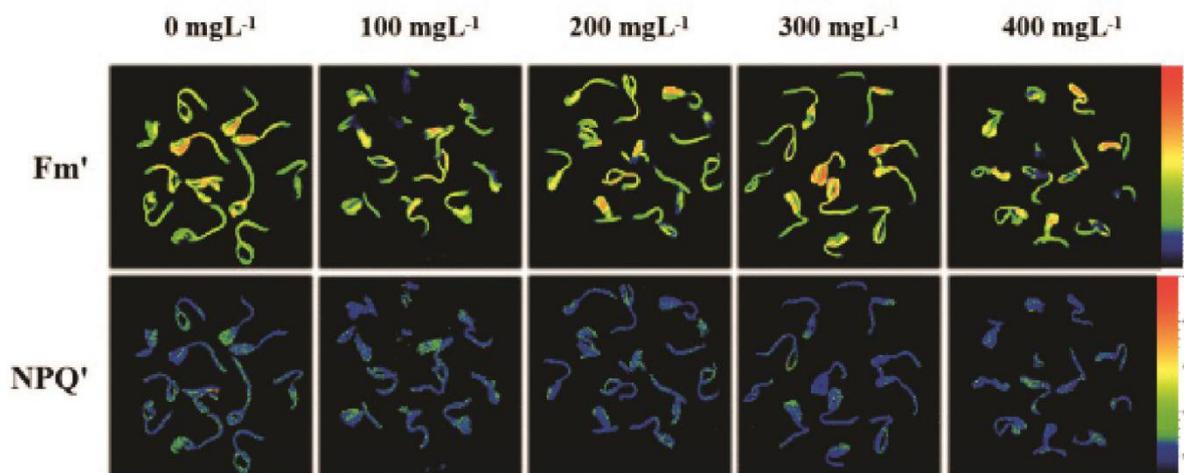


Figure 3. Fm' and NPQ' images, 120 h after soaking in 0, 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹ of CuONPs, obtained by means of chlorophyll a fluorescence imaging.

