

FERNANDO ANTÔNIO GOMES BRITO

**IMPACTOS DAS NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL EM *Pistia stratiotes*:
ABSORÇÃO, TOXICIDADE E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

Coorientadoras: Cristiane Jovelina da Silva
Renata Pereira Lopes Moreira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B862i Brito, Fernando Antônio Gomes, 1993-
2022 Impactos das nanopartículas de níquel em *Pistia stratiotes*:
absorção, toxicidade e mecanismos de tolerância / Fernando
Antônio Gomes Brito. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.
Referências bibliográficas: f. 41-48.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.173>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas aquáticas - Efeito dos metais pesados. 2. Plantas
aquáticas - Efeito do stress. 3. Plantas aquáticas - Toxicologia.
I. Oliveira, Juraci Alves de, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 581.76

FERNANDO ANTÔNIO GOMES BRITO

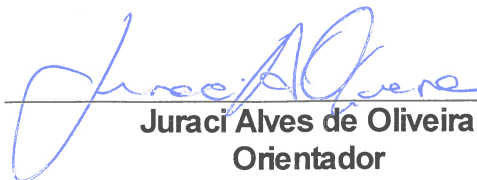
**IMPACTOS DAS NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL EM *Pistia stratiotes*:
ABSORÇÃO, TOXICIDADE E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de março de 2022.

Assentimento:


FERNANDO ANTÔNIO GOMES BRITO
Autor


JURACI ALVES DE OLIVEIRA
Orientador

*A João de Deus Brito (in memoriam) e Maria Aparecida
Gomes Brito, pelo amor e apoio incondicional e por sempre
terem me incentivado a estudar, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por toda saúde, anos de vida e oportunidades colocadas em meu caminho.

Agradeço à minha mãe pelo apoio incondicional por todos esses anos, e ao meu pai (in memoriam) por sempre ter me incentivado a estudar. Aos meus irmãos e toda minha família que sempre me apoiaram nessa caminhada.

À minha parceira de vida, Thalita, que me acompanhou por boa parte dessa trajetória sempre me dando todo apoio moral e emocional.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica Ambiental (Ana, Aristides, Daniel, Darlielva, Pedro e Vinícius) e do Laboratório de Nanomateriais e Química Ambiental (Gustavo) por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus professores do Departamento de Fisiologia Vegetal que sempre buscaram transmitir informações com melhor qualidade possível, para que eu possa me tornar um ótimo profissional.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, que sempre procurou me incentivar a dar o meu melhor e me orientar neste trabalho.

À minhas coorientadoras, Cristiane Jovelina da Silva e Renata Pereira Lopes Moreira por toda orientação, ajuda e conselhos.

À Universidade Federal de Viçosa, por uma das melhores estruturas do país e por oferecer professores qualificados e disciplinas de qualidade.

Às repúblicas Complexo Fumiguero e Piôka, onde fiz irmãos para a vida toda, onde aprendi muito e pude crescer como pessoa.

Aos amigos que fiz nessa cidade, que contribuíram para dias melhores durante todo esse tempo de graduação.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

BRITO, Fernando Antônio Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2022. **Impactos das nanopartículas de níquel em *Pistia stratiotes*: absorção, toxicidade e mecanismos de tolerância.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientadoras: Cristiane Jovelina da Silva e Renata Pereira Lopes Moreira.

Devido à falta de legislação e investimento para o descarte correto de resíduos gerados nos processos produtivos da indústria, agricultura e mineração, a deposição irregular de metais pesados como o níquel (Ni) tem causado a degradação e contaminação de áreas e águas subterrâneas, além de representar riscos à saúde pública. Apesar dos estudos avançados que investigam os efeitos dos metais pesados às respostas fisiológicas e os mecanismos de tolerância, existe ainda uma falta de conhecimento sobre as respostas das plantas desencadeadas pelas nanopartículas de níquel. Portanto, objetiva-se neste projeto utilizar plantas de *Pistia stratiotes* para elucidar a dinâmica fisiológica celular em resposta ao estresse por Ni na forma de nanopartículas. Para melhor compreender este fenômeno, plantas de *P. stratiotes*, foram aclimatadas por 3 dias em solução nutritiva de Clark ½ força iônica, pH 6,5, em salas de crescimento com temperatura e intensidade luminosa controlados, antes de serem submetidas aos tratamentos com nanopartículas de níquel (NiNP) e sulfato de níquel (NiSO₄) separadamente em concentrações de 0,3, 1,5 e 7,5 mg L⁻¹ cada. Foram analisados a absorção do metal pela planta, taxa de crescimento, pigmentos, fluorescência da clorofila, parâmetros fotossintéticos, metabolismo antioxidante enzimático, integridade de membrana, concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (MDA). As plantas expostas ao NiSO₄ tiveram menores taxas de crescimento, maiores concentrações de H₂O₂ e MDA, enquanto as plantas expostas às NiNPs tiveram maior acúmulo de níquel nas folhas, as trocas gasosas foliares mais afetadas e maior fluorescência da clorofila a. Conclui-se que a *P. stratiotes* é capaz de absorver e remover NiNP do meio, e que mesmo em maiores concentrações nos tecidos da planta, as nanopartículas apresentaram efeitos diferentes do sal do mesmo elemento sobre o seu metabolismo, sendo ambas prejudiciais à planta.

Palavras-chave: Metal pesado. Antioxidante. Estresse abiótico. Planta aquática.

ABSTRACT

BRITO, Fernando Antônio Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2022. **Impacts of nickel nanoparticles on *Pistia stratiotes*: uptake, toxicity and tolerance mechanisms.** Advisor: Juraci Alves de Oliveira. Co-Supervisors: Cristiane Jovelina da Silva e Renata Pereira Lopes Moreira.

Due to the lack of legislation and investment for the correct disposal of waste generated in the productive processes of industry, agriculture and mining, the irregular disposal of heavy metals such as nickel (Ni) has caused the degradation and contamination of areas and groundwater, besides posing risks to public health. Despite advanced studies investigating the effects of heavy metals on physiological responses and tolerance mechanisms, there is still a lack of knowledge about plant responses triggered by nickel nanoparticles. Therefore, it is aimed in this project to use *Pistia stratiotes* plants to elucidate the cellular physiological dynamics in response to Ni stress in the form of nanoparticles. To better understand this phenomenon, plants of *P. stratiotes* were acclimated for 3 days in Clark's nutrient solution $\frac{1}{2}$ ionic strength, pH 6.5, in growth rooms with controlled temperature and light intensity, before being subjected to treatments with nickel nanoparticles (NiNP) and nickel sulfate (NiSO_4) separately at concentrations of 0.3, 1.5 and 7.5 mg L⁻¹ each. Plant metal uptake, growth rate, pigments, chlorophyll fluorescence, photosynthetic parameters, enzymatic antioxidant metabolism, membrane integrity, hydrogen peroxide (H_2O_2) and lipid peroxidation (MDA) concentrations were analyzed. Plants exposed to NiSO_4 showed lower growth rates, higher H_2O_2 and MDA concentrations, while plants exposed to NiNPs had higher nickel accumulation in leaves, the most affected leaf gas exchanges, and higher chlorophyll a fluorescence. It is concluded that *P. stratiotes* is able to absorb and remove NiNP from the medium, and that even at higher concentrations in plant tissues, nanoparticles showed different effects than salt of the same element on its metabolism, both being harmful to the plant.

Keywords: Heavy metal. Antioxidant. Abiotic stress. Aquatic plant.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1. Obtenção do material vegetal	11
2.2. Aplicação dos tratamentos	11
2.3. Preparação das nanopartículas de Nil	11
2.4. Determinação de Ni absorvido	13
2.5. Taxa de crescimento relativo	14
2.6. Pigmentos Fotossintéticos	14
2.7. Parâmetros fotossintéticos	15
2.8. Quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica	15
2.9. Extravasamento de eletrólitos	16
2.10. Metabolismo antioxidante enzimático	16
2.11. Desenho experimental e estatística	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	19
3.2. Difratometria de Raios-X (DRX)	20
3.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR)	20
3.4. Concentração de Ni absorvido	21
3.5. Taxa de crescimento relativo	22
3.6. Pigmentos fotossintéticos.....	23
3.7. Parâmetros fotossintéticos	25
3.8. Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica	27
3.9. Extravasamento de eletrólitos	29
3.10. Metabolismo antioxidante enzimático	30
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente urbanização e industrialização no mundo, a poluição por metais pesados já corresponde a mais de 50% das áreas contaminadas, os quais são provenientes de diversas fontes, como materiais residuais industriais, esgoto, resíduos da agricultura e mineração. Em parte, isso se dá pela falta de legislação e investimento para o descarte correto, mesmo sendo a maioria destas áreas situadas em países desenvolvidos (Khalid et al., 2017). Um dos metais pesados contaminantes é o níquel (Ni), bastante utilizado na indústria de manufatura de diferentes equipamentos e utensílios, como ligas metálicas resistentes à corrosão e aço inoxidável (Cempel e Nikel, 2006), baterias, acessórios metálicos em geral, cabos, dispositivos de ignição, talheres e têxteis (Kumar et al., 2021). O aumento da concentração de Ni no meio ambiente, também se dá, de forma natural, por meio da erosão, intemperismo de rochas e erupção vulcânica (Khan et al. 2019).

O Ni é um micronutriente essencial para as plantas e atua no funcionamento de enzimas como a urease formando um sítio ativo com a lisina carbamilada e é auxiliado pelas proteínas acessórias UreD, UreE, UreF and UreG (Nim e Wong, 2019), atua também como cofatora da superóxido dismutase (SOD), tendo papel importante na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), regeneração da glutathione e defesa celular (Vaculík et al., 2021). Para a detoxificação das ROS, as plantas desenvolveram eficiente sistema de defesa antioxidante a fim de proteger moléculas, membranas, organelas e consequentemente processos metabólicos essenciais para o crescimento vegetal. Existem os mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui, dentro outras, a enzima SOD, que é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, transformando $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 . Esse último produto, é tóxico em altas concentrações e, assim sendo, as enzimas CAT e POX o utilizam como substrato e promovem a detoxificação (Gupta et al., 2018).

Por ser requerido em concentrações muito baixas ($0,05\text{--}10\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca), alguns sintomas de toxidez podem ser facilmente observados quando as plantas absorvem concentrações mais elevadas deste elemento (Chen, et al., 2009). O excesso de Ni causa inibição da germinação de sementes, diminuição no crescimento de plântulas (Aqeel et al., 2021), inibição da divisão celular (Banerjee e Roychoudhury, 2020), clorose, necrose e redução do crescimento radicular, implicando em menor

desenvolvimento da planta (Merlot, 2020). Em nível molecular, a toxicidade por Ni causa perturbação nos fotossistemas e no ciclo de Calvin-Benson, inibindo a cadeia de transporte de elétrons e, em consequência, o acúmulo de ATP e NADPH pela ineficácia das reações bioquímicas da fotossíntese (Prado, 2021).

Este metal pode, também, ser encontrado na forma de nanopartículas, isto é, materiais que possuem, em pelo menos uma de suas dimensões, tamanho entre 1 a 100 nm, com grande superfície de contato, conferindo propriedades biológicas, químicas e físicas diferentes do mesmo material na forma salina, atômica ou molecular (Albrecht et al., 2006). Esse material, em tamanho nanométrico, possui importância devido às propriedades que possibilitam seu uso na mecânica, ótica, eletrônica, biotecnologia, microbiologia, remediação ambiental, medicina e agricultura (Imran e Rani, 2016; Gebre e Sendeku, 2019).

No campo da biologia vegetal, nanopartículas metálicas têm apresentado efeitos benéficos em plantas, com a ativação dos mecanismos de defesa e de absorção de micronutrientes (Cartwright et al., 2020). Na agricultura, nanopartículas de níquel (NiNP) foram usadas com sucesso como bactericida contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos e, também, contra doenças fúngicas que causam grandes prejuízos econômicos, como *Colletotricum* e *Fusarium* em culturas de pimenta, alface e tomate (Fatima et al., 2021). Shah et al. (2021) mostraram que a aplicação de pequenas doses (5 mg kg^{-1} solo) de NiNP aumenta a absorção de nitrogênio e micronutrientes, porém, com doses maiores (50 e 100 mg kg^{-1} solo) há uma menor disponibilidade de nitrogênio e massa microbiana no solo, além de diminuir a absorção de nutrientes. Atividades antioxidantes e produtos de metabolismo secundário diminuíram em plantas de *Nigella arvenses* com doses de 100 mg kg^{-1} solo (Chahardoli et al., 2020).

Por todos esses aspectos, NiNP em altas concentrações podem danificar o ecossistema do solo, reduzir a diversidade da microbiota, causar efeitos tóxicos nas plantas e, em consequência, diminuir a produtividade agrícola. Adicionalmente, ao entrar na cadeia trófica ou acumular nos corpos hídricos, esse elemento, em elevadas concentrações, pode causar sérios danos à fauna e à saúde humana (Zhai et al., 2018).

Diante do potencial de poluição por Ni, faz-se necessário o uso de estratégias para a remoção deste contaminante do meio ambiente. Uma alternativa para a sua remoção é a fitorremediação, isto é, utilizar plantas para a remoção ou redução das

concentrações desse elemento no meio (Yan et al., 2020). A espécie *Pistia stratiotes* possui potencial fitorremediador por ser uma espécie hiperacumuladora, capaz de absorver e concentrar metais pesados de 100 a 1000 vezes mais que uma espécie não-acumuladora (Rezania et al., 2016). Ademais, plantas de *P. stratiotes* são eficientes para a bioacumulação e biorremediação de alguns metais pesados, inclusive Ni, podendo remover mais de 50% desse elemento do meio aquático (Lu et al., 2011), utilizando as raízes como principal método de fitorremediação (rizofiltração), com capacidade para acumular altas concentrações (Gebre e Sendeku, 2019) e com grande capacidade de propagação (Eid et al., 2021).

Neste contexto, o desenvolvimento do presente estudo possui relevância científica, acadêmica e social, uma vez que objetiva entender a dinâmica fisiológica celular em resposta ao estresse por Ni na forma de nanopartículas em plantas de *Pistia stratiotes*. Nossas hipóteses foram que a *Pistia* é capaz de remover as NiNP do meio, absorvendo diferentemente do sal de Ni e que a forma salina é mais tóxica para as plantas que as NiNP. Esse conhecimento possibilita o melhor entendimento sobre o funcionamento das estratégias de fitorremediação, para que haja maior difusão deste conhecimento científico de importância acadêmica e social e, quiçá, dialogar com outras experiências de instituições de ensino superior brasileiras. Salienta-se que é escasso um estudo sobre esta temática e ainda não se conhece bem o funcionamento de nanopartículas em plantas, tendo poucos estudos nesta área e, em sua maioria, recentes, o que justifica seu desenvolvimento, além da possibilidade de identificar avanços, limitações e estratégias para que no futuro, seja possível utilizar estas plantas na recuperação de corpos d'água contaminados com esse componente metálico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Espécimes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae), coletadas no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa/MG, Brasil, foram lavadas em água destilada por 30 segundos, transferidas para solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), ½ força iônica, pH 6,5, e mantidas em sala de crescimento com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 ± 2 °C, 12/12 h claro/escuro), por 3 dias, para aclimação às condições experimentais.

2.2. Aplicação dos tratamentos

As plantas foram mantidas em solução nutritiva de Clark contendo diferentes concentrações de NiNP e NiSO₄, permanecendo nestas condições por sete dias, acompanhando o seguinte desenho: 1) *Controle*: plantas mantidas apenas em solução nutritiva de Clark; 2) +0,3 NiSO₄: solução nutritiva + Sulfato de Níquel (NiSO₄ 0,3 mg L⁻¹); 3) +1,5 NiSO₄: solução nutritiva + Sulfato de Níquel (NiSO₄ 1,5 mg L⁻¹); 4) +7,5 NiSO₄: solução nutritiva + Sulfato de Níquel (NiSO₄ 7,5 mg L⁻¹). 5) +0,3 NiNP: solução nutritiva + Nanopartículas de Níquel (NiNP 0,3 mg L⁻¹); 6) +1,5 NiNP: solução nutritiva + Nanopartículas de Níquel (NiNP 1,5 mg L⁻¹); 7) +7,5 NiNP: solução nutritiva + Nanopartículas de Níquel (NiNP 7,5 mg L⁻¹). Após retirar todas as amostras necessárias para as análises, as plantas foram descartadas e separadas do lixo comum.

2.3. Preparação das nanopartículas de Ni

2.3.1. Nanopartículas de Ni valência zero “verdes”

Coleta dos resíduos vegetais

Os materiais vegetais utilizados, folhas e frutos, foram coletados de exemplares de *Eucalyptus grandis* cultivados em uma propriedade rural familiar, situada no município de Viçosa, Minas Gerais.

Obtenção dos extratos redutores a partir dos resíduos vegetais

A obtenção dos extratos redutores, a partir dos materiais vegetais, foi realizada conforme a metodologia proposta por Wang et al. (2014), com algumas modificações. Os materiais vegetais coletados foram lavados com água deionizada e submetidos à secagem em estufa com renovação/circulação de ar (MARCONI MA 035), a 60 °C, por 3 dias. Em seguida, os materiais secos foram ser moídos em um moinho tipo Wiley (Tecnal TE-680), coletando-se a fração passante pela peneira (malha *mesh* 30) acoplada ao equipamento e armazenada em dessecador. A amostras desse material foi adicionada água deionizada, para obtenção de concentração equivalente a 60 g L⁻¹, e o sistema mantido em aquecimento a 80 °C, por 1 h, com agitação constante. Em seguida, a suspensão resultante foi peneirada (malha com abertura de 1 mm) e a fração passante submetida à centrifugação (2500 xg), por 5 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado à vácuo, utilizando-se papel de filtro qualitativo de celulose, com gramatura de 80 g m⁻², para obtenção do extrato redutor (o filtrado), o qual foi utilizado na reação de síntese das NiNP.

Síntese das NiNP “verdes” utilizando-se extratos redutores obtidos a partir dos materiais vegetais

A síntese das NiNP foi realizada conforme a metodologia proposta por Wang et al. (2014), com algumas adaptações. A produção das NiNP ocorreu pela adição do extrato redutor, por gotejamento, a uma solução de NiSO₄ 0,1 mol L⁻¹, na razão volumétrica de 2:1. Durante o procedimento, o sistema reacional esteve sob temperatura ambiente e agitação constante, por meio de um agitador magnético, até esgotar a solução de extrato redutor. A solução resultante, contendo as NiNP em suspensão (concentração teórica de Ni 0,03 mol L⁻¹), foi armazenada sob refrigeração (em torno de 4 °C) até a sua caracterização ou utilização nos experimentos.

Caracterização das nanopartículas

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDS).

Para a obtenção das imagens das NiNP utilizou-se Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi TM3000. As amostras foram previamente secas em estufa à 85°C por 45 minutos e fixadas em stubs recobertos com uma camada de ouro (20-30 nm) utilizando-se o metalizador Quorum Q150R S. A tensão de aceleração de elétrons do equipamento foi selecionada de modo automático. Para verificação da composição elementar das NiNP foi utilizado EDS (Espectroscopia de Energia dispersiva de raio X).

Difratometria de Raios-X (DRX)

As análises de Difratometria de Raios-X (DRX) foram realizadas para determinar a estrutura cristalina das NiNPs, utilizando-se um equipamento D8-Discover – BRUKER, equipado com um tubo de cobre (1,5418 Å), varrendo-se a faixa de 10° a 80° 2θ com passo de 0,05°. Os picos característicos das amostras foram identificados utilizando-se o software Search Match.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho de transformação de Fourier (FTIR) para analisar a presença de grupos funcionais presentes na estrutura do extrato redutor foram adquiridos usando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) em um equipamento Varian 660-IR, com acessório de cristal de diamante GladiATR, em modo de transmissão com varreduras de 400 a 4000 cm⁻¹.

2.4. Determinação de Ni absorvido

A fim de determinar a concentração de Ni absorvido por *P. stratiotes*, raízes e folhas foram coletadas, lavadas em água desionizada e mantidas em estufa, a 80 °C, até obtenção de massa seca constante. Aproximadamente 0,1 g de material seco foi mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (razão 3:1), à temperatura de 180 °C até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al., 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, a concentração de Ni estimada com base em curva de calibração previamente preparada, por meio de espectrofotometria de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation), sendo os resultados expressos em µg g⁻¹ MS.

2.5. Taxa de crescimento relativo

O cálculo de taxa de crescimento relativo (TCR) foi realizado segundo Hunt (1978) usando a massa seca de raízes e folhas, conforme a equação a seguir:

$$TCR = (\ln_{MS1} - \ln_{MS0}) \times 1000 / (t1 - t0);$$

TCR: taxa de crescimento relativo;

$\ln_{MS1}$: logaritmo da massa seca do final do experimento;

$\ln_{MS0}$: logaritmo da massa seca do começo do experimento;

$t1-t0$: duração do experimento, em dias.

A massa seca do começo do experimento foi obtida através da coleta de 20 plantas, pesadas inicialmente para se obter a massa fresca, prosseguindo para a secagem destas plantas e pesando novamente, e fazendo a média dos valores para se obter a relação de massa seca/massa fresca para se obter os valores de massa seca inicial.

2.6. Pigmentos Fotossintéticos

Os teores de clorofila a, b, total e de carotenoides foram determinados de acordo com o método descrito por Wellburn (1994). A extração da clorofila e dos carotenoides foi feita a partir de três discos de 1 cm de diâmetro, obtidos da primeira folha completamente expandida. Os discos foram incubados em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO - saturado por carbonato de cálcio), em tubos de ensaio revestidos com papel alumínio e devidamente tampados, onde permaneceram por 24 h, seguido de incubação em banho-maria a 65 °C, por 45 min. Após esse período, procedeu-se às leituras da absorbância nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF.

$$\text{Clorofila a} = 12,47 A_{665} - 3,62 A_{649}$$

$$\text{Clorofila b} = 25,06 A_{649} - 6,5 A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 A_{480} - 1,29 C_a - 53,78 C_b) / 220$$

2.7. Parâmetros fotossintéticos

A fluorescência da clorofila foi mensurada aos 7 dias após a submissão dos tratamentos, no período noturno, utilizando-se de um fluorômetro portátil, em folhas totalmente expandidas, após 30 minutos no escuro, para se analisar as variáveis: taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência quântica do FSII (Fv/Fm) e a eficiência efetiva do FSII (Φ PSII) (Van Kooten e Snel, 1990).

A avaliação das trocas gasosas foi realizada aos 7 dias após submissão dos tratamentos, às 8 horas da manhã, em folha totalmente expandida. Para tanto, foi utilizado o analisador de gás infravermelho (IRGA), com fluxo de ar de 350 mL min^{-1} e fonte de luz acoplada de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por meio do qual foram determinados a concentração interna de carbono (C_i) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E) ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de fotossíntese líquida (A) ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e respiração ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

2.8. Quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

Amostras de 0,2 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 2 mL de um meio de extração contendo tampão fosfato de potássio 50 mM e hidroxilamina 1 mM, pH 6,5 e centrifugadas, a 10.000 g por 15 min, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 μL de sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 100 μM de sulfato ferroso amoniacal ($(\text{FeNH}_4 (\text{SO}_4))$), ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 125 μM e sorbitol 100 mM, em um volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos para os reagentes extratos vegetais foram preparados e subtraídos das amostras. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração, que foi previamente preparada com padrões de H_2O_2 , sendo os resultados expressos em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Amostras de 0,2 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 mL TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g , por 10 min. Alíquotas (250 μL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,5% (m/v) e TCA

10% (m/v), incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 min. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm, sendo os resultados expressos em nmol de MDA g⁻¹ MF.

2.9. Extravasamento de eletrólitos

Para a determinação do extravasamento de eletrólitos, 12 discos foliares e de raízes de 1 cm de diâmetro foram colocados em uma peneira, lavados com água deionizada por 5 segundos e acondicionados em frascos pesa-filtro contendo 20 mL de água deionizada. Após fechados, os frascos foram acondicionados à temperatura de 25 °C, por 12 h. Em seguida, aferiu-se a condutividade inicial do meio (Xi) usando condutímetro de bancada (Lutron CD-4301, Lutron Electronic Enterprise Co., Taipei, Taiwan). Posteriormente, os frascos foram submetidos à temperatura de 90 °C, por 2 h, em estufa de secagem e, após resfriamento do conteúdo dos mesmos, aferiu-se a condutividade final (Xf). O extravasamento de eletrólitos foi expresso como a porcentagem de condutividade em relação à condutividade total (Xf): $[(Xi/Xf) \times 100]$ (Campos e Thi, 1997).

2.10. Metabolismo antioxidante enzimático

Amostras frescas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido. O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,3 g de folhas e raízes de *P. stratiotes* em 1,5 mL do tampão de extração contendo 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 6 µL de ditioneitol (DDT) 0,5 M, 12 µL de fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de polivinilpirrolidona (PVPP). O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Biemelt et al., 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade de inibição da fotoredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT). A 100 µL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL do meio de incubação: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram iluminadas à intensidade de 20,7 µmol m⁻²

s⁻¹ por 5 min e a absorbância determinada a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidades de SOD mg proteína⁻¹ min⁻¹, em que uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotoredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977).

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático na qual foram adicionados 950 µL de meio de incubação contendo 500 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, mantendo-se em temperatura de 28 °C, por 5 minutos. A determinação da absorbância foi feita a 240 nm, à temperatura de 25 °C, medindo durante o primeiro minuto de reação de acordo com Havir e McHale (1989), expressados em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

A atividade da enzima POX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Jucoski et al., 2013). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Maehly e Chance, 1954) e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Para quantificação da concentração de proteínas, usadas para base da atividade enzimática, utilizou-se o método proposto por Bradford (1976). Em 0,1 mL do extrato enzimático bruto, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford. Após 15 min de reação no escuro, foi lida a absorbância a 595 nm e os teores de proteínas foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de albumina bovina (BSA), expressos em mg proteína g MF⁻¹.

2.11. Desenho experimental e estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), num fatorial de sete tratamentos com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de uma planta/repetição. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R, sendo os dados experimentais de cada variável foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e de Bartlett ($p > 0,05$) para verificação básica da normalidade e homocedasticidade residuais, seguido de transformações pelo modelo da família Box-

Cox caso fossem necessárias. Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) com complemento para comparação múltipla de médias do teste de Fisher-Bonferroni ($p > 0,05$). As variáveis de natureza paramétrica foram analisadas estatisticamente por meio da ANOVA - análise de variância e teste de Fisher ($p > 0,05$) com teste de comparação de média de Tukey ($p > 0,05$). Para as análises de dados, foi utilizada a linguagem e ambiente R (R. Core Team, 2016), com extensões na utilização dos pacotes MASS (Venables & Ripley, 2002), AGRICOLAE (De Mendiburu, 2009) e EXPDES (Ferreira et al., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Observou-se agregados de nanopartículas com tamanho médio de 90 nm, medidas usando o software ImageJ, que em solução ficam dispersas (Figura 1 A). O EDS indica que a amostra é uma matriz orgânica no qual o metal está inserido, complexado em uma camada orgânica (Figura 1 B).