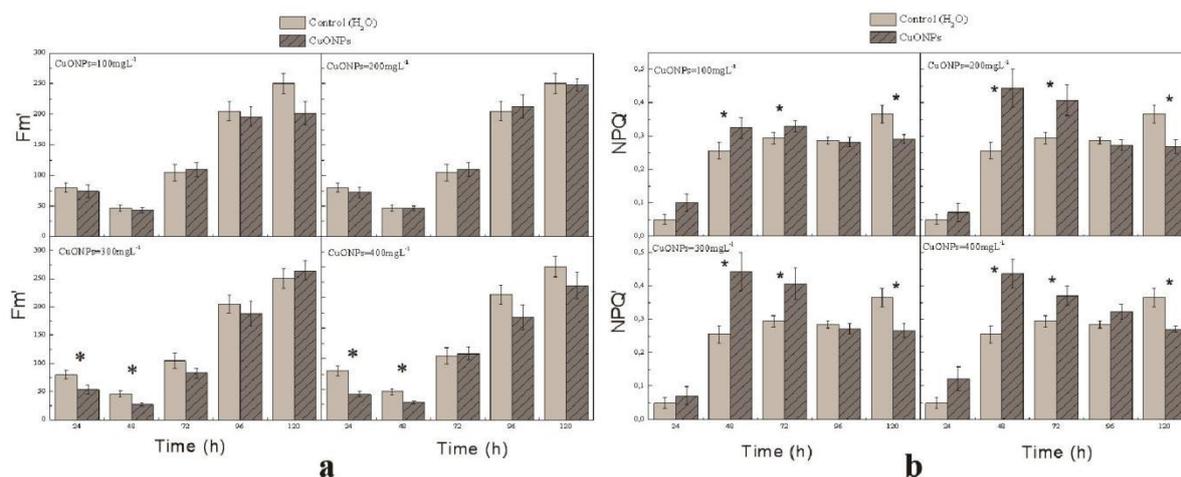


Figure 4. (a): Means of Fm' of 12 seeds of *Sesbania virgata*, as a function of time, after soaking for 12 h in an aqueous solution of 0, 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹ CuO NPs (< 50 nm). * Significant difference (t-test, p < 0.05, n = 12). **(b):** NPQ' means of 12 seeds of *Sesbania virgata* as a function of time after being exposed to 0, 100, 200, 300 and 400 mgL⁻¹ CuO NPs (< 50 nm). * Significant difference (t-test, p < 0.05, n = 12).

Stationary fluorescence

The stationary fluorescence measurements were performed on cotyledons, the first leaves that emerge from the embryo. The samples presented two emission bands in the red and far-red range, when excited at 405 nm, with peaks at 685 and 735 nm, respectively. These fluorescence bands are due to the Chl molecules present in the photosystem II and photosystem I, located in the

thylakoid membranes of chloroplasts (Mishra & Gopal 2010). Based on the spectrum, an increase in fluorescence intensity of Chl was observed with treatment at 100 and 200 mgL⁻¹ CuO NPs and a suppression at the concentrations of 300 and 400 mgL⁻¹, when compared with the control (H₂O Milli-Q). These results are presented in Figure 5. These results may be attributed to the consumption of chlorophyll molecules as

reserves, because as this ratio increases, the concentration of chlorophyll is lower, owing to the selective re-absorption of red relative to far-red fluorescence by chlorophyll molecules (Cerovic et al. 1999, Caires et al. 2010). In a study with rice (*Oryza sativa* L.) exposed to CuO NPs under hydroponic condition, it was showed a reduction of the pigment content in the leaves, including chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids. According to the authors, CuO NPs, especially at a concentration of 250 mgL⁻¹, affected the growth and development of rice seedlings, probably due to oxidative damage and disturbance of chlorophyll and carotenoid synthesis (Yang et al. 2020).

The fluorescence ratio F685/F735 provides information about the physiological state and the chlorophyll content of plants (Buschmann 2007). This relationship is used to quantify the maximum efficiency of PS II. In the analysis of the chlorophyll content, the fluorescence ratio is an indicator of oxidative stress (Lu et al. 2000). The analysis of F685/F735, i.e. the fluorescence intensity of the characteristic peaks of chlorophyll *a* (in Figure 5a and 5b), shows that there were changes in the chlorophyll content

of seeds treated with CuO NPs, differences were not significant.

Root size

The analysis of the average root length of 12 seeds of *S. virgata* germinated with CuO NPs demonstrated that there was a root length inhibition. An average length of 18.6 and 18.9 mm was determined to the roots subjected to the CuO NPs at 100 and 200 mgL⁻¹, respectively. These results show a significant reduction of the root length (t-test, $p < 0.05$, $n = 12$) when compared to the control group (H₂O), which presented an average length of 23.4 mm. At the higher concentrations of 300 and 400 mgL⁻¹, roots had an average length of 21.2 mm and 19.9 mm, respectively, which showed a reduction in the length of the roots, but there was no significant difference (t-test, $p < 0.05$, $n = 12$) when compared to the average of the root of the control group (H₂O). A representative image showing the root length inhibition is shown in Figure 6. The present findings corroborate previous studies showing that, when subjected to stress induced by nanoparticles, plants tend