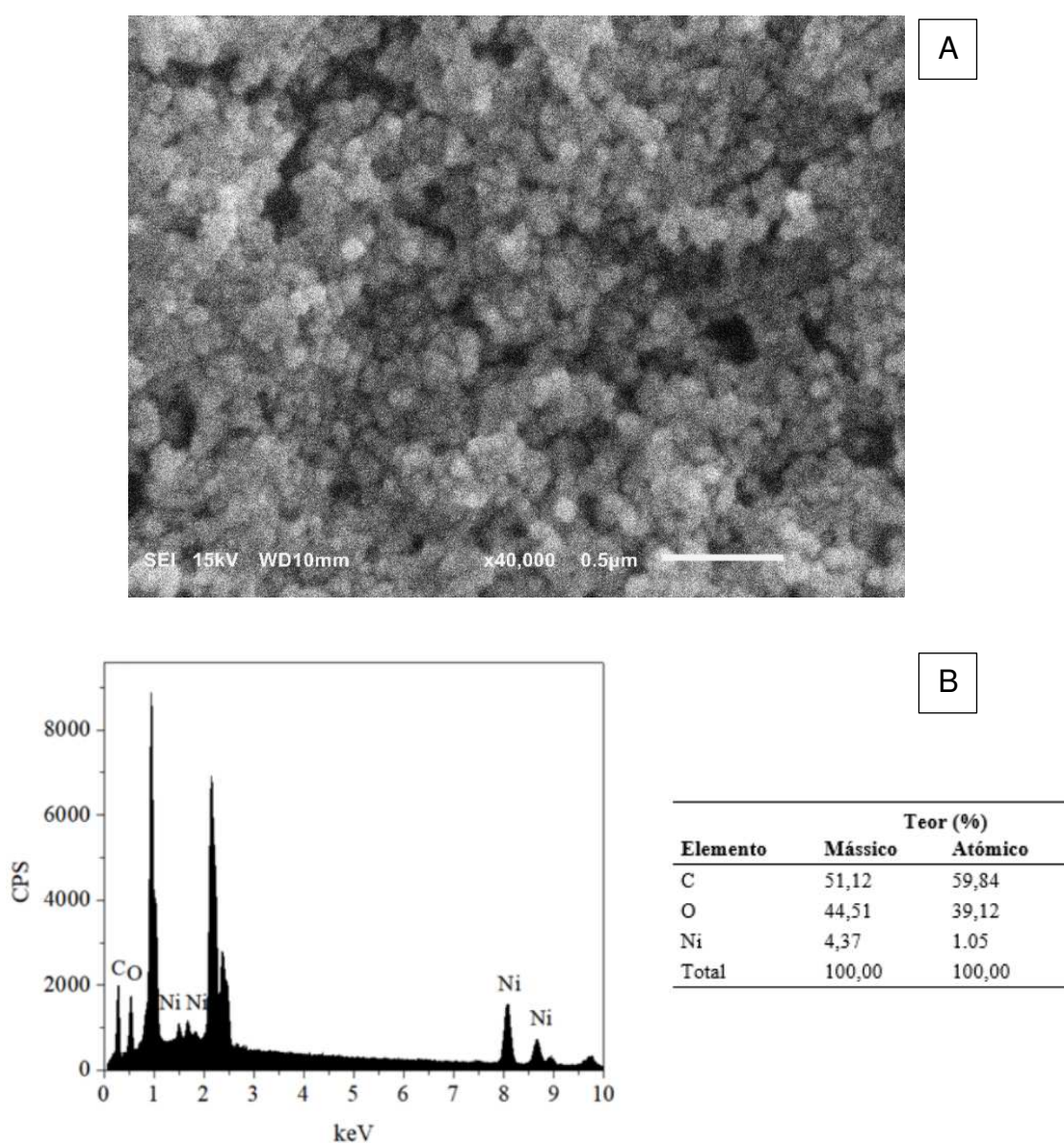


Figura 1. Imagem da Microscopia Eletrônica de Varredura contendo nanopartículas de níquel (A) e composição química elementar (C, O, Ni) presentes na amostra (B).

3.2. Difractometria de Raios-X (DRX)

O DRX identificou picos bem definidos próximos de 33° , 36° , 44° , que correspondem às nanopartículas de níquel de material cristalino (Sudhasree et al., 2014; Ahghari et al., 2020). As nanopartículas de metal de valência zero geralmente são cristalinas.

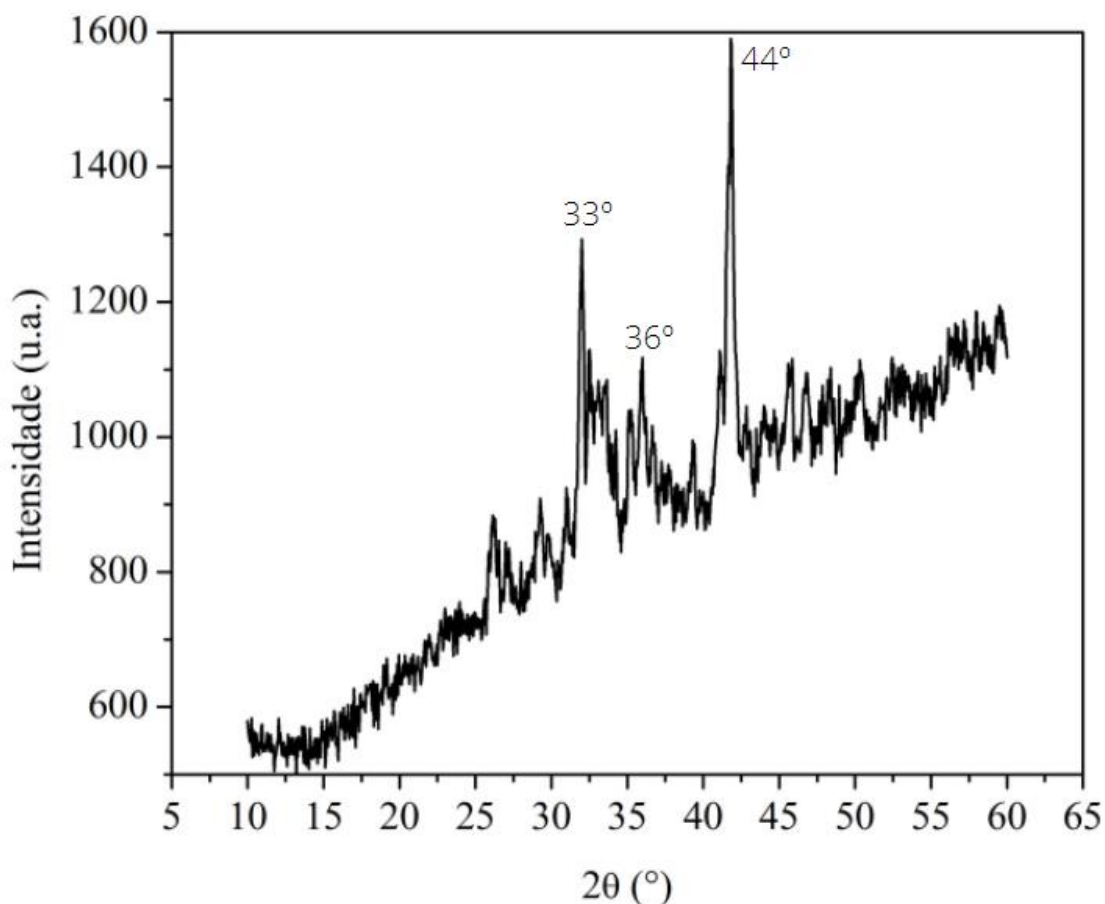


Figura 2. Caracterização de nanopartículas de níquel por difratometria de raios-x. A difratometria de raios-x avaliou as nanopartículas produzidas por síntese verde e mostra diferentes picos em ângulos 2θ de 33° , 36° , 44° .

3.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformação de Fourier (FTIR)

Os resultados de FTIR (Figura 3) indicam a presença de hidrocarbonetos (3228 cm^{-1}), ácidos alifáticos (1730 cm^{-1} , 1026 cm^{-1}), polifenóis (1615 cm^{-1} , 1401 cm^{-1}), aminas aromáticas (1363 cm^{-1}), éteres, álcoois, fenóis, ácidos graxos, ésteres e

anidridos (1099 cm^{-1}) nas folhas de eucalipto, no extrato e nas NiNP formadas. A banda de $1490,01\text{ cm}^{-1}$ indica estiramento da ligação C-N nas nanopartículas.

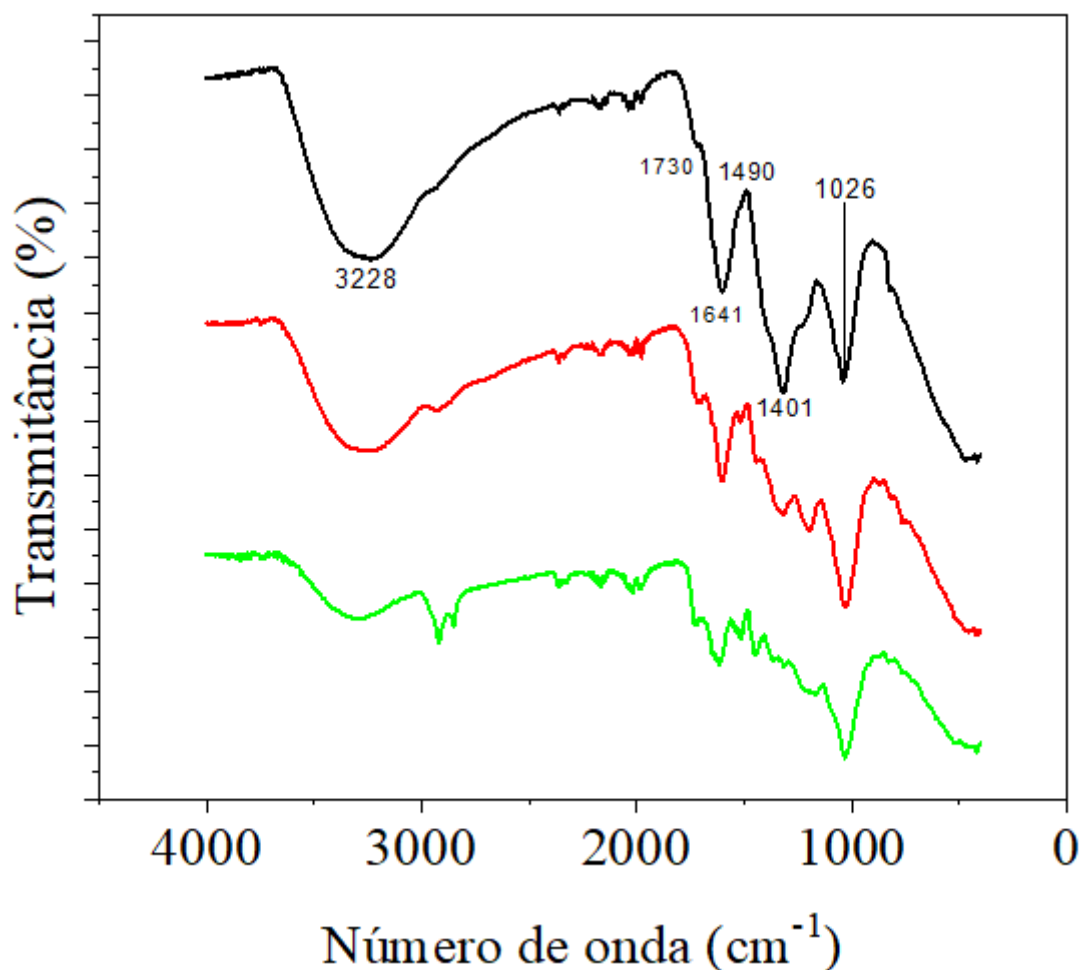


Figura 3. Espectro de FTIR de nanopartículas de níquel (preto), folha utilizada na preparação do extrato (verde) e extrato redutor (vermelho) avaliadas em número de onda de 0 a 4000 cm^{-1} , mostrando picos em 3228, 1730, 1641, 1490, 1401 e 1026 cm^{-1} .

3.4. Concentração de Ni absorvido

As plantas demonstraram capacidade de absorção e acúmulo de níquel com o aumento da concentração na solução nutritiva, sendo retido, preferencialmente, nas raízes. Houve diferenças de acúmulo nas folhas entre as duas formas de Ni utilizadas, sendo 31% mais acumulado na forma de nanopartículas. Nas raízes não houve diferenças estatísticas de acúmulo quando comparadas as formas salina e do elemento na forma de nanopartículas (Figuras 4A e C). Como esperado, a medida que

a concentração de níquel na solução aumentou, o acúmulo nas plantas também resultou em acréscimo do metal nos tecidos (Figuras 4B e D).

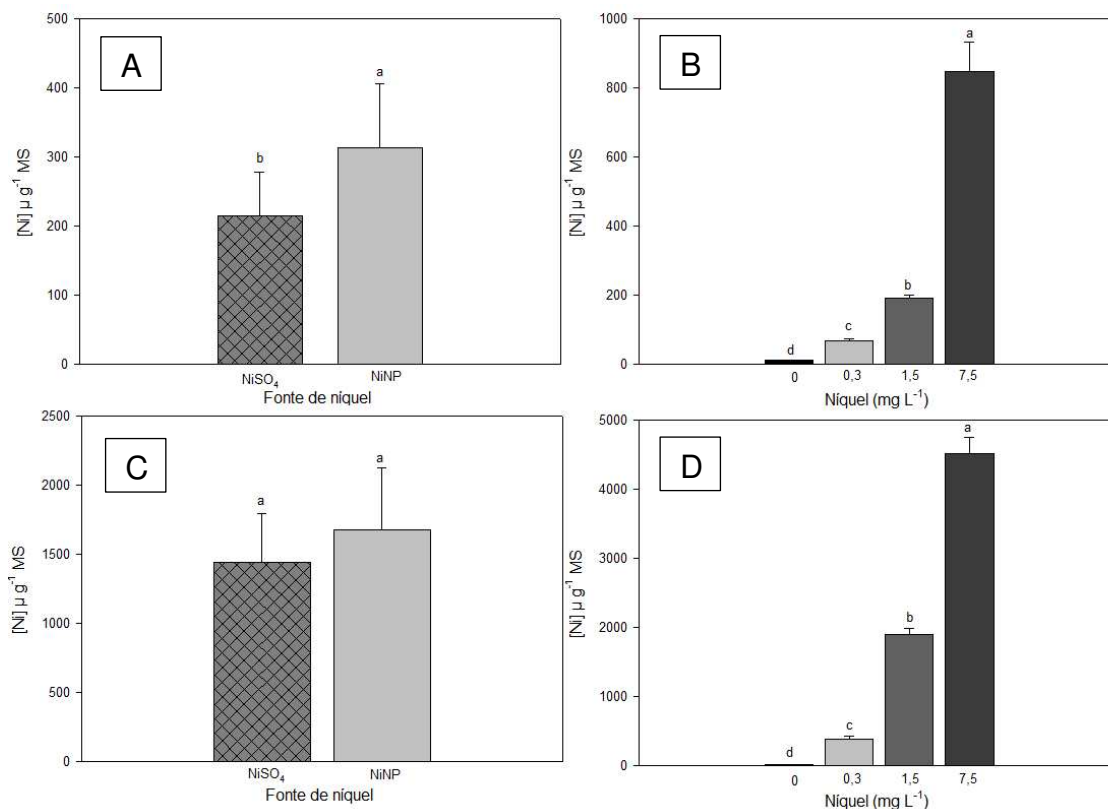


Figura 4. Acúmulo de níquel (Ni) em diferentes concentrações nas formas de sal (NiSO_4) e nanopartículas (NiNP) em folhas (A e B) e raízes (C e D) de *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.5. Taxa de crescimento relativo

As plantas expostas ao Ni em forma salina tiveram quedas mais drásticas no crescimento vegetal comparadas às plantas expostas ao Ni em forma de nanopartículas. Os tratamentos 1,5 e 7,5 mg L^{-1} promoveram redução na taxa de crescimento relativo de 37% e 58% respectivamente, quando somadas todas as médias da mesma concentração comparadas ao controle, indicando que as nanopartículas apresentaram efeitos menos tóxicos no crescimento do que o sal (Figura 5).

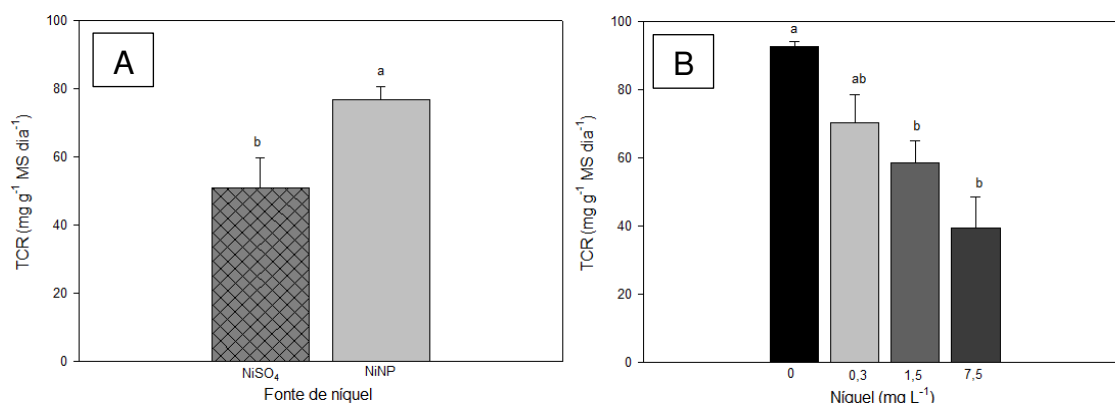


Figura 5. Taxa de crescimento relativo de plantas de *Pistia stratiotes* expostas ao níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP). Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.6. Pigmentos fotossintéticos

Clorofila *a* e *b*

As plantas de *Pistia stratiotes* não apresentaram diferenças estatísticas entre as diferentes fontes de Ni nas concentrações de clorofila *a* e clorofila *b*, como mostram as figuras 6A e C respectivamente. Nas concentrações de 0,3 e 1,5 mg L⁻¹, as plantas não apresentaram diferenças em relação ao controle em ambos os pigmentos. No tratamento contendo 7,5 mg L⁻¹ de Ni, a diferença entre concentrações foi significativa, apresentando reduções de 35% de clorofila *a* e 25% de clorofila *b* em relação ao controle (Figuras 6B e D).

Carotenoides

A figura 7 mostra que as concentrações de carotenoides não foram diferentes entre fontes e doses até 1,5 mg L⁻¹, porém na concentração de 7,5 mg L⁻¹ as plantas no tratamento com níquel na forma salina apresentaram redução de 45% destes pigmentos comparadas as plantas tratadas com nanopartículas na mesma concentração e de 43% comparadas ao controle, demonstrando maior toxicidade do níquel na forma de sal às concentrações de carotenoides.

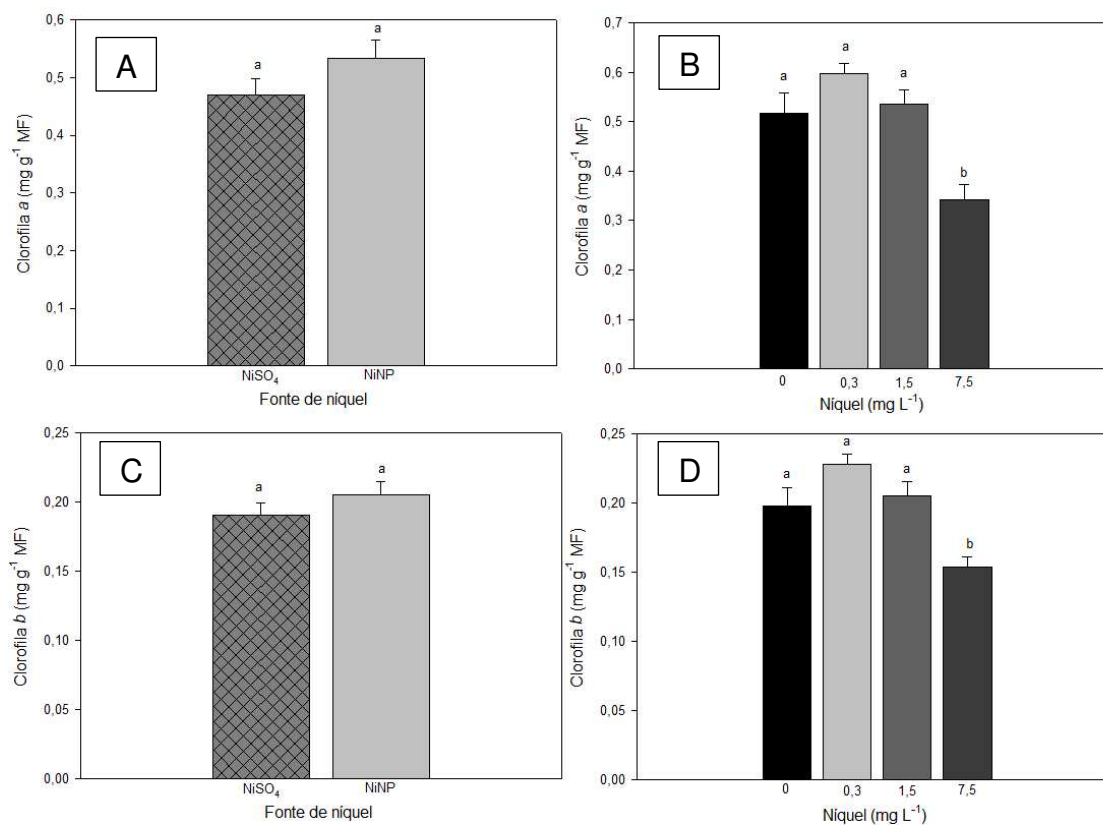


Figura 6. Concentrações de clorofila *a* (A e B) e *b* (C e D) em plantas de *Pistia stratiotes* tratadas em diferentes concentrações de níquel (Ni) nas formas salina (NiSO₄) e de nanopartículas (NiNP). Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

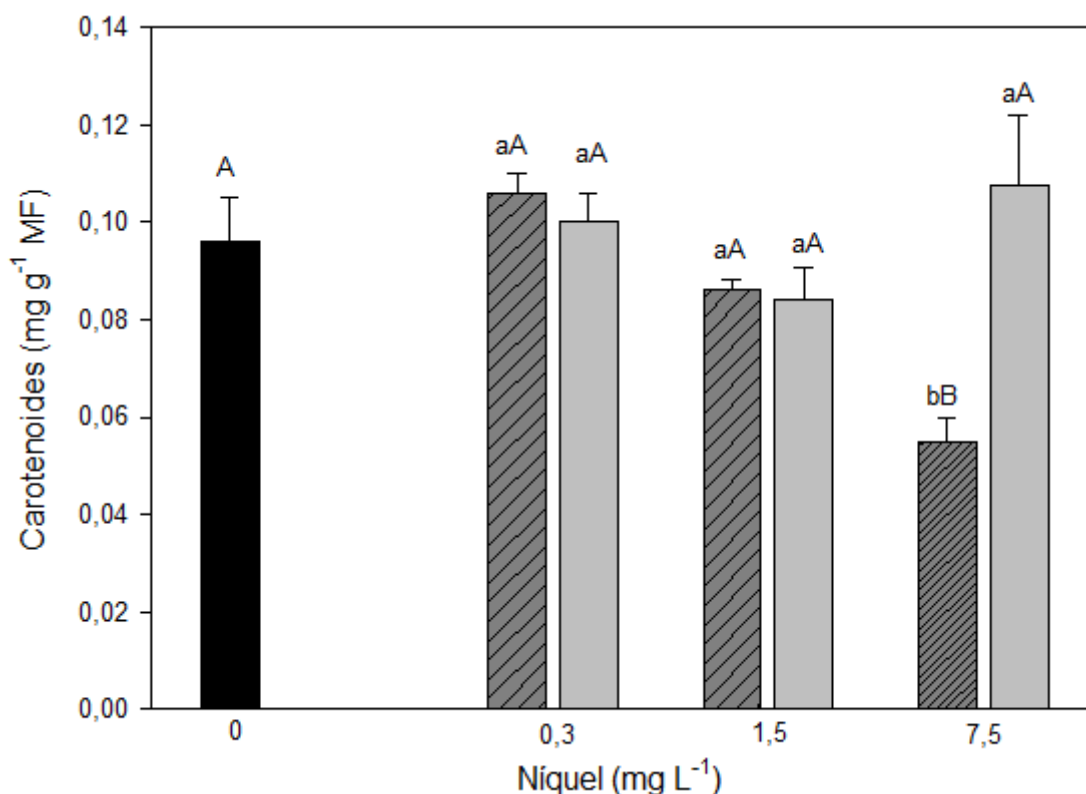


Figura 7. Concentrações de carotenoides em plantas de *Pistia stratiotes* tratadas sem adição de níquel na solução controle (preto) e em diferentes concentrações de níquel (Ni) nas formas salina (NiSO₄) (cinza escuro listrado) e de nanopartículas (NiNP) (cinza claro). As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.7. Parâmetros fotossintéticos

A respiração foi afetada em todos os tratamentos com NiSO₄, diminuindo em relação ao controle enquanto os tratamentos com NiNP não diferiram estatisticamente do controle, somente as plantas tratadas com a concentração mais alta de 7,5 mg L⁻¹ apresentou aumento na taxa respiratória. A taxa de fotossíntese líquida não foi afetada nos tratamentos de 0,3 e 1,5 mg L⁻¹ de ambas as fontes de Ni, porém houve alterações nos outros tratamentos afetando negativamente as plantas tratadas com NiNP sendo reduzida fortemente no tratamento de maior concentração. Contudo, a fotossíntese foi reduzida também no tratamento de 7,5 mg L⁻¹ na forma salina (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre a respiração e taxa de fotossíntese líquida (*A*) em *Pistia stratiotes*. As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tratamento	Respiração ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Controle	2,14 $\pm$ 0,24 AB	11,38 $\pm$ 1,51 A
0,3 mg L ⁻¹ NiSO ₄	1,28 $\pm$ 0,17 bB	11,8 $\pm$ 0,19 aA
0,3 mg L ⁻¹ NiNP	2,16 $\pm$ 0,08 aAB	12,75 $\pm$ 0,54 aA
1,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	1,19 $\pm$ 0,12 bB	13,66 $\pm$ 0,25 aA
1,5 mg L ⁻¹ NiNP	2,31 $\pm$ 0,07 aAB	9,28 $\pm$ 1,48 aA
7,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	1,82 $\pm$ 0,26 bAB	5,81 $\pm$ 1,18 aB
7,5 mg L ⁻¹ NiNP	2,85 $\pm$ 0,16 aA	1,40 $\pm$ 0,35 bC

As taxas de carbono interno (*C_i*) sofreram incremento apenas no tratamento com 7,5 mg L⁻¹ das duas fontes de Ni. Os efeitos do Ni sobre a condutividade estomática (*g_s*) e transpiração (*E*) seguiram o padrão das taxas fotossintéticas, mostrando um leve aumento nas concentrações de 0,3 e 1,5 mg L⁻¹ e reduzindo na concentração de 7,5 mg L⁻¹, sendo as plantas do tratamento com NiNP mais afetadas, diminuindo 49% na *g_s* e 23% na *E* em relação ao controle enquanto as tratadas com NiSO₄ reduziram 19% na *g_s* e 14% na *E* em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre a concentração interna de carbono (*C_i*), condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*) em *Pistia stratiotes*. As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tratamento	<i>C_i</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>g_s</i> ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Controle	368,56 $\pm$ 1,72 B	1,18 $\pm$ 0,2 AB	6,97 $\pm$ 0,46 A

0,3 mg L ⁻¹ NiSO ₄	368,69,54 ± 1,25 aAB	1,38 ± 0,15 aA	6,98 ± 0,33 aA
0,3 mg L ⁻¹ NiNP	365,54 ± 2,42 aB	1,2 ± 0,14 aAB	7,3 ± 0,31 aA
1,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	362,55 ± 2,34 bB	1,24 ± 0,13 aAB	6,73 ± 0,26 aA
1,5 mg L ⁻¹ NiNP	373,79 ± 2,22 aB	1,19 ± 0,11 aAB	7,35 ± 0,43 aA
7,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	378,17 ± 3,29 bA	0,96 ± 0,15 aB	5,99 ± 0,33 aB
7,5 mg L ⁻¹ NiNP	391,53 ± 3,91 aA	0,61 ± 0,14 bB	5,37 ± 0,37 bB

Foi possível observar alterações na eficiência fotoquímica máxima do FSII (Tabela 3), em que as plantas dos tratamentos com concentrações de 0,3 e 1,5 mg L⁻¹ foram estatisticamente maiores que o controle e as de concentração de 7,5 mg L⁻¹ de nanopartículas e NiSO₄. Não foi observado mudanças significativas no rendimento fotoquímico efetivo (Φ PSII), porém na taxa de transporte de elétrons (ETR) observou-se que as plantas tratadas com NiNP na concentração de 1,5 mg L⁻¹ tiveram maiores taxas, sendo 175% a mais que o controle (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre o rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ PSII) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em *Pistia stratiotes*. As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (P ≤ 0,05).