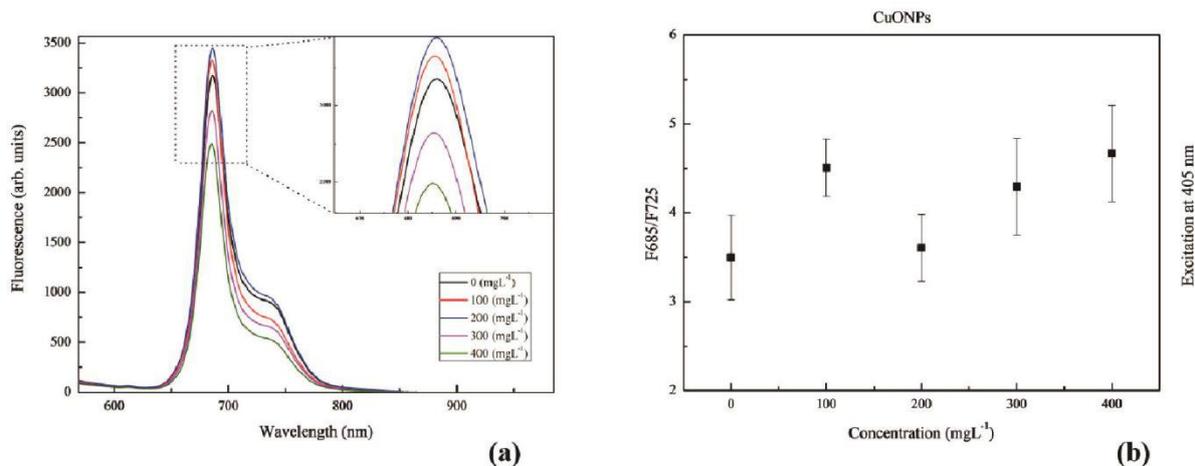


Figure 5. (a) Fluorescence intensity of seeds of *Sesbania virgata* treated with different concentrations of CuONPs, with 405 nm excitation, at 120 h of germination; **(b)** F685/F725 ratio according to the CuO NP concentration, with excitation at 405 nm and 120 h of germination.

to decrease the size of the shoot or the root (Rousseau et al. 2013). Other authors corroborate to the present phytotoxicity observation. For instance, Pelegrino et al. (2020) described the effects of the CuO NPs on *Lactuca sativa* L. They observed that CuO NPs over 40 mg^{-1} inhibited the seed germination and root growth. Yang, et al. (2020) evaluated the phytotoxicity of CuO NPs (sized $<50 \text{ nm}$) in rice (*Oryza sativa* L.), under hydroponic condition. They showed seven days of exposure to 62.5 , 125 and 250 mgL^{-1} of CuO NPs significantly suppressed the growth rate of rice seedlings compared to the control. In addition, physiological indexes associated with antioxidants, including membrane damage and antioxidant enzyme activity, were also detected.

The results obtained in experiments with CuO NPs on seeds of *S. virgata* showed that the values of F_m' and NPQ' increased during germination, as expected, as the photosynthetic apparatus is still developing; however, when evaluating and comparing with control seeds, only NPQ' increased. The fact that non-photochemical quenching does not increase dissipation was evident when we analysed the temperature plot as a function of time, since there was an increase in the temperature of the seeds with CuO NPs, especially in the period of 72 h, as shown in Figure 2 and Figure 4. This fact may indicate that seeds are dissipating energy in the form of heat, mainly due to

the process of oxidative stress that produces free radicals, which are oxidant species that induce oxidative reactions and heat dissipation (Junfei et al. 2017, Müller et al. 2001). As for the chlorophyll content of the cotyledon leaves of *S. virgata*, after 120 h of germination, there was an increase in chlorophyll fluorescence intensity in photosystem II at lower concentrations of nanoparticles and a suppression of chlorophyll activity at higher concentrations of nanoparticles, which suggests that CuO NPs were able to penetrate the seeds. In a study on pumpkin plants (*Cucurbita maxima*) grown in an aqueous medium containing iron oxide nanoparticle, the plants were able to absorb, translocate and accumulate nanoparticles in plant tissues (Zhu et al. 2008). When analysing the $F685/F735$ ratio (Figure 4b) although this value was higher for the seeds treated with CuO NPs, there was no significant difference in relation to the other treatments.