Tratamento	Fv/Fm	Φ PSII	ETR
Controle	0,79 ± 0,005 B	0,36 ± 0,27 A	43,43 ± 5,8 BC
0,3 mg L ⁻¹ NiSO ₄	0,81 ± 0,001 aA	0,14 ± 0,02 aA	63,6 ± 9,87 aB
0,3 mg L ⁻¹ NiNP	0,81 ± 0,004 aA	0,38 ± 0,3 aA	38,15 ± 4,38 bC
1,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	0,8 ± 0,001 aA	0,2 ± 0,003 aA	91,91 ± 1,43 bA
1,5 mg L ⁻¹ NiNP	0,8 ± 0,006 aA	0,27 ± 0,009 aA	119,42 ± 4,16 aA
7,5 mg L ⁻¹ NiSO ₄	0,79 ± 0,001 aB	0,24 ± 0,007 aA	109,71 ± 3,24 aA
7,5 mg L ⁻¹ NiNP	0,77 ± 0,009 bB	0,21 ± 0,01 aA	92,8 ± 8,02 bB

3.8. Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

A exposição aos tratamentos de NiSO₄ resultou em aumentos significativos de H₂O₂ nas folhas e raízes de *Pistia stratiotes*, que foram maiores estatisticamente que

nas folhas e raízes de plantas dos tratamentos com nanopartículas. A média entre cada concentração das duas fontes de níquel não diferiu estatisticamente. As folhas apresentaram maiores concentrações de H_2O_2 (Figura 8). Os teores de MDA nas folhas foram significativamente maiores na concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$. Em relação as plantas expostas ao Ni em forma de nanopartículas, em todas as concentrações os teores de MDA foram menores comparados às plantas expostas ao Ni na forma salina. Por outro lado, as concentrações de MDA diminuíram nas raízes, sendo as plantas tratadas com NiNP possuindo menores concentrações de MDA estatisticamente comparando às de NiSO_4 . (Figura 9).

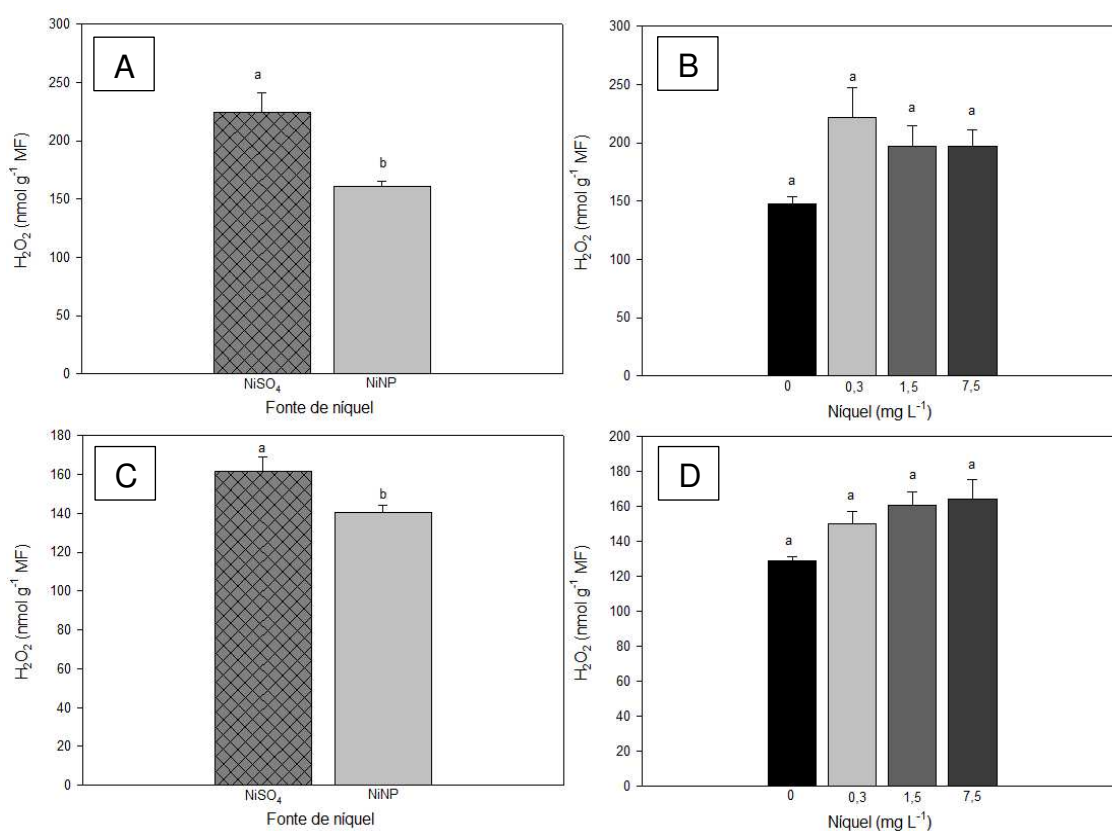


Figura 8. Efeitos do níquel (Ni) nas formas salina (NiSO_4) e de nanopartículas (NiNP) nas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A e B) e raízes (C e D) de *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

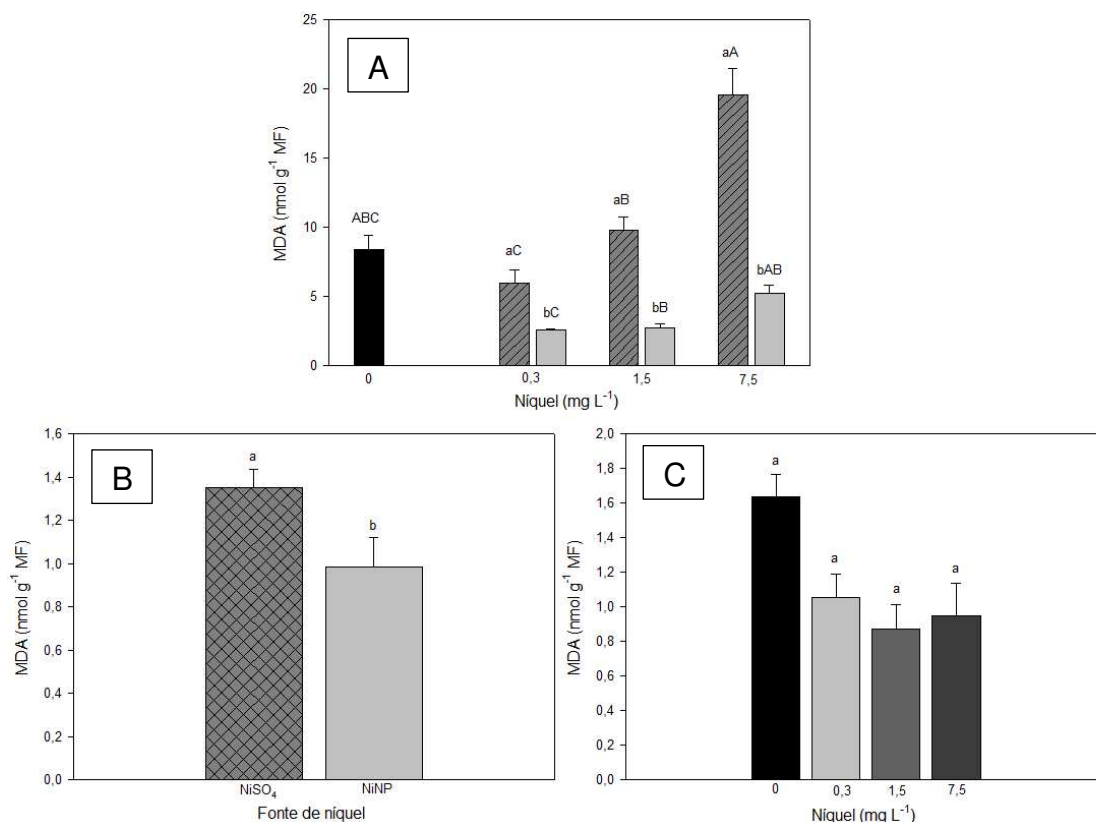


Figura 9. Efeitos do níquel (Ni) nas formas salina (NiSO₄) (cinza escuro listrado) e de nanopartículas (NiNP) (cinza claro) nas concentrações de malondialdeído (MDA) nas folhas (A) e raízes (B e C) de *Pistia stratiotes*. As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.9. Extravasamento de eletrólitos

A elevada concentração de MDA no tratamento de 7,5 mg L⁻¹ de Ni na forma salina é um indicativo que corrobora com os aumentos consideráveis de extravasamento de eletrólitos. Apesar de não ter diferenças estatísticas entre as fontes de níquel, ocorreu grandes danos à integridade de membrana nas folhas e raízes das plantas tratadas com a maior concentração de Ni do experimento. As porcentagens de extravasamento foram significativamente maiores que o controle, sendo valores 75% em folhas e 74% em raízes (Figura 10).

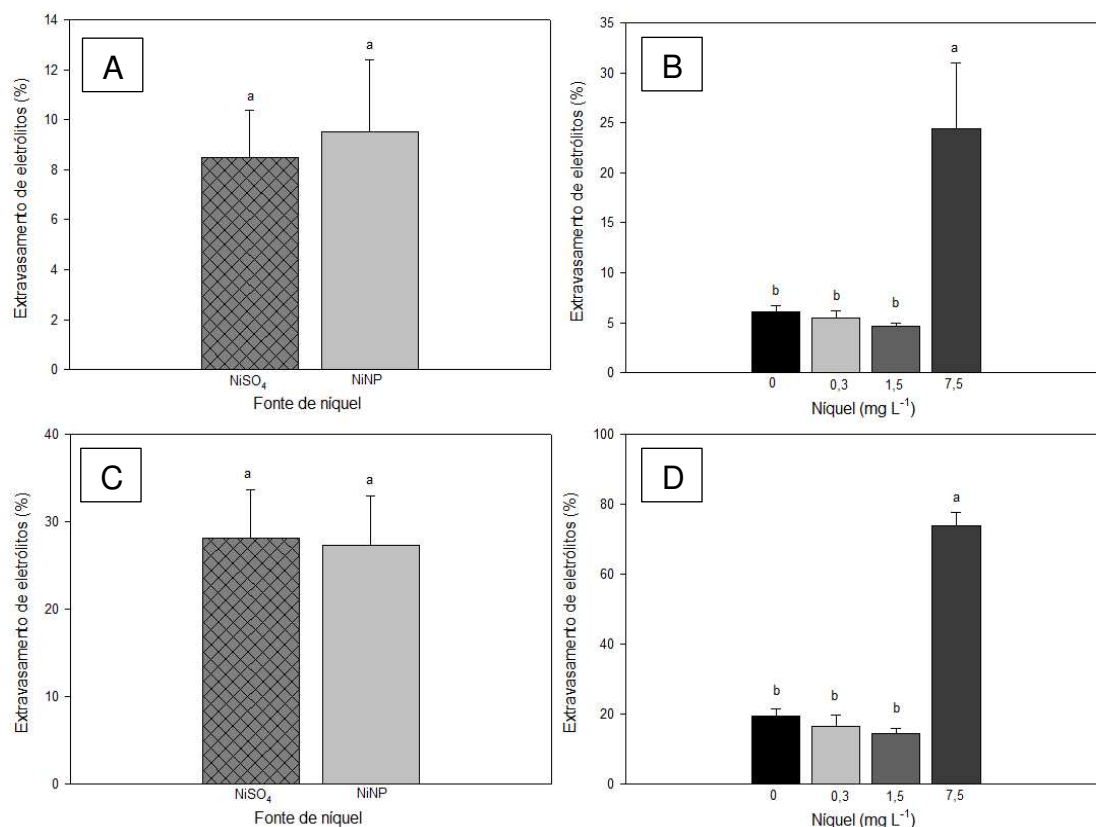


Figura 10. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre a integridade de membranas celulares nas folhas (A e B) e raízes (C e D) de *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.10. Metabolismo antioxidante enzimático

As folhas de plantas no tratamento de 1,5 mg L⁻¹ de níquel na forma de nanopartículas demonstraram elevada atividade da SOD, sendo maior estatisticamente comparada a atividade das plantas controle e das plantas do tratamento de mesma concentração de NiSO₄. As raízes tiveram atividades semelhantes, não sendo significativamente diferentes entre diferentes fontes de níquel, porém observou-se elevada atividade na concentração de 7,5 mg L⁻¹ (Figura 11). As enzimas CAT e POX (Figuras 12 e 13) não tiveram diferenças estatísticas entre o níquel na forma salina e na forma de nanopartículas. A resposta da CAT foi diminuída na folha nas concentrações de 0,3 e 1,5 mg L⁻¹, porém demonstrando aumento na dose de 7,5 mg L⁻¹, estatisticamente igual ao controle. Nas raízes todas

as respostas foram estatisticamente idênticas. A resposta da enzima POX nas folhas das plantas em todas as concentrações foram estatisticamente iguais ao controle, entretanto as raízes diminuíram as atividades na concentração de 1,5 mg L⁻¹. No geral, as plantas apresentaram resultados semelhantes comparando os tratamentos de NiSO₄ com as NiNPs.

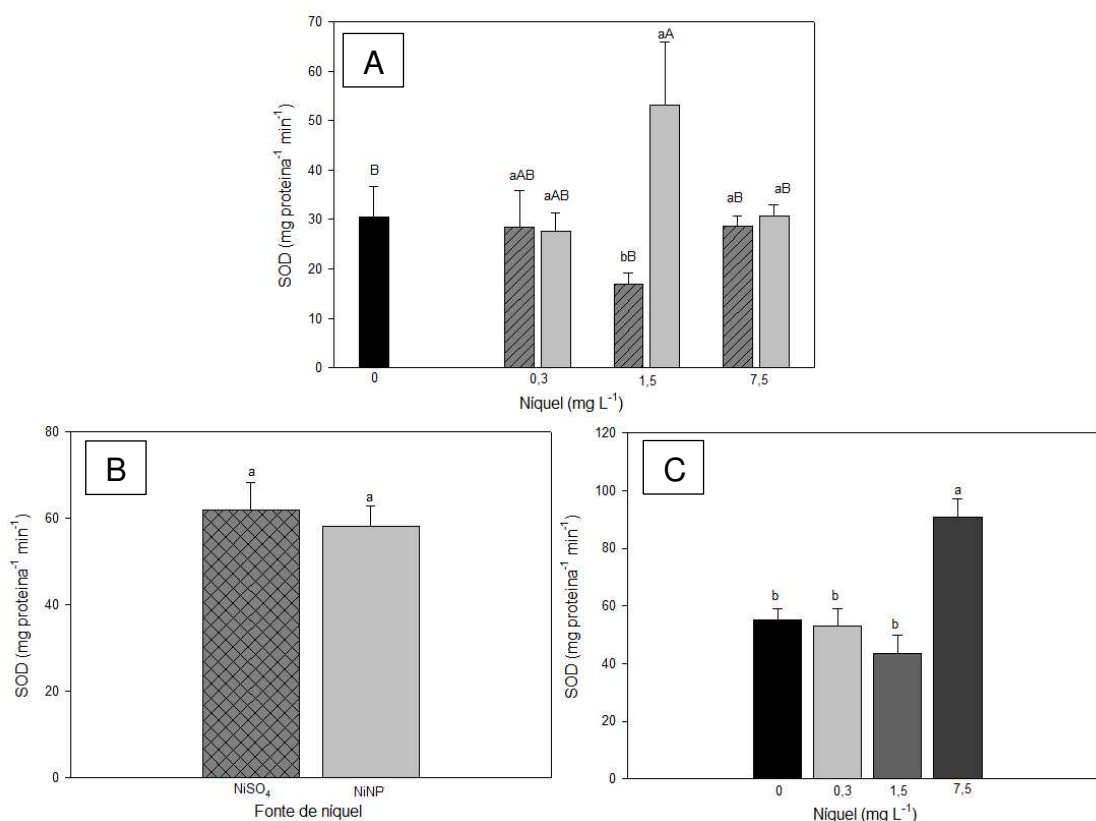


Figura 11. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) (cinza escuro listrado) e nanopartículas (NiNP) (cinza claro) sobre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em folhas (A) e raízes (B e C) de *Pistia stratiotes*. As letras minúsculas representam a comparação entre mesma concentração e diferentes fontes. As letras maiúsculas representam a comparação entre mesma fonte e diferentes concentrações. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

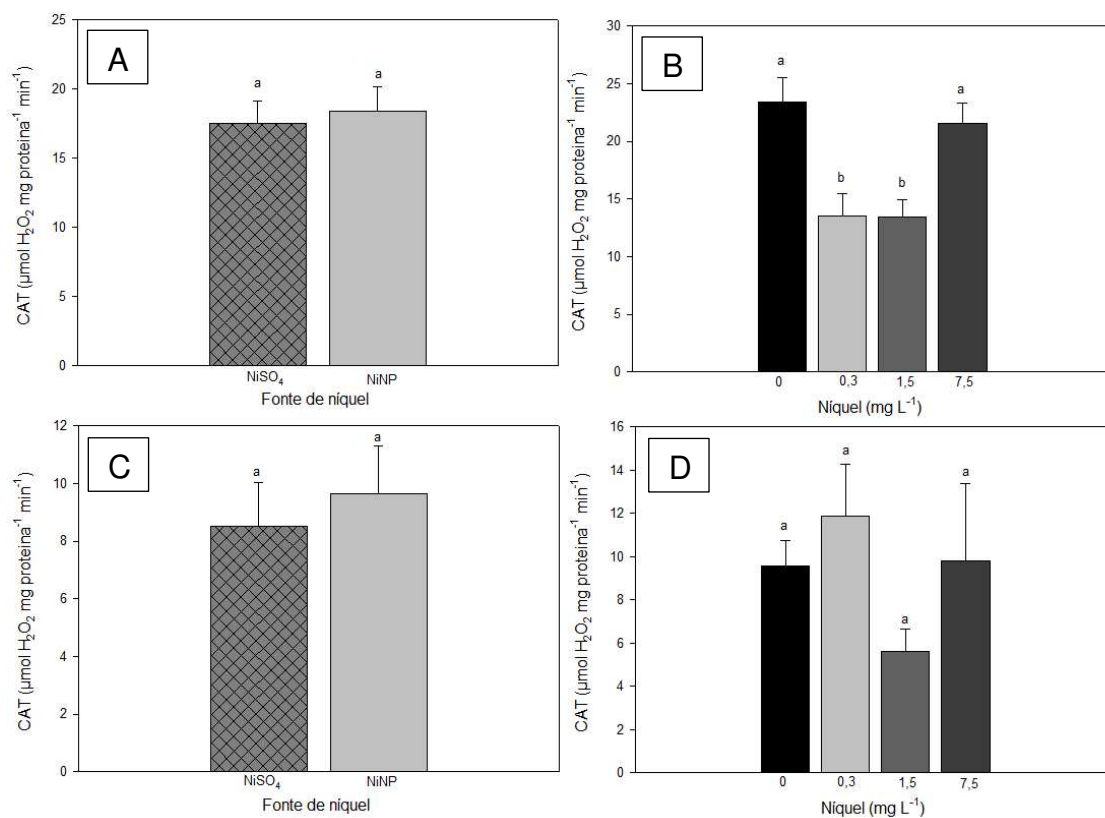


Figura 12. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em folhas (A e B) e raízes (C e D) de *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

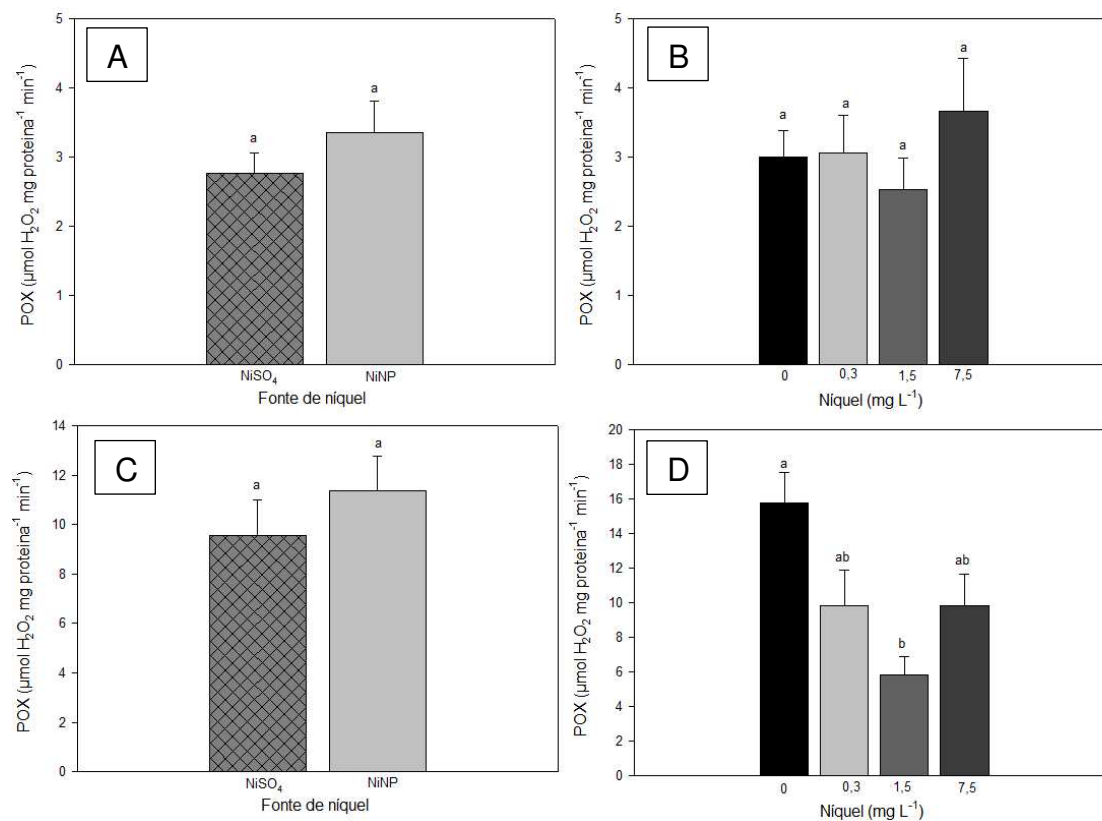


Figura 13. Efeitos do níquel (Ni) nas formas de sal (NiSO₄) e nanopartículas (NiNP) sobre a atividade da enzima antioxidante peroxidase (POX) em folhas (A e B) e raízes (C e D) de *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As

5. DISCUSSÃO

Os resultados de caracterização das NiNP mostram que as nanopartículas possuem estrutura cúbica de face centrada, e indicam também que o método de extração foi eficiente para liberação de compostos orgânicos presentes nas folhas de eucalipto proporcionando a redução e revestimento das NiNP (Barbosa, 2007; Wang et al., 2014; Pandian et al., 2015; Din et al., 2020). Sabendo da origem do material vegetal, as vibrações das bandas mostradas na análise de FTIR são atribuídas a compostos orgânicos responsáveis pela redução do níquel, principalmente os polifenóis.

Para uma eficiente remoção de nanopartículas do meio aquático por meio de espécies vegetais, as plantas utilizadas devem tolerar elevadas concentrações do elemento. Olkhovych et. al (2016) mostraram que a *Pistia stratiotes* é uma planta efetiva para a absorção e acúmulo de nanopartículas metálicas, com capacidade de remoção, num período de 7 dias, de 94% de nanopartículas de manganês, 55% de nanopartículas de cobre, 65% de nanopartículas de zinco e 76% de nanopartículas de prata.

Na presente pesquisa, as raízes acumularam concentrações na ordem de 5420,23 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, com o níquel (Ni) na forma de nanopartículas, e 3983,68 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, com o elemento na forma salina. Outros estudos, inclusive, demonstraram capacidade de acúmulo diferente, conforme relatado por Leblebici et. al (2019), em que as plantas de *Pistia* acumularam concentração 1820,18 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS de Ni quando cultivadas em meio de solução nutritiva com concentração de Ni de 20 mg L^{-1} , na forma de NiCl_2 .

Hanks et al. (2015) mostraram que plantas de *Pistia* foram capazes de acumular mais nanopartículas de prata que o sal do mesmo elemento em concentrações de 0,02, 0,2 e 2 mg L^{-1} . A maior absorção de nanopartículas pode ter se dado pelo fato da valência zero das NiNPs, podendo ter a entrada facilitada pelas membranas celulares. O níquel na forma salina fica prontamente disponível para a planta, embora encontrado em diferentes formas em condições naturais, a forma mais comum do níquel é na forma oxidada Ni^{2+} (Usman et al., 2019). O Ni é prontamente absorvido pelas raízes da planta; Nishida et al. (2011) mostraram que em plantas de *Arabidopsis thaliana*, o transportador de metais AtIRT1, da família ZIP/IRT, tem grande especificidade para metais divalentes e mostrou que tem papel na mediação da

absorção de níquel. A translocação deste elemento se dá primariamente pelo xilema através da transpiração, sendo o transporte influenciado e facilitado por quelantes de níquel como nicotianamina, histidina, ácidos orgânicos e que sem a ação destes compostos, o transporte de níquel é rigorosamente afetado (Hassan et al 2019).

O níquel na forma de nanopartículas pode ter entrado na planta e atravessado livremente pela via apoplástica e estria de Caspary. Dependendo da planta, estas barreiras de entrada podem ter poros que variam de 1 a 100 nm de tamanho (Tombuloglu et al., 2020). Majumdar et al. (2014) demonstraram que nanopartículas de cerium entraram nos tecidos da raiz através de espaços na estria de Caspary. Como mostrado na figura 4, o presente estudo mostra que a *Pistia stratiotes* é uma planta capaz de acumular grandes concentrações de níquel, porém afetando significativamente seu crescimento. Contudo, tem grande potencial de biorremediação em concentrações menores e pode ser utilizada como bioindicadora deste elemento no ambiente.

O acúmulo de Ni reduz o crescimento da planta em consequência dos vários distúrbios causados no metabolismo celular, causados pela ação das espécies reativas de oxigênio as quais em elevadas concentrações, resultam em desequilíbrio do potencial redox das células. Isso promove danos às membranas lipídicas, pigmentos fotossintéticos, diminuição das taxas fotossintéticas e desregulação da respiração (Hassan et al., 2019).

Contudo, mesmo tendo absorvido mais NiNP do que o Ni salino, o crescimento foi mais afetado nas plantas tratadas com NiSO₄, provavelmente pelo motivo de possuir polifenóis nas NiNPs, que foram utilizadas para reduzir o sal de níquel em nanopartículas. Polifenóis são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de algumas plantas, essencial para o crescimento, desenvolvimento e envolvidos nas defesas da planta (Tanase et al., 2019). Estes compostos atuam em diferentes funções, além de estruturais, possuem importantes propriedades antioxidantes que podem diminuir ou inibir a peroxidação lipídica (Tanase et al., 2014). Além disto, as NiNPs possuem valência zero, possuindo menor interação com outras moléculas e membranas, apresentando menor reação quando comparadas ao sal, que está prontamente reativo no sistema.

Outra possibilidade é que as NiNPs foram “encapadas” com matrizes orgânicas, que, apesar de terem sido absorvidas pela planta, o Ni das nanopartículas foram liberados lentamente para o meio celular, causando menores danos em alguns

parâmetros, conforme demonstram os indicadores de dano celular, como o MDA. Ocorreu também a queda elevada de raízes pelas plantas nos tratamentos com níquel salino, enquanto nas plantas tratadas com NiNP esse fenômeno ocorreu com menor frequência.

Pesquisa realizada por Pereira et al. (2018) demonstrou que plantas de *Lemna minor* tiveram o crescimento mais afetado com AgNO_3 do que com AgNP, e que o revestimento das NPs fez diferença na menor toxicidade nas plantas. Em uma pesquisa feita por Castiglione et al. (2016), foi demonstrado que nanopartículas de TiO_2 foram menos tóxicas no crescimento vegetal em plantas de *Vicia faba* do que em plantas na presença de titânio na forma salina. Da mesma forma, plantas de *Brassica napus* L. tratadas com Zn na forma de sal ZnO e na forma de ZnNP apresentaram redução de crescimento quando expostas ao Zn salino em concentração cerca de 5 vezes menores do que a concentração de ZnNP, considerando-se a mesma redução no crescimento (Kouhi et al. 2015).

A toxicidade por Ni pode gerar danos aos pigmentos diretamente pela paralisação da síntese de clorofila pela deficiência de Fe^{2+} e Mg^{2+} ou pela diminuição dos pigmentos já existentes, por meio da substituição do íon de Mg na estrutura da clorofila pelo Ni, sendo sintoma comum à toxicidade de outros metais pesados (Shahzad et al., 2018). Os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides diminuíram na concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni comparados ao controle, sendo as plantas com tratamentos de NiSO_4 com reduções maiores de carotenóides. O níquel pode causar em algumas plantas desregulação no sistema dos tilacóides, transformando cloroplastos em amiloplastos, como demonstrado por Appenroth et al. (2010) em plantas de *Lemna* e *Spirodela*, sendo outra possível explicação para a diminuição dos pigmentos. Similar aos nossos resultados, altas concentrações de NiNPs no meio resultaram em maior redução dos pigmentos fotossintéticos em plântulas de repolho (Chung et al., 2019). Torbati (2018) demonstrou que, em estudos comparando a toxicidade de NiO e NiNP, as plantas de *Lemna minor* e *Spirodela polyrhiza* tratadas com NiNP mantiveram ou aumentaram as concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides comparadas ao controle, enquanto plantas tratadas com NiO sofreram redução sobre a concentração de pigmentos fotossintéticos. Quanto menor o estresse oxidativo, menores os danos em pigmentos, como mostrado no presente estudo.