This more intense activity may possibly relate to a lower concentration of nanoparticles in solution with less surface activity of the nanoparticles available for induction of oxidative stress *in situ*. As the concentration of nanoparticles increases, there is a tendency for agglomeration to occur, with a loss of surface area and reduction in the reactivity of metallic nanoparticles due to the decrease in surface area and reactivity; furthermore, agglomeration



Figure 6. Size of root at *Sesbania virgata*, with different concentrations of CuO NPs. Photo: Eliene Santos.

inhibits permeation in the body. Plants block the channels and/or reduce the intensity of oxidative stress reactions with a consequent reduction in the production of radical species, which are strong oxidants. In view of the foregoing, the suppression of chlorophyll in plants of *S. virgata* may be related to the NP-induced inhibition of biochemical processes of plants, causing changes in their photosynthetic activities and, for this reason, decreased fluorescence yield of dissipated chlorophyll. With regard to root development, we observed a decrease in length at all concentrations of NPs when compared to the control, with significant differences in the treatments at 100 and 200 mgL⁻¹.

CONCLUSION

The present investigation showed that CuO NPs caused a significant alteration in the temperature of the seeds and a reduction in the root length of the seedlings, indicating metabolic damage and changes in energy dissipation and plant growth. The data demonstrated that all observed changes promoted by NPs were concentration-dependent. Nevertheless, it is important to stress that, for all tested concentrations of NPs, our results also revealed a trend of plant recovery after 72 h of NPs exposition. Based in these findings, we can conclude that the formation and operation of the photosynthetic apparatus of the seedlings were impacted when submitted to CuO NPs, which affects the development and growth of the plants, especially the root development. In summary, the present study demonstrates that NPs affect the photosynthetic performance of the *S. virgata* seedlings, which indicates that CuO NPs may present a potential risk to plant organisms. Finally, our results also suggest that the non-invasive optical techniques have great potential to be applied as analytical tools for

detecting physiological impact of NPs on plants during their early stage of development.

REFERENCES

- ANDRADE HP. 2010. Cienciométrica global analysis in bioindicators: an overview of the trends in the years 1998 to 2007. Dissertation (Master's thesis), Catholic University of Goiás (UFG), Department of Biological Sciences, Goiás.
- ANDRADE J, TAVARES S & MALHER C. 2007. Phytoremediation: the use in improving environmental quality. São Paulo: Office of Texts, p. 176.
- ARAUJO EC, MENDONÇA AV, BARROSO DG, LAMÔNICA KR & SILVA RF. 2004. Morphological characterization of fruits, seeds and seedlings of *Sesbania virgata* pers. Brazilian Seed Journal 26(1): 105-110.
- BETTINELLI M, BEONE GM, SPEZIAS S & BAFFI C. 2000. Determination of heavy metals in soil and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. Anal Chim Acta 424: 289-296.
- BHATTACHARJEE S. 2016. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? J Control Release 235: 337-351.
- BOHNERT HJ, NELSON DE & JENSEN RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7: 1099-1111.
- BRAYNER R, FIÉVET F & CORADIN T. 2013. Nanomaterials: a danger or a promise? A chemical and biological perspective. Springer, London. doi: 10.1007/978-1-4471-4213-3.
- BUCKERIDGE MS & DIETRICH SMC. 1996. Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae - Faboideae). Plant Sci 117: 33-43.
- BUSCHMANN C. 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. Photosynth Res 92: 261-271.
- CAIRES ARL, SCHERER MD, SANTOS TSB, PONTIM BCA, GAVASSONI WL & OLIVEIRA SL. 2010. Water stress response of conventional and transgenic soybean plants monitored by chlorophyll a fluorescence. J Fluorescence 20: 645-649.
- CAMARGOS VN, CARVALHO ML, ARAUJO M, MAGALHAES DV & LINHARES FH. 2008. Overcoming dormancy and seed physiological quality assessment of *Sesbania virgata*. Ciênc Agrotec 32(6): 1858-1865.
- CARNIEL BF. 2013. Evaluation of environmental and social impacts of the use of nanotechnologies in agriculture:

- a methodological proposal. 2013.189 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) Federal University of São Carlos (UFSCar). São Carlos, São Paulo.
- CEROVIC ZG, SAMSON G, MORALES F, TREMBLAY N & MOYA I. 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19: 543-578.
- DELARMELENA WM ET AL. 2014. Different substrates for seedling production of *Sesbania virgata*. *Forest and Environment* 21(2): 224-233.
- FALCO WF, BOTERO ER, FALCÃO EA, SANTIAGO EF, BAGNATO VS & CAIRES ARL. 2011. *In vivo* observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. *J Photochem Photobiol A Chem* 225: 65-71.
- FALCO WF, SCHERER MD, OLIVEIRA SL, WENDER H, COLBECK I, LAWSON T & CAIRES ARL. 2020. Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: evaluation of particle size effects on photosynthetic performance and leaf gas exchange. *Sci Total Environ* 701: 134816.
- JUNFEI G, ZHENXIANG Z, ZHIKANG L, YING C, ZHIQIN W, HAO Z & JIANCHANG Y. 2017. Photosynthetic properties and potentials for improvement of photosynthesis in pale green leaf rice under high light conditions. *Front Plant Sci* 8: 1082-1096.
- KASS MEI, BROHAN L, GAUTIER NØB, BÉCHU S, DAVID CØ, LEMAITRE N & RICHARD-PLOUET M. 2017. TiO₂ anatase solutions for electron transporting layers in organic photovoltaic cells. *Chemphyschem* 18(17): 2390-2396
- KERBAUY GB. 2008. *Plant Physiology*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan SA, 431 p.
- KLAINE SJ, ALVAREZ PJJ, BATLEY GE, FERNANDES TF, HANDY RD, LYON DY, MAHENDRA S, MCLAUGHLIN MJ & LEAD JR. 2008. Nanomaterials in the environment: behaviour, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27: 1825-1851.
- LU CM, CHAU CW & ZHANG JH. 2000. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis* - assessment by chlorophyll fluorescence analysis. *Chemosphere* 41: 191-196.
- MISHRA KB & GOPAL R. 2010. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. *Int J Remote Sens* 29(1): 157-173.
- MOSA KA, EL-NAGGAR M, RAMAMOORTHY K, ALAWADHI H, ELNAGGAR A, WARTANIAN S, IBRAHIM E & HANI H. 2018. Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in Cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Front Plant Sci* 9: 872. doi: 10.3389/fpls.2018.00872.
- MÜLLER P, LI XP & NIYOGI KK. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125(4): 1558-1566.
- NAIR PMG & CHUNG IM. 2015a. The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles. *Biology Plantarum* 59: 591-595.
- NAIR PMG & CHUNG IM. 2015b. Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *J Plant Growth Regul* 34(2): 350-361.
- NAIR PMG & CHUNG IM. 2017. Evaluation of stress effects of copper oxide nanoparticles in *Brassica napus* L. seedlings. *Biotech* 7(5): 293-301.
- PELEGRINO MT, KOHATSU MY, SEABRA AB, MONTEIRO LR, GOMES DG, OLIVEIRA HC, ROLIM WR, JESUS TA, BATISTA BL & LANGE CN. 2020. Effects of copper oxide nanoparticles on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings and possible implications of nitric oxide in their antioxidative defense. *Environ Monit Assess* 192(4): 232.
- POMPÊO MLM. 2008. Monitoring and management of aquatic macrophytes. *Ecology Brasiliensis* 12(3): 406-424.
- POTT A & POTT VJ. 1994. *Pantanal Plants*. EMPRAPA/CPAP/SPI, Corumbá, 320 p.
- QUEIROZ AM, MEZACASA AV, GRACIANO DE, FALCO WF, M'PEKO JC, GUIMARÃES JFC, LAWSON T, COLBECK I, OLIVEIRA SL & CAIRES ARL. 2016. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 168: 73-77.
- ROUSSEAU C, BELIN E, BOVE E, ROUSSEAU D, FABRE F, BERRUYER R, GUILLAUMÈS J, MANCEAU C, JACQUES MA & BOUREAU T. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9: 17.
- SEO M, NAMBARA E, CHOI G & YAMAGUCHI S. 2009. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Molecular Biology Plant*, Dordrecht 69(4): 463-472.
- SHAW AK & HOSSAIN Z. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 93(6): 906-915.
- SHUGUANG J, WEIJUN S & YANG Z. 2009. Enhanced adaptability of *Sesbania rostrata* to Pb/Zn tailing via stem nodulation. *J Environ Sci* 21: 1135-1141.
- SIMONIN M, CANTAREL AAM, CROUZET A, GERVAIX J, MARTINS JMF & RICHAUME A. 2018. Negative effects of copper oxide nanoparticles on carbon and nitrogen cycle microbial