A exposição das plantas ao Ni resultou em diminuição nos parâmetros fotossintéticos, sendo as plantas tratadas com NiNP mais afetadas que as tratadas

com NiSO_4 . Nos tratamentos com nanopartículas, foram observados aumento na taxa respiratória, diminuição na fotossíntese, diminuição da condutividade estomática, diminuição da transpiração, e diminuição no rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e na taxa de transporte de elétrons (ETR). Em contraste, as plantas expostas ao NiSO_4 tiveram redução nas taxas respiratórias.

Corroborando com o presente estudo, Večeřová et al. (2016) sugeriram que plantas de cevada mantiveram as taxas respiratórias altas sob tratamento de nanopartículas de cádmio pois os substratos para a respiração, como aminoácidos e polissacarídeos, não foram afetados pelo acúmulo de Cd. Fuentes et al. (2014) mostraram que a planta aquática *Salvinia minima* apresentou taxas respiratórias consideravelmente elevadas após 6 dias de exposição a estresse por níquel.

A fotossíntese não apresentou mudanças nas duas fontes de níquel nas concentrações de 0,3 e 1,5 mg L^{-1} , enquanto nas maiores concentrações ocorreu significativa mudança, principalmente nos tratamentos de NiNP. Este resultado acompanha a quantidade de pigmentos fotossintéticos, que reduziram nas fontes de níquel salino e nanopartículas na concentração de 7,5 mg L^{-1} . Bhalerao et al. (2015) demonstra que a diminuição das taxas fotossintéticas está relacionada com danos na estrutura do cloroplasto, inibição das enzimas do ciclo de Calvin-Benson e como visto no presente estudo, desregulação na cadeia de transporte de elétrons e diminuição da condutividade estomática. Wang et al. (2016) relataram que ZnNP causaram redução de mais de 50% na taxa fotossintética em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Outros estudos mostraram redução na fotossíntese líquida por toxicidade de Ni em plantas de *Triticum aestivum* L. (Yusuf et al., 2011) e *Euglena gracilis* (Ahmed e Häder, 2010). Contudo, o principal mecanismo de alteração na fotossíntese por Ni não está elucidado.

Seguindo o padrão da fotossíntese, a condutância estomática (g_s) manteve os níveis estatisticamente iguais ao do controle nas concentrações de 0,3 e 1,5 mg L^{-1} , enquanto diminuiu na dose mais alta, resultando em menores taxas de trocas gasosas. Os resultados confirmam estudos prévios, que a g_s diminuiu em folhas novas e maduras sob estresse por níquel (Velikova et al., 2011).

O efeito do níquel nas folhas gera diminuição nas células do feixe vascular, mesófilo e epiderme mais fino, diminuindo os espaços intercelulares causando diminuição na transpiração (Bazihizina et al., 2015; Shahzad et al., 2018; Hassan et al., 2019). Demonstrando um resultado inesperado visto que as plantas do tratamento

com nanopartículas tiveram a taxa de crescimento relativa menos afetadas, possivelmente houve translocação das nanopartículas pelo xilema através da transpiração, acumulando nos tecidos foliares, e após o acúmulo houve liberação lenta do Ni pelas NPs causando efeitos tóxicos na condutância estomática, transpiração e nos cloroplastos, consequentemente afetando os parâmetros fotossintéticos. Bartoli et al. (2012) mostraram que a planta *Leptoplax emarginata*, que é uma hiperacumuladora de Ni, cultivada em solo rico em Ni e Cd teve redução significativa na transpiração. A mesma tendência foi observada em plantas de trigo por Shafeeq et al. (2012). Plântulas de tomate tratadas com nanopartículas de óxido de cério (CeO_2) em concentração de 10 mg L^{-1} tiveram a taxa de transpiração reduzida (Wang et al., 2013).

O rendimento quântico potencial (F_v/F_m) diminuiu nas concentrações de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni na forma salina e de nanopartículas, sugerindo que houve danos estruturais e funcionais no fotossistema II enquanto o rendimento efetivo (ΦPSII) não sofreu alterações e a taxa de transporte de elétrons (ETR) aumentou no tratamento de NiNP a $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e nos tratamentos de NiSO_4 nas concentrações de $1,5$ e $7,5 \text{ mg L}^{-1}$. Štefanić et al. (2021) demonstraram que tratamentos com diferentes concentrações de AgNP e AgNO_3 não causaram mudanças significativas no ΦPSII comparados ao controle. Zsiros et al. (2018) demonstraram que 100 mg L^{-1} de SeNP não afetou o ΦPSII e ainda teve aumento significativo no fotossistema I em plantas de tabaco. Por outro lado, Biba et al. (2021) apresentaram em seu estudo que as duas formas de Ag diminuíram o ΦPSII e a ETR em plântulas de tabaco. Segundo Ke et al. (2018), as nanopartículas foram mais severas na inibição da fotossíntese que o sal de prata, corroborando com nosso estudo. As plantas tratadas com NiNP acumularam mais Ni nas folhas estatisticamente comparadas com as plantas no tratamento com NiSO_4 , o que pode explicar os menores parâmetros fotossintéticos. Mesmo apresentando menor fotossíntese líquida e maior taxa de crescimento relativo, as plantas tratadas com NiNP apresentaram visualmente crescimento vigoroso até o quinto dia de experimento e só depois mostrarem sintomas de toxicidade por Ni. Provavelmente o Ni das NiNPs foram sendo liberadas gradualmente, causando toxicidade após as plantas já apresentarem crescimento relativo maior que as plantas tratadas com NiSO_4 , que está prontamente reativo nas células.

O acúmulo de metais pesados afeta a integridade de membranas, pois induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em altas concentrações,

causam danos aos lipídios de membrana através da peroxidação lipídica, resultando em perda de eletrólitos, perda de pressão de turgor e desregulam atividades das enzimas ligadas à membrana, alterando a afinidade para com o substrato (Kazemi et al., 2010; Anjum et al., 2016; Shahzad et al., 2017; Foyer, 2018).

A concentração de malondialdeído (MDA) é um indicador do resultado dos danos à membrana por ROS (Shahzad et al., 2018). A exposição das plantas ao Ni induziu o estresse oxidativo como demonstrado pelo aumento significativo de H_2O_2 em plantas do tratamento com Ni na forma salina comparadas às plantas tratadas com Ni na forma de nanopartículas, MDA e extravasamento de eletrólitos principalmente na maior concentração. Diferentes trabalhos demonstraram o aumento de H_2O_2 e peroxidação lipídica em outras plantas causadas por NiNP, $NiSO_4$ e NiO (Oukarroum et al., 2015; Chung et al., 2019; Pinto et al., 2019). Plantas hiperacumuladoras de Ni podem não evitar a formação de ROS, como mostrado no presente trabalho, porém parece ter capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Khaliq et al., 2015), o que não ocorreu no nosso estudo. A diminuição de H_2O_2 nas folhas e raízes de plantas tratadas com NiNP pode ter relação com a menor reatividade das NiNP, que possuem valência zero e/ou são liberadas para o meio de forma mais lenta. O Ni em forma de sal apresentou ser mais tóxico que as nanopartículas em relação a espécie reativa de oxigênio e peroxidação lipídica.

A atividade da SOD mostrou aumento significativo nas raízes na maior concentração de Ni, em ambas as formas químicas, resultado que corroborado pelos trabalhos de Doganlar (2012), com *Lemna gibba* e Hasanuzzaman et al. (2019), com *Oryza sativa* L. Na concentração mais baixa, não houve mudanças significativas na atividade da SOD em plantas tratadas com $NiSO_4$ e NiNP, provavelmente não foi uma dose suficiente para ativar a defesa desta enzima na planta, o que é consubstanciado pelos resultados de MDA e extravasamento de eletrólitos.

A atividade da CAT nas folhas permaneceu estatisticamente igual ao controle nas plantas tratadas na concentração de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto nas outras concentrações a atividade diminuiu. Não houve diferenças estatísticas entre diferentes formas de Ni e diferentes concentrações. Sob acúmulo de Ni, a atividade da CAT pode não ser suficiente para destoxificar a grande quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pela *Pistia stratiotes*, como foi demonstrado por Singh e Pandey (2011).

A atividade da POX não alterou significativamente com o incremento no acúmulo de Ni, independente da forma química. Provavelmente, essa enzima não tem

uma participação efetiva na mitigação das elevadas concentrações de H_2O_2 . Alguns pesquisadores relataram que pode ocorrer redução na atividade da POX em contrapartida ao incremento da atividade da SOD, conforme demonstrado por Torbati et al. (2017) e Tarrahi et al. (2017) com plantas de *Lemna minor* em tratamentos de ZnNPs e SiNPs.

6. CONCLUSÃO

A *Pistia stratiotes* se mostrou uma planta com capacidade de acumular grandes quantidades de nanopartículas de níquel (NiNP) em seus tecidos, mais que o sal do próprio elemento, principalmente nas raízes. As plantas apresentaram clorose nas pontas das folhas, seguidas de necrose, raízes escurecidas seguidas de abscisão e havendo mortalidade após os 7 dias. O grande acúmulo das NiNPs nas folhas prejudicou o funcionamento regular de vários aspectos fisiológicos e bioquímicos, apresentando grande queda na fotossíntese e crescimento e danos nas membranas celulares. As plantas tratadas com nanopartículas tiveram menores concentrações de H_2O_2 comparadas as plantas tratadas com Ni na forma salina. Entretanto, concentrações baixas de NiNP se mostraram benéficas para a planta, como maiores teores de pigmentos fotossintéticos e maior taxa de fotossíntese líquida, podendo se fazer necessário, no futuro, estudos sobre efeitos de concentrações baixas de NiNP para aspectos nutricionais nas plantas. Em alguns aspectos, as NiNP foram menos tóxicas para a planta comparadas ao $NiSO_4$. Faz-se necessário mais estudos sobre o metabolismo de nanopartículas metálicas em plantas em nível molecular e anatômico, para elucidar os processos envolvidos, principalmente o efeito sobre os parâmetros fotossintéticos.

REFERÊNCIAS

- Ahghari MR, Soltaninejad V, Maleki A** (2020) Synthesis of nickel nanoparticles by a green and convenient method as a magnetic mirror with antibacterial activities. *Sci Rep* **10**: 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-69679-4
- Ahmed H, Häder D-P** (2010) Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environ Exp Bot* **69**: 68–75. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.02.009
- Albrecht MA, Evans CW, Raston CL** (2006) Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem* **8**: 417–432. doi: 10.1039/B517131H
- Anderson ME** (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* **113**: 548–555. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13073-9
- Anjum SA, Tanveer M, Ashraf U, Hussain S, Shahzad B, Khan I, Wang L** (2016) Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**: 17132–17141. doi: 10.1007/s11356-016-6894-8
- APHA** (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. American Public Health Association
- Appenroth K-J, Krech K, Keresztes A, Fischer W, Koloczek H** (2010) Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* **78**: 216–223. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.007
- Aqeel M, Khalid N, Tufail A, Ahmad RZ, Akhter MS, Luqman M, Javed MT, Irshad MK, Alamri S, Hashem M, et al** (2021) Elucidating the distinct interactive impact of cadmium and nickel on growth, photosynthesis, metal-homeostasis, and yield responses of mung bean (*Vigna radiata* L.) varieties. *Environ Sci Pollut Res* **28**: 27376–27390
- Banerjee A, Roychoudhury A** (2020) Plant responses to environmental nickel toxicity. In T Aftab, KR Hakeem, eds, *Plant Micronutr. Defic. Toxic. Manag.* Springer International Publishing, Cham, pp 101–111
- Barbosa LCA** (2007) Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos. Editora UFV, Viçosa, MG.
- Bartoli F, Coinchelin D, Robin C, Echevarria G** (2012) Impact of active transport and transpiration on nickel and cadmium accumulation in the leaves of the Ni-hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*: a biophysical approach. *Plant Soil* **350**: 99–115. doi: 10.1007/s11104-011-0885-9

Bazihizina N, Redwan M, Taiti C, Giordano C, Monetti E, Masi E, Azzarello E, Mancuso S (2015) Root based responses account for *Psidium guajava* survival at high nickel concentration. *J Plant Physiol* **174**: 137–146. doi: 10.1016/j.jplph.2014.10.011

Bhalerao SA, Sharma AS, Poojari AC (2015) Toxicity of Nickel in Plants. *Int J Pure Appl Biosci* **3**: 345–355

Biba R, Tkalec M, Cvjetko P, Štefanić PP, Šikić S, Pavoković D, Balen B (2021) Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Bot Croat* **80**: 1–11. doi: 10.37427/botcro-2020-029

Biemelt S, Keetman U, Albrecht G (1998) Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol* **116**: 651–658. doi: 10.1104/pp.116.2.651

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302–310. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6

Campos PS, Pham Thi AT (1997) Effects of an abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress. *Plant Sci* **130**: 11–18. doi: 10.1016/S0168-9452(97)00199-4

Cartwright A, Jackson K, Morgan C, Anderson A, Britt DW (2020) A review of metal and metal-oxide nanoparticle coating technologies to inhibit agglomeration and increase bioactivity for agricultural applications. *Agronomy* **10**: 1018. doi: 10.3390/agronomy10071018

Castiglione RM, Giorgetti L, Bellani L, Muccifora S, Bottega S, Spanò C (2016) Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L. *Environ Exp Bot* **130**: 11–21. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.05.002

Cempel M, Nikel G (2006) Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Polish J. Environ. Stud.* **15**: 375–382.

Chahardoli A, Karimi N, Ma X, Qalekhani F (2020) Effects of engineered aluminum and nickel oxide nanoparticles on the growth and antioxidant defense systems of *Nigella arvensis* L. *Sci Rep* **10**: 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-60841-6

Chen C, Huang D, Liu J (2009) Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *CLEAN – Soil, Air, Water* **37**: 304–313. doi: 10.1002/clen.200800199

Chung IM, Venkidasamy B, Thiruvengadam M (2019) Nickel oxide nanoparticles cause substantial physiological, phytochemical, and molecular-level changes in Chinese cabbage seedlings. *Plant Physiol Biochem* **139**: 92–101. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2019.03.010

De Mendiburu F (2019) Una herramienta de analisis estadistico para la investigacion agricola. Tesis. Universidad nacional de ingenieria (uni-peru). 44p.

Din MI, Tariq M, Hussain Z, Khalid R (2020) Single step green synthesis of nickel and nickel oxide nanoparticles from *Hordeum vulgare* for photocatalytic degradation of methylene blue dye. Inorg Nano-Metal Chem **50**: 292–297. doi: 10.1080/24701556.2019.1711401

Doganlar ZB, Cakmak S, Yanik T (2012) Metal uptake and physiological changes in *Lemna gibba* exposed to manganese and nickel. Int J Biol **4**: 148–157. doi: 10.5539/ijb.v4n3p148

Eid EM, Dakhil MA, Hassan LM, Salama SG, Galal TM (2021) Uptake prediction of eight potentially toxic elements by *Pistia stratiotes* L. grown in the al-sero drain (south nile delta, Egypt): a biomonitoring approach. Sustainability **13**: 5276. doi: 10.3390/su13095276

Fatima F, Hashim A, Anees S (2021) Efficacy of nanoparticles as nanofertilizer production: a review. Environ Sci Pollut Res **28**: 1292–1303. doi: 10.1007/s11356-020-11218-9

Ferreira B, Cavalcanti P, Nogueira A (2010) Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. Revista da Estatística UFOP, **v. 1**, n. 2011-X.

Foyer CH (2018) Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. Environ Exp Bot **154**: 134–142. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.05.003

Fuentes II, Espadas-Gil F, Talavera-May C, Fuentes G, Santamaría JM (2014) Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. Aquat Toxicol **155**: 142–150. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.06.016

Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricytlenol orange hydroperoxide assay. Anal Biochem **284**: 217–220. Doi: 10.1006/abio.2000.4696

Gebre SH, Sendeku MG (2019) New frontiers in the biosynthesis of metal oxide nanoparticles and their environmental applications: an overview. SN Appl Sci **1**: 928. doi: doi.org/10.1007/s42452-019-0931-4

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol **59**: 309–314. doi: 10.1104/pp.59.2.309

Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (2018) Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Antioxidants Antioxid Enzym High Plants 1–300. doi: 10.1007/978-3-319-75088-0

Hanks NA, Caruso JA, Zhang P (2015) Assessing Pistia stratiotes for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag(I) contaminated waters. J Environ Manage **164**: 41–45. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.08.026

Hasanuzzaman M, Alam MM, Nahar K, Mohsin SM, Bhuyan MHMB, Parvin K, Hawrylak-Nowak B, Fujita M (2019) Silicon-induced antioxidant defense and methylglyoxal detoxification works coordinately in alleviating nickel toxicity in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology* **28**: 261–276. doi: 10.1007/s10646-019-02019-z

Hassan MU, Chattha MU, Khan I, Chattha MB, Aamer M, Nawaz M, Ali A, Khan MAU, Khan TA (2019) Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environ Sci Pollut Res* **26**: 12673–12688. doi: 10.1007/s11356-019-04892-x

Havir EA, McHale NA (1989) Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiol* **91**: 812–815. doi: 10.1104/pp.91.3.812

Hunt R (1978) Demography versus plant growth analysis. *New Phytol* **80**: 269–272

Imran Din M, Rani A (2016) Recent advances in the synthesis and stabilization of nickel and nickel oxide nanoparticles: A green adeptness. *Int J Anal Chem.* doi: 10.1155/2016/3512145

Jucoski G, Cambraia J, Ribeiro C, Oliveira J, De Paula S, Oliva M (2013) Impact of iron toxicity on oxidative metabolism in young *Eugenia uniflora* L. *Acta Physiol Plant* **35**:1645–1657. doi: 10.1007/s11738-012-1207-4

Kazemi N, Khavari-Nejad RA, Fahimi H, Saadatmand S, Nejad-Sattari T (2010) Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Sci Hortic (Amsterdam)* **126**: 402–407. doi: 10.1016/j.scienta.2010.07.037

Ke M, Qu Q, Peijnenburg WJGM, Li X, Zhang M, Zhang Z, Lu T, Pan X, Qian H (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Sci Total Environ* **644**: 1070–1079. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.061

Khalid S, Shahid M, Niazi NK, Murtaza B, Bibi I, Dumat C (2017) A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J Geochemical Explor* **182**: 247–268. doi: 10.1016/j.gexplo.2016.11.021

Khalid A, Ali S, Hameed A, Farooq MA, Farid M, Shakoob MB, Mahmood K, Ishaque W, Rizwan M (2015) Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seedlings through enhancing growth, photosynthesis, and suppressing Ni uptake and oxidative stress. *Arch Agron Soil Sci* **62**: 633–647. doi: 10.1080/03650340.2015.1073263

Khan MYA, Hasan F, Tian F (2019) Estimation of suspended sediment load using three neural network algorithms in Ramganga River catchment of Ganga Basin, India. *Sustain Water Resour Manag* **5**: 1115–1131. doi: 10.1007/s40899-018-0288-7

Kouhi SMM, Lahouti M, Ganjeali A, Entezari MH (2015) Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk particles, and Zn²⁺ on *Brassica napus* after long-term

exposure: changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. *Water Air Soil Pollut.* doi: 10.1007/s11270-015-2628-7

Kumar A, Jigyasu DK, Kumar A, Subrahmanyam G, Mondal R, Shabnam AA, Cabral-Pinto MMS, Malyan SK, Chaturvedi AK, Gupta DK, et al (2021) Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination, toxicity, tolerance and its remediation approaches. *Chemosphere* **275**: 129996. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129996

Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum* **46**: 149-152. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022356322373>

Leblebici Z, Dalmiş E, Andeden EE (2019) Determination of the potential of *Pistia Stratiotes* L. in removing nickel from the environment by utilizing its rhizofiltration capacity. *Brazilian Arch Biol Technol* **62**: 1–12. doi: 10.1590/1678-4324-2019180487

Lu Q, He ZL, Graetz DA, Stoffella PJ, Yang X (2011) Uptake and distribution of metals by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Environ Sci Pollut Res* **18**: 978–986. doi: 10.1007/s11356-011-0453-0

Maehly AC, Chance B (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* **1**: 357–424. doi: 10.1002/9780470110171.ch14

Majumdar S, Peralta-Videa JR, Bandyopadhyay S, Castillo-Michel H, Hernandez-Viezcas JA, Sahi S, Gardea-Torresdey JL (2014) Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. *J Hazard Mater* **278**: 279–287. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2014.06.009.

Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J Plant Nutr* **16**: 865–880. doi: 10.1080/01904169309364580

Merlot S (2020) Understanding nickel responses in plants: more than just an interaction with iron homeostasis. *Plant Cell Physiol* **61**: 443–444

Nim YS, Wong K-B (2019) The maturation pathway of nickel urease. *Inorganics* . doi: 10.3390/inorganics7070085

Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, Aisu A, Yoshida J, Mizuno T (2011) AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **52**: 1433–1442. doi: 10.1093/pcp/pcr089

Olkhovych O, Svetlova N, Konotop Y, Karaushu O, Hrechishkina S (2016) Removal of metal nanoparticles colloidal solutions by water plants. *Nanoscale Res Lett.* doi: 10.1186/s11671-016-1742-9

Pandian CJ, Palanivel R, Dhananasekaran S (2015) Green synthesis of nickel nanoparticles using *Ocimum sanctum* and their application in dye and pollutant adsorption. *Chinese J Chem Eng* **23**: 1307–1315. doi: 10.1016/J.CJCHE.2015.05.012

Peharec Štefanić P, Košpić K, Lyons DM, Jurković L, Balen B, Tkalec M (2021) Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomater.* doi: 10.3390/nano11030744

Pereira SPP, Jesus F, Aguiar S, de Oliveira R, Fernandes M, Ranville J, Nogueira AJA (2018) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Sci Total Environ* **618**: 1389–1399. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>

Pinto M, Soares C, Pinto AS, Fidalgo F (2019) Phytotoxic effects of bulk and nano-sized Ni on *Lycium barbarum* L. grown in vitro – Oxidative damage and antioxidant response. *Chemosphere* **218**: 507–516. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.11.127

Prado R (2021) Nickel. *Miner. Nutr. Trop. Plants.* Springer International Publishing, Cham, pp 251–261. doi: 10.1007/978-3-030-71262-4

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rezania S, Taib SM, Md Din MF, Dahalan FA, Kamyab H (2016) Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *J Hazard Mater* **318**: 587–599. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.053

Rizwan M, Ali S, Qayyum MF, Ok YS, Adrees M, Ibrahim M, Zia-Ur-Rehman M, Farid M, Abbas F (2017) Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J Hazard Mater* **322**: 2–16. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.061

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25**: 192–205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4

Shafeeq A, Butt ZA, Muhammad S (2012) Response of nickel pollution on physiological and biochemical attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Bhakar-02. *Pakistan J Bot* **44**: 111–116.

Shah GA, Ahmed J, Iqbal Z, Hassan F-, Rashid MI (2021) Toxicity of NiO nanoparticles to soil nutrient availability and herbage N uptake from poultry manure. *Sci Rep* **11**: 11540. doi: 10.1038/s41598-021-91080-y

Shahzad B, Mughal MN, Tanveer M, Gupta D, Abbas G (2017) Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview. *Environ Sci Pollut Res* **24**: 103–115. doi: 10.1007/s11356-016-7898-0

Shahzad B, Tanveer M, Rehman A, Cheema SA, Fahad S, Rehman S, Sharma A (2018) Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. *Plant Physiol Biochem* **132**: 641–651. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2018.10.014

Singh K, Pandey SN (2011) Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. J Environ Biol **32**: 391–394

Sudhasree S, Shakila Banu A, Brindha P, Kurian GA (2014) Synthesis of nickel nanoparticles by chemical and green route and their comparison in respect to biological effect and toxicity. Toxicol Environ Chem **96**: 743–754. doi: 10.1080/02772248.2014.923148

Tanase C, Boz I, Stingu A, Volf I, Popa VI (2014) Physiological and biochemical responses induced by spruce bark aqueous extract and deuterium depleted water with synergistic action in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Ind Crops Prod **60**: 160–167. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.039

Tanase C, Coșarcă S, Muntean D-L (2019) A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. Mol . doi: 10.3390/molecules24061182

Tarrahi R, Khataee A, Movafeghi A, Rezanejad F, Gohari G (2017) Toxicological implications of selenium nanoparticles with different coatings along with Se(4+) on *Lemna minor*. Chemosphere **181**: 655–665. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.142

Tombuloglu H, Ercan I, Alshammari T, Tombuloglu G, Slimani Y, Almessiere M, Baykal A (2020) Incorporation of micro-nutrients (Nickel, Copper, Zinc, and Iron) into plant body through nanoparticles. J Soil Sci Plant Nutr **20**: 1872–1881. doi: 10.1007/s42729-020-00258-2

Torbati S (2018) Phytotoxicological Effects of bulk-NiO and NiO nanoparticles on lesser and giant duckweeds as model macrophytes: Changes in the plants physiological responses. Iran J Toxicol **12**: 31–39. doi: 10.32598/ijt.12.4.501.2

Torbati S, Khataee A, Saadi S (2017) Comparative phytotoxicity of undoped and er-doped ZnO nanoparticles on *Lemna minor* L.: Changes in plant physiological responses. Turkish J Biol **41**: 575–586. doi: 10.3906/biy-1611-27

Usman K, Al-Ghouti MA, Abu-Dieyeh MH (2019) The assessment of cadmium, chromium, copper, and nickel tolerance and bioaccumulation by shrub plant *Tetraena qataranse*. Sci Rep **9**: 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-42029-9

Vaculík M, Kováč J, Fialová I, Fiala R, Jašková K, Luxová M (2021) Multiple effects of silicon on alleviation of nickel toxicity in young maize roots. J Hazard Mater **415**: 125570. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125570

Van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth Res **25**: 147–150. doi: 10.1007/BF00033156

Večeřová K, Večeřa Z, Dočekal B, Oravec M, Pompeiano A, Tříška J, Urban O (2016) Changes of primary and secondary metabolites in barley plants exposed to CdO nanoparticles. Environ Pollut **218**: 207–218. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.013

Velikova V, Tsonev T, Loreto F, Centritto M (2011) Changes in photosynthesis, mesophyll conductance to CO₂, and isoprenoid emissions in *Populus nigra* plants

exposed to excess nickel. *Environ Pollut* **159**: 1058–1066. doi: 10.1016/j.envpol.2010.10.032

Venables N, Ripley D (2002) Random and mixed effects. Modern applied statistics with S. Springer New York, 271-300.

Wang Q, Ebbs SD, Chen Y, Ma X (2013) Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. *Metallomics* **5**: 753–759. doi: 10.1039/c3mt00033h

Wang T, Lin J, Chen Z, Megharaj M, Naidu R (2014) Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. *J Clean Prod* **83**: 413–419. doi: 10.1016/j.jclepro.2014.07.006

Wang X, Yang X, Chen S, Li Q, Wang W, Hou C, Gao X, Wang L, Wang S (2016) Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.01243

Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* **144**: 307–313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2

Yan A, Wang Y, Tan SN, Mohd Yusof ML, Ghosh S, Chen Z (2020) Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Front Plant Sci* **11**: 359. doi: 10.3389/fpls.2020.00359

Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A (2011) Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull Environ Contam Toxicol* **86**: 1–17. doi: 10.1007/s00128-010-0171-1

Zhai X, Li Z, Huang B, Luo N, Huang M, Zhang Q, Zeng G (2018) Remediation of multiple heavy metal-contaminated soil through the combination of soil washing and in situ immobilization. *Sci Total Environ* **635**: 92–99. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.119

Zsiros O, Nagy V, Párducz Á, Nagy G, Ünnep R, El-Ramady H, Prokisch J, Lisztes-Szabó Z, Fári M, Csajbók J, et al (2019) Effects of selenate and red Se-nanoparticles on the photosynthetic apparatus of *Nicotiana tabacum*. *Photosynth Res* **139**: 449–460. doi: 10.1007/s11120-018-0599-4.