activities in contrasting agricultural soils and in presence of plants. *Front Microbiol* 9: 3102.

STETEFELD J, MCKENNA SA & PATEL TR. 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8: 409-427.

TONINI PP, LISBOA CGS, SILVA CO, MAZZONI-VIVEIROS SC & BUCKERIDGE MS. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees* 21: 13-21.

VAN NL, MA C, SHANG J, RUI Y, LIU S & XING B. 2016. Effects of CuO nanoparticles on insecticidal activity and phytotoxicity in conventional and transgenic cotton. *Chemosphere* 144: 661-670.

YANG B ET AL. 2003. Growth and metal accumulation in vetiver and two *Sesbania* species on lead/zinc mine tailings. *Chemosphere* 52(15): 93-106.

YANG Z, XIAO Y, JIAO T, ZHANG Y, CHEN J & GAO Y. 2020. Effects of Copper oxide nanoparticles on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings and the relevant physiological responses. *Int J Environ Res Public Health* 17(4): 1260.

ZANANDREA I ET AL. 2009. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Aust J Bot* 57: 661-669.

ZHU H, HAN J, XIAO JQ & JIN Y. 2008. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J Environ Monitor* 10(6): 713-717.

How to cite

SANTOS ES, GRACIANO DE, FALCO WF, LIMA CAIRES AR & DE ARRUDA EJ. 2021. Effects of copper oxide nanoparticles on germination of *Sesbania virgata* (FABACEAE) plants. *An Acad Bras Cienc* 93: e20190739. DOI 10.1590/0001-376520210190739.

Manuscript received on June 26, 2019;
accepted for publication on June 30, 2020

ELIENE S. DOS SANTOS¹

<https://orcid.org/0000-0002-0136-3183>

DANIELA E. GRACIANO¹

<https://orcid.org/0000-0001-5559-6129>

WILLIAM F. FALCO¹

<https://orcid.org/0000-0003-2744-8668>

ANDERSON R. LIMA CAIRES²

<https://orcid.org/0000-0002-2602-9480>

EDUARDO J. DE ARRUDA¹

<https://orcid.org/0000-0002-9835-467X>

¹Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Rodovia Dourados/Ithaim, Unidade Km 12-2, Caixa Postal 364, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

²Grupo de Óptica e Fotônica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Física, Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil

Correspondence to: **Eduardo José de Arruda**

E-mail: ejarruda@gmail.com

Author contributions

ELIENE SILVA DOS SANTOS: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - review & editing. DANIELA ESPANGUER GRACIANO: Investigation, Methodology, Writing - review & editing. WILLIAM FERREIRA FALCO: Formal analysis. ANDERSON RODRIGUES LIMA CAIRES: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing - review. EDUARDO JOSÉ DE ARRUDA: Formal analysis, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